
ANE FRANCIELE TAPPARO

Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção
do cultivo de monocamadas de células CER infectadas
pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrícus

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

São José do Rio Preto

2009

ANE FRANCIELE TAPPARO

Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrícus

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia; área de Virologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

São José do Rio Preto

2009

Tapparo, Ane Franciele.

Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrício / Ane Franciele Tapparo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

62 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Célula CER. 2. IGF-1. 3. VDIB. 4. Adaptação viral. I. Cardoso, Tereza Cristina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrício.

CDU – 57.086.83

ANE FRANCIELE TAPPARO

Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabricius

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia; área de Virologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso
UNESP-Araçatuba

Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto
UNESP-Araçatuba

Dra. Alessandra Mara Alves Ragozo
UNESP-Botucatu

São José do Rio Preto, 26 de Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Em especial dedico a minha gratidão:

A **DEUS** por ter me dado coragem e perseverança para encarar as dificuldades encontradas no decorrer deste projeto.

À **Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso** por ter confiado em minha capacidade sem ao menos me conhecer e ter me concedido a oportunidade de desenvolver meu Mestrado sob sua orientação. Meu sincero agradecimento por todo ensinamento profissional e pessoal.

À **Profa. Dra. Paula Rahal** pelo apoio, pela atenção e pela eficiência no desempenho de suas atividades como coordenadora do Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

À **Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto** por sua inestimável ajuda, pelo seu espírito de colaboração e pelo auxílio na execução dos processos histológicos.

À aluna de iniciação científica **Paloma Oliveira Tonietti** pela dedicação, responsabilidade e pela brilhante participação no desenvolver deste trabalho, seu auxílio foi essencial para o cumprimento do mesmo.

À **Ana Carolina Guedes Rosa** e **Gilmara Castilho** por toda ajuda e pelo agradável convívio no laboratório.

À **Deriane Elias Gomes** por todo ensinamento, pelos incentivos nos momentos mais difíceis e pela amizade que se fortificou devido a sua constante mostra de sinceridade, carinho e afeto.

Ao **Prof. Ms. Heitor Flavio Ferrari** por todo auxílio prestado durante a execução desta pesquisa, principalmente pela ajuda no momento de fotografar as lâminas.

Aos meus amigos de graduação **Marcelo Luiz Rubio** e **Ana Claudia Fernandes** por tudo que vivemos juntos. Nem mesmo a distância será capaz de apagar esta amizade.

A todos os professores da Pós-graduação em Microbiologia pela dedicação e ensinamentos que foram essenciais para minha formação profissional e também pessoal.

A todos os funcionários da seção de Pós-graduação por toda dúvida esclarecida e pelo auxílio, sempre que necessário, prestado com muito empenho.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro o qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho e também pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todas as pessoas da minha família; **Torres e Tapparo**, por fazerem parte da minha vida. Meus mais sinceros agradecimentos por todo incentivo, apoio e compreensão pelos momentos que foram preciso estar ausente.

A todos os meus amigos do Mestrado; **Paulo, Carol Viegas, Paulinha, Sabrina, Carol Hen, Ana Cecília, Aninha, Fernanda, Maira, Daniela, Carmélia, Márcia, Lidiane e Maria do Rosário**, pelo companheirismo e pela amizade. Deixo aqui minha eterna gratidão a todos vocês por terem participado desta conquista em minha vida.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que de certa forma colaboraram na execução deste trabalho ou que participaram da minha vida. A todos vocês o meu muito obrigada.

*“Sois meu refúgio e minha fortaleza, Senhor em quem eu confio.”
(Salmo 90, 2)*

*“Aquele que nega a existência de Deus parece-se a quem nega a
existência do Sol: não lhe serve de nada, pois ele continua a
brilhar.”*

(J. Langhbehn, escritor alemão)

RESUMO

Atualmente, as culturas celulares são consideradas uma das ferramentas mais importantes na virologia. Os meios de cultura utilizados na manutenção destes sistemas não oferecem capacidade às células de adsorver e se multiplicar em matrizes plásticas sem a adição suplementar de soro fetal bovino (SFB). Entretanto, o uso do SFB não é aconselhável devido às variações encontradas entre os lotes, o alto grau de proteína animal e a possibilidade da presença de agentes infecciosos. Além dos aspectos sanitários, existe o aspecto ético em relação à obtenção deste produto biológico. Com o aumento dos ensaios *in vitro* a quantidade estimada de produção de soro fetal bovino no mundo é de aproximadamente 500.000 litros/ano, isto significa, mais de 1.000.000 de fetos bovinos sacrificados para obtenção de SFB. O objetivo deste estudo foi cultivar as células CER (*chicken embryo related*) em diferentes meios de cultura: M-VSFM, 293-SFMII, VP-SFM, VP-SFM AGT, Glasgow, Leibovitz 15, adicionados de 2µg/ml ou 5µg/ml de IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*) e verificar a possibilidade das estirpes virais Lukert e Farangher de se adaptarem neste sistema. Nesta cultura a expressão da fibronectina e da laminina (LB1 e LB2) foram detectadas por imunofluorescência e imunoperoxidase indireta, respectivamente. As monocamadas de células CER foram infectadas pela estirpe Lukert e Farangher, sendo a m.o.i (multiplicidade de infecção) utilizada de 1.0. Após três passagens, o RNA viral foi extraído para determinar as substituições genéticas. A região hipervariável do gene VP2 foi amplificada por RT/PCR. Para confirmar as mutações, os produtos da PCR foram seqüenciados e comparados com as seqüências de VDIB publicadas no *GenBank*. Os resultados demonstraram que o meio VP-SFM e 5µg/mL de IGF-1 aplicado às culturas foi o melhor para a adaptação direta do cultivo das monocamadas sem adição de SFB. Em relação à detecção da proteína extracelular, a fibronectina foi induzida na sua síntese com a adição de 5µg/ml de IGF-1. A expressão da laminina B em processo de apoptose celular revelou maior viabilidade das células CER cultivadas sem SFB. Pela análise do seqüenciamento, das três posições fundamentais para a adaptação viral: 253, 279 e 284; somente a posição 279 sofreu substituição de aminoácido (D→N). Neste sentido, podemos concluir que a adaptação viral ao cultivo celular, após passagens consecutivas, resultou em baixa alteração genética, conservando propriedades antigênicas e patológicas das estirpes originais.

Palavras-chave: VDIB, células CER, IGF-1, cultivo celular

ABSTRACT

Currently, the cell culture are considered one of the tools most important in the virology. The culture medium used in the maintenance those systems do not offer capacity to the cells of attachment and if spread in plastic surfaces without the supplementary addition of foetal bovine serum (FBS). However, the use FBS is not advisable due to batch-to-batch variation in composition, the high animal protein content, and the possibility of the presence of infectious agents. Beyond the sanitary aspects, exists the ethical aspect in relation to the attainment of this biological product. With the increase of *in vitro* assays the amount of FBS produced in the world is estimated at approximately 500.000 litres/year, this carry in 1.000.000 bovine fetuses sacrificed for FBS attainment. The aim of this study was to adapt the CER cells (chicken embryo related) on different medium: M-VSFM, 293-SFMII, VP-SFM, VP-SFM AGT, Glasgow, Leibovitz 15, supplemented by 2µg/ml or 5µg/ml IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) and to verify the possibility the Lukert and Farangher viral strain adapted in this system. The expression of the fibronectin and laminin (LB1 and LB2) were detected by immunofluorescence and indirect immunoperoxidase, respectively. The CER cells monolayer had been infected by Lukert and Farangher strain, being the m.o.i (infection multiplicity) used of 1.0. After three passages, viral RNA was isolated to determine the genetic changes. The hypervariable regions of the VP2 gene was amplified by RT/PCR. To confirm the genetic changes, PCR products were sequenced and compared to the sequences of the GenBank published VDIB strain. The results had demonstrated that the medium VP-SFM and 5µg/mL IGF-1 applied to the cultures was optimum for the direct adaptation of the culture of the monolayers without addition of FBS. In relation the detection of the extracellular protein, the fibronectin was induced in its synthesis with the addition of 5µg/ml of IGF-1. The expression LB1 and LB2 in process cellular apoptosis revealed larger viability CER cell kept without FBS. By sequencing analysis, of the three fundamental positions to the adaptation viral: 253, 279 and 284, only the position 279 suffered genetic changes (D→ N). Finally, taken together our results, IBDV adaptation to cell culture has provided less genetic changes, keeping antigenicity and pathology characteristics from the parental strains.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	A) Morfologia das células CER em cultivo de 48h; B) Morfologia das células BHK-21 em cultivo de 48h.....	7
FIGURA 2:	A) Efeitos citopatogênicos observados 12 horas pós-infecção em células CER infectadas pelo VDIB. B) Células CER não infectadas.....	8
FIGURA 3:	Estrutura do VDIB.....	11
FIGURA 4:	Estrutura e Organização do genoma do VDIB.....	11
FIGURA 5:	Classificação das estirpes do VDIB de acordo com o grau patogênico.....	16
FIGURA 6:	Células CER cultivadas sem soro fetal bovino, com o meio VP-SFM (5µg/ml de IGF-I), 48 horas pós-repique. Seta prolongamentos observados durante a adaptação (20X).....	33
FIGURA 7:	Imunomarcção positiva para Fibronectina em células CER com 10 dias de cultura. A) em meio E-MEM acrescido de SFB. B) em meio VP-SFM adicionado de IGF-1.....	34
FIGURA 8:	Imunohistoquímica positiva para LB2. A) Células CER crescendo em E-MEM mais SFB, mostrando o grande número de células não viáveis em cultura de 10 dias B) Células CER em VP-SFM mais IGF-1.....	35
FIGURA 9:	Imunohistoquímica positiva para LB1 em culturas de 10 dias. A) Células CER em E-MEM mais SFB mostrando a marcação fraca para LB1 B) Células CER crescendo em VP-SFM mais IGF-1.....	35
FIGURA 10:	Padronização da técnica de Unidade Formadora de placas para a técnica de soroneutralização: A) Soro negativo com formação de placas confluentes coradas pelo neutral red; B) Soro positivo com ausência de	

placas; **C)** Soro negativo com formação de placas pequenas confluentes coradas pelo cristal violeta; **D)** Soro positivo com ausência de placas ilustrando a neutralização da partícula viral.....

37

FIGURA 11: **A)** Imunomarcacão positiva para VDIB com o soro negativo; **B)** com soro positivo ausência de imunomarcacão. Contra coloração com hematoxilina de Harris. (aumento 10x).....

38

FIGURA 12: Seqüências de aminoácidos dos VDIBs da posição 181 a 360 da região VP2.....

39

LISTA DE TABELAS E ANEXO

TABELA 1: Os componentes presentes no soro fetal bovino e a sua enorme variação nas concentrações.....	5
TABELA 2: Classificação das estirpes virais representativas do VDIB classificados pelos subtipos e diferenças fenotípicas.....	14
TABELA 3: Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na reação de RT/PCR ...	29
TABELA 4: Estirpes do VDIB usadas na análise do alinhamento.....	32
TABELA 5: Concentração das células CER em meio de cultura E-MEM mais FSB e VP-SFM acrescido IGF-I.....	36
ANEXO 1. Abreviações dos aminoácidos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BF	Bursa de Fabrício
BHK-21	“Baby hamster kidney”
BSA	Soro Albumina Bovina
CER	“Chicken Embryo Related”
DEPC	“Diethylene Pyrocarbonate”
DIB	Doença Infecciosa da Bursa ou Doença de Gumboro
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxirribonucleotídeos
DTT	“Dithiothreitol”
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
E-MEM	Meio essencial mínimo <i>Eagle's</i>
F52/70	Farangher
h	horas
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IGF-1	“Insuline-like Growth Factor”
LB1	Laminina B1
LB2	Laminina B2
min	Minutos
m.o.i	Multiplicidade de infecção
ORF	Quadro de leitura aberta
pb	pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
PFU	Unidade Formadora de Placa
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT/PCR	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia de Polimerase
s	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	Livre de Patógeno Específico

VDIB	Vírus da Doença Infecciosa da Bursa
v/v	Volume por volume
vvVDIB	Estirpe Hipervirulenta do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Definição de cultura celular	1
1.2. Classificação das culturas celulares	2
1.3. Meio de cultura	3
1.4. O papel do soro fetal bovino na cultura celular	4
1.5. Cultura celular sem adição de SFB	4
1.6. Origem da célula CER	6
1.7. Propagação <i>in vitro</i> do VDIB	7
1.8. Doença Infecciosa da Bursa (DIB) ou Doença de Gumboro	9
1.9. Estrutura e biologia molecular do VDIB	10
1.10. Variação da antigenicidade e da patogenicidade	13
1.10.1. Variação da antigenicidade	13
1.10.2. Variação da patogenicidade	15
1.11. Atenuação e adaptação à cultura celular	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Cultivo celular	21
3.2. Manutenção das monocamadas	21
3.3. Adaptação aos meios de cultura	22
3.4. Detecção das proteínas: Fibronectina e Laminia	22
3.5. Contagem das células	24
3.6. Infecção viral	24
3.7. Técnica de Unidades Formadoras de Placas (PFU) para Soroneutralização	25
3.8. Reação de imunoperoxidase para soroneutralização	26
3.9. Extração do RNA	27
3.10. <i>Primers</i>	29
3.11. RT/PCR	29
3.12. Eletroforese	30

3.13. Purificação do produto de PCR.....	31
3.14. Seqüenciamento.....	31
3.15. Alinhamento e edição das seqüências.....	31
4. RESULTADOS.....	33
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição de cultura celular

O sistema de cultivo celular aplicado na virologia é uma das metodologias laboratoriais utilizadas para propagação viral. Uma das técnicas mais antigas utilizadas para este propósito é a inoculação em ovos embrionados e, ou, o de animais experimentais. A cultura de tecidos é amplamente descrita na literatura, e teve seu início com a descoberta da capacidade de tecidos ou, mesmo células individualizadas adsorver em suportes plásticos e/ou vidros (PRICE & GREGORY, 1982; PAZOS et al., 2004).

A técnica de cultivo celular, que por definição é o crescimento e a manutenção de tecidos vivos *in vitro*, pode ser agrupada sob dois aspectos biológicos: culturas de fragmentos de tecido e cultura de células individualizadas provenientes da dissociação tecidual. Na sua origem, a cultura celular baseava-se em manter pequenos fragmentos de tecidos em placas de Petri, adicionados de meio de cultura, com o objetivo de promover o isolamento de material biológico, oriundo de animais infectados naturalmente (AATB, 2002).

Nesse aspecto, a cultura de fragmentos de órgãos, mais conhecida na medicina veterinária, é a de anel traqueal, utilizada para isolamento e tipificação de *Coronavírus* Grupo 3, tendo como protótipo o vírus da Bronquite Infecciosa (COOK et al., 1999).

1.2. Classificação das culturas celulares

Atualmente, as culturas celulares são, sem sombra de dúvida, as ferramentas mais importantes em um laboratório de virologia, existindo três tipos básicos, cada qual apresentando vantagens e desvantagens.

As culturas celulares primárias são derivadas diretamente dos tecidos e contêm uma população heterogênea de células. Dessa forma, tecidos de fetos ou de animais recém-nascidos são as fontes deste tipo de cultura celular, com a grande vantagem de promover o isolamento de partículas virais diretamente do material biológico (AATB, 2002). Entretanto, a grande desvantagem é a possibilidade de contaminação da cultura por vírus latente e a necessidade de fornecimento constante do material biológico o que encarece este sistema. Ademais, o número de divisões celulares neste sistema é extremamente baixo, o que limita a sua manutenção, não ultrapassando o limite de Hayflick (KING, 1996).

As culturas celulares, denominadas de cultura de células diplóides, caracterizam-se por possuir o número de seu cariótipo idêntico às células de origem e, podem ser cultivadas e propagadas, geralmente até 50 passagens consecutivas. (KING, 1996). Este sistema é sensível para o isolamento de vírus e contêm uma população mais selecionada que as culturas primárias. Além disso, a possibilidade de contaminação por vírus latente não existe (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

Em contrapartida, linhagens celulares contínuas são derivadas de tecido neoplásico ou de células normais que sofreram mutações e, podem ser cultivadas indefinidamente. Nessas linhagens celulares, denominadas de aneuplóides, as células

contêm um número anormal de cromossomos sendo, uma das características mais importantes a ser observada. Este tipo de cultura é extremamente útil para fins de diagnóstico, isolamento e propagação do vírus. São células de obtenção mais fácil, pois podem ser mantidas no laboratório através de repiques sucessivos e, conseqüentemente, são as culturas celulares de menor custo. A principal desvantagem das culturas de linhagem contínua é sua menor sensibilidade ao cultivo do vírus, com relação às culturas primárias e linhagens diplóides (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

1.3. Meio de cultura

Em relação aos meios de cultura, empregados no cultivo celular, componentes como aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e fontes de carbono, como glicose, estão na sua maioria incorporados aos meios sintéticos comerciais. Entretanto, esta composição não oferece capacidade às células de adsorver e se multiplicar em matrizes plásticas de culturas denominadas estáticas, sem a adição suplementar de soro fetal bovino (SFB). Com efeito, as concentrações de 5-20% de SFB são as mais empregadas, proporcionando propriedades biológicas de adesão e proliferação celular, entretanto, os principais mecanismos envolvidos neste processo não estão bem esclarecidos (BUTLER & SPIER, 1984; DUEL, 1987; CRUZ et al., 2000; FRAZATTI-GALLINA et al., 2001; LEE et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; GENZEL et al., 2005).

1.4. O papel do soro fetal bovino na cultura celular

Por muitos anos, o soro fetal bovino (SFB) foi considerado um suplemento padrão e essencial à cultura celular por fornecer um amplo espectro de macromoléculas, proteínas transportadoras de lipídeos e elementos traço, fatores de ligação e extensão das células, hormônios e fatores de crescimento, que são responsáveis pela proliferação e manutenção celular. Além disso, o SFB é classificado como um suplemento universal por permitir o crescimento de muitos tipos de células, tanto humanas quanto de outros animais, eliminando assim o processo de desenvolvimento de formulação de um meio específico para cada tipo de célula (GSTRAUNTHALER, 2003).

1.5. Cultura celular sem adição de SFB

No que tange as novas perspectivas na técnica de cultivo celular, autoridades reguladoras na Europa (EMEA) e nos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration-FDA) tem encorajado o uso de produtos biológicos que reduzam o uso de proteínas de origem animal, como o SFB (SAKODA et al., 1998; MERTEN et al., 1999; MARANGA et al., 2002; MERTEN, 2002; GERHARD, 2003; PAZOS et al., 2004; MOCHIZIKI, 2006).

Neste sentido, culturas celulares que contenham SFB cada vez mais se tornam indesejáveis para a produção de vacinas e uso em animais de produção. As desvantagens são as variações entre os lotes (**Tabela 1**), o alto grau de proteína animal, o que acarreta o processo de purificação, e por fim, a possibilidade da presença

de agentes infecciosos, como *Mycoplasma*, alguns *Retrovírus*, e mesmo os príons (BJARE, 1992; ELIOT, 1999; VAN DER VALK et al., 2004). Além dos aspectos sanitários, existe o aspecto ético em relação à obtenção deste produto biológico. Com o aumento crescente dos ensaios *in vitro* a quantidade estimada de produção de soro fetal bovino no mundo é de aproximadamente 500.000 litros/ano, o que significa o sacrifício de 1.000.000 de fetos bovinos para obtenção de SFB. Diante deste fato, pesquisas devem ser encorajadas no sentido de preencher os **3R** dos protocolos de “**Good Cell Culture Practice**” **Refine, Replace and Reduce** (HARTUNG et al., 2002; JOEHENS et al., 2002; COBO et al., 2006).

TABELA 1- Componentes presentes no soro fetal bovino e sua enorme variação nas concentrações segundo Preece e Gregory (1982).

<i>Composição bioquímica do soro fetal bovino</i>		
Componentes	Concentração	Variações
Proteína total	3,8 g/100mL	3,2 - 7,0
Albumina	2,3 g/100mL	2,0 - 3,6
Endotoxinas	0,36 ng/ml	0,01 - 10,0
Hemoglobina	11,3 mg/100ml	2,4 - 18,1
Colesterol	31 mg/100mL	12 - 63
Ácidos graxos	Sem padronização	
Fosfolipídeos		
Triglicerídeos		
Glicose	125 mg/100mL	85 - 247
Insulina	10 µU/ml	6 - 14
Corticóides	0,5 µg/100ml	0,1 – 2,3
Tiroxinas	12,1 ng/100ml	7,8 - 15,6
Tironina	119 ng/100ml	56 - 223
PTH	1718 pg/ml	85 - 6180
PGE	5,91 ng/ml	0,5 – 30,5
PGF	12,33 ng/ml	3,8 - 42,0

Diversos são os trabalhos na literatura, relatando a eficiência e a padronização de meios de cultura sem SFB e/ou qualquer proteína de origem animal. Esses estudos, por sua vez, originaram fórmulas comerciais de meios de cultura aplicáveis às técnicas laboratoriais de virologia, que revolucionaram os sistemas de cultivo celular (BUTLER & SPIER, 1984; CRUZ et al., 1998; SAKODA et al., 1998; BUTLER et al., 2000; CRUZ et al., 2000; KALLEL et al., 2002; FERREIRA et al., 2003; LEE et al., 2003; CARDOSO et al., 2005a; CARDOSO et al., 2005b; GENZEL et al., 2005; GHENDON et al., 2005; MAGAKI et al., 2005; MOCHIZIKI, 2006).

1.6. Origem da célula CER

A célula denominada “*Chicken Embryo Related*” (CER) tem sido utilizada desde 1977, com a sua primeira publicação, em experimentos envolvendo o vírus rábico, posteriormente outros como o *Rift Valley fever virus*, *Poxvirus*, vírus da estomatite vesicular, e mais recentemente, com o vírus sincicial bovino (SMITH et al., 1977; MOUSSA, et al., 1982; TANTAWI et al., 1983; SUPERTI et al., 1984; SUPERTI et al., 1986; SUPERTI et al., 1988; CONTI et al., 1991a; SPILKI et al., 2006). Embora, aproximadamente três décadas se passaram ainda não se tem uma completa definição da origem destas células. Na literatura, descreve-se que as células CER derivaram de um acidente laboratorial, onde fibroblastos de embrião de galinha e cultura de células BHK-21 misturaram-se e originaram as células CER (BUSSEREAU et al., 1982).

A respeito da caracterização prévia, de que as células CER derivaram de um acidente laboratorial, as mesmas diferem das células BHK-21 na morfologia e no comportamento durante o cultivo celular (**Figura 1**), entretanto apresentam

características antigênicas semelhantes na superfície celular como demonstraram Smith et al. (1977).

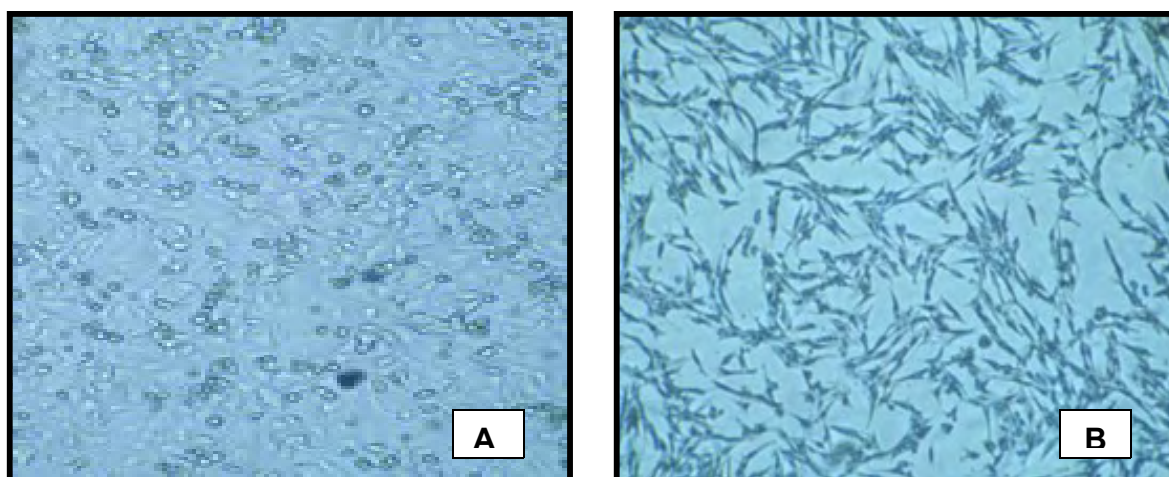


FIGURA 1- **A)** Morfologia das células CER em cultivo de 48h; **B)** Morfologia das células BHK-21 em cultivo de 48h (Fonte: CARDOSO, 2006).

Devido à importância do uso das células CER, a facilidade do seu cultivo e, a diversidade de modelos virais susceptíveis, é enfatizada a necessidade de uma adequada caracterização genotípica, fenotípica e biológica destas células.

1.7. Propagação *in vitro* do VDIB

O isolamento, a propagação e o diagnóstico do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrícus (VDIB) *in vitro* são métodos muito difíceis e trabalhosos, geralmente empregam-se culturas celulares primárias, incluindo células de rim, linfócitos e fibroblastos de embriões de galinha (LUKERT & DAVIS, 1974; NIEPER et al., 1999).

Nessas culturas o vírus produz efeito citopatogênico característico, que se apresenta como degeneração e arredondamento das células (JACKWOOD et al., 1987).

Como as culturas celulares primárias são cultivadas finitamente *in vitro*, devendo ser freqüentemente propagadas a partir do tecido de origem através de processos demorados e laboriosos (JACKWOOD et al., 1987; MCNEILLY et al., 1999). Diversos estudos foram iniciados com a finalidade de substituir a utilização de culturas primárias por linhagens celulares contínuas, como Vero, BHK-21, BGM, e CER, na replicação do VDIB (LUKERT, et al., 1975; JACKWOOD et al., 1987; FREDERIC et al., 1992; SIMONI et al., 1998; SIMONI et al., 1999; AHASAN et al., 2002; MARINHO et al., 2003; RASOOL & HUSSAIN, 2006).

Ademais, foi demonstrado que a adaptação do VDIB para propagar em células CER ocorre facilmente, com os efeitos citopatogênicos (arredondamento e destacamento das células) sendo visualizados 12 horas pós-infecção (**Figura 2**) (CARDOSO et al., 2000).

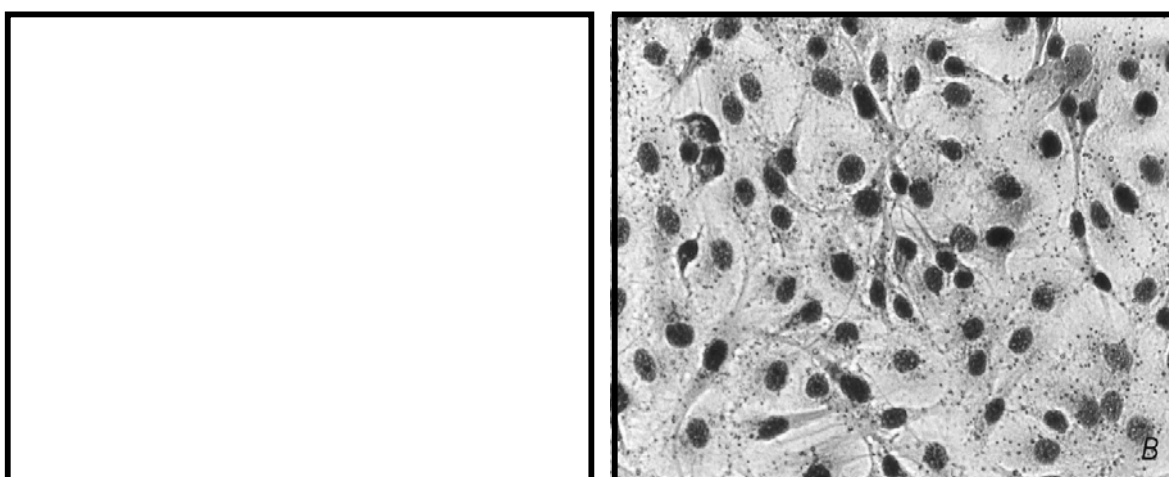


FIGURA 2- A) Efeitos citopatogênicos observados 12 horas pós-infecção em células CER infectadas pelo VDIB. B) Células CER não infectadas. (Fonte: CARDOSO et al., 2000).

1.8. Doença Infecciosa da Bursa (DIB) ou Doença de Gumboro

A DIB foi relatada pela primeira vez em 1962, depois de surtos ocorridos próximos a região de Gumboro, Delaware, Estados Unidos da América (COSGROVE, 1962); sendo que no Brasil o primeiro diagnóstico foi realizado somente em 1972 (NAKANO et al., 1972). Esta enfermidade é caracterizada como uma infecção viral aguda, altamente contagiosa e imunossupressiva, que acomete preferencialmente, aves nos primeiros dias de vida (COSGROVE, 1962; CHEVILLE, 1967; LUKERT & SAIF, 1991; VAN DEN BERG, 2000).

O órgão alvo do vírus é o tecido linfóide, principalmente a Bursa de Fabrício (BF), que é a fonte específica de linfócito B nas aves (LUKERT & SAIF, 1991; MÜLLER et al., 2003). A depleção linfocitária causada pelo VDIB é mais grave, quanto mais precoce for o processo de infecção. Nas aves infectadas, mais tardiamente, o processo de imunodepressão não é tão severo, pois os linfócitos da bursa já tiveram tempo de migrarem para outros órgãos, principalmente o baço e a medula vermelha (SHARMA, 1984; RODRIGUES, 2002). Animais bursectomizados apresentam alta resistência à infecção (KAUFER & WEIS, 1980; HIRAGA et al. 1994), o que explica o baixo índice de infecção de aves adultas, onde a BF encontra-se fisiologicamente atrofiada.

A infecção clássica da DIB é caracterizada por anorexia, depressão, penas eriçadas, diarreia mucóide e por uma severa imunodeficiência que induzem a morbidade e mortalidade das aves (COSGROVE, 1962; FARAGHER et al, 1974; LUKERT & SAIF, 1991). As aves infectadas pelo VDIB respondem fracamente a imunização contra outros patógenos, dessa forma, tornam-se vulneráveis a outras doenças como: coccidiose (ANDERSON et al., 1977), doença de Marek (CHO, 1970; SHARMA, 1984), anemia

hemorrágica, dermatite gangrenosa, laringotraqueíte infecciosa (ROSENBERGER & GELB, 1978), bronquite infecciosa, salmonelose, colibacilose (WYETH, 1975).

Atualmente, a Doença de Gumboro tem sido considerada um dos maiores problemas na avicultura mundial, especialmente pelo seu efeito imunossupressor, que provoca grandes perdas na economia avícola, além das perdas diretamente associadas à altíssima mortalidade causada pelo aparecimento de novas estirpes hipervirulentas do vírus (BECTH et al., 1988; RODRIGUES 2002; BRENTANO, 2005).

1.9. Estrutura e biologia molecular do VDIB

O vírus da DIB (VDIB) pertence ao gênero *Avibirnavirus* e a família *Birnaviridae*. A partícula viral (vírion) não possui envelope, o capsídeo é organizado em uma estrutura simétrica icosaédrica (**Figura 3**), cujo diâmetro varia de 60 a 70 nm (DOBOS et al., 1979; BROWN, 1986; KIBENGE et al., 1988; BÖTTCHER et al., 1997; VAN DEN BERG, 2000).



FIGURA 3 - Estrutura do VDIB
(Fonte:VAN DEN BERG, 2000).

O genoma viral (**Figura 4**) consiste de dois segmentos de RNA de fita dupla, sendo o segmento maior, composto por 3400 pb, denominado “fita A”, o segmento menor, “fita B” contém aproximadamente 2800 pb. (MULLER et al., 1979; STEGER et al., 1980).

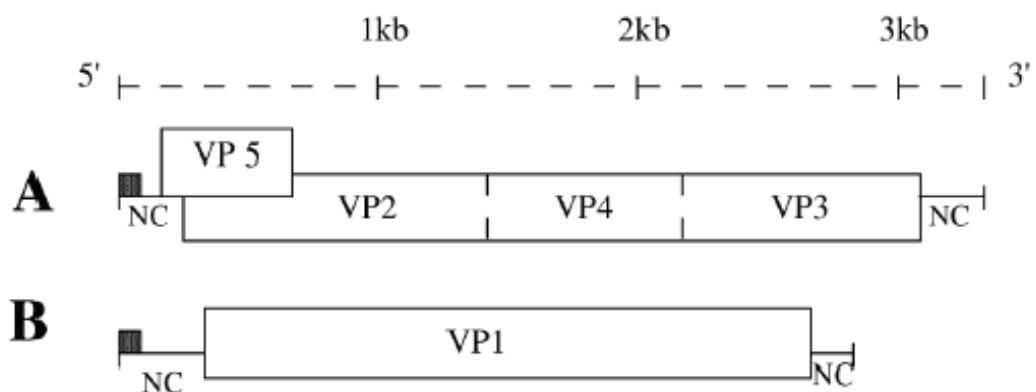


FIGURA 4 - Estrutura e organização do genoma do VDIB; ■ região reguladora; NC sequência não codificante (Fonte: VAN DEN BERG, 2000).

O segmento A contém dois “open reading frames” (ORFs), sendo o maior composto por 3039 pb e o menor por 438 pb (HUDSON et al., 1986). O primeiro e menor ORF codifica uma proteína não estrutural denominada VP5 (MÜLLER & BECHT, 1982; MUNDT et al., 1995 e 1997), a principal função desta proteína deve-se à liberação e disseminação do vírus (LOMBARDO et al., 2000; YAO & VAKHARIA, 2001). O segundo e maior ORF codifica uma poliproteína (NH₂ – VP2 – VP4 – VP3 – COOH) que é clivada em três proteínas VP2, VP3 e VP4 (MÜLLER & BECHT, 1982; HUDSON et al., 1986; KIBENGE et al., 1988; BAYLISS et al., 1990). Entre essas proteínas, a VP2 é uma proteína estrutural localizada no capsídeo externo do vírus e está relacionada com a antigenicidade (BECHT et al., 1988; FAHEY et al., 1989; DI FABIO, 2001), a VP3 está localizada no capsídeo interno e é responsável pela conformação estrutural do vírus (CASTON et al., 2001) e a VP4 é uma protease viral, responsável pela clivagem proteolítica da poliproteína (MÜLLER & BECHT, 1982; AZAD et al., 1987; DUCAN et al., 1987; ITO, 1990). O segmento B codifica apenas a proteína VP1 que expressa a função de RNA polimerase RNA-dependente (MÜLLER & NITSCHKE, 1987; SPIES et al., 1987; VON EINEM et al., 2004).

As regiões mais importantes do vírus são a VP2 e VP3. A região protéica VP2 do vírus da DIB contém uma região antigênica responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e através dela permite-se efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais (AZAD et al., 1987; BECHT, et al., 1988; FAHEY et al., 1989). Por outro lado, a proteína VP3 apresenta epítomos grupo-específicos que são reconhecidos por anticorpos não-neutralizantes (FAHEY et al., 1985; HUDSON et al., 1986; BECHT et al., 1988).

1.10. Variação da antigenicidade e da patogenicidade

A alta taxa de mutação presente nos vírus de RNA e a alta pressão de seleção gerada pela vacinação intensiva das aves, pode ter levado a emergência de vírus com novas propriedades que permitiram a eles persistirem na população imune. No caso do VDIB, estas mutações levaram a variação antigênica e modificação na virulência *in vivo* e atenuação *in vitro* (VAN DEN BERG, 2000; VAN DEN BERG et al., 2004).

1.10.1. Variação da antigenicidade

O VDIB possui dois sorotipos (sorotipo 1 e 2) antigenicamente diferentes, o sorotipo 2 apresenta baixa virulência e não provoca lesões na bursa de Fabrício ou sintomatologia em galinhas (MCFERRAN et al., 1980; ISMAIL & SAIF, 1991), sendo o sorotipo 1 capaz de causar doença em galinhas (LUKERT & SAIF, 1991; SIMON & ISHIZUKA, 2000).

Entre as estirpes do sorotipo 1 do VDIB a variação antigênica vem sendo relatada desde 1985 nos Estados Unidos (SNYDER et al., 1988), América Central (JACKWOOD & SOMMER, 1999) e, recentemente, na Austrália (SAPATS & IGNJATOVIC, 2000). A emergência destas variantes antigênicas tem despertado grande interesse científico, por constituírem-se em uma das principais causas de ocorrência da doença em plantéis avícolas vacinados (KIBENGE et al., 1988).

No vírus da DIB, a região antigênica responsável pela indução de anticorpos neutralizantes está localizada no VP2 (BECHT et al., 1988; KIBENGE et al., 1990; FAHEY et al., 1991; SNYDER et al., 1992). Neste gene, a maioria das alterações dos seus aminoácidos está inserida na região hipervariável do VP2, localizada entre os

aminoácidos 206 e 350, que é altamente hidrofóbica, mas apresenta pequenas regiões hidrofílicas em cada uma das extremidades (AZAD et al., 1987; BAYLISS et al., 1990). Estudos, envolvendo o seqüenciamento do gene VP2 de diferentes estirpes do VDIB, têm revelado que, a região hipervariável representa a base molecular da variação antigênica (HEINC et al., 1991; ÖPPLING et al., 1991; SCHNITZLER et al., 1993; VAKRARIA et al., 1994; BRANDT et al., 2001; VAN LOON et al., 2002; DORMITORIO et al., 2007; WU et al., 2007).

Dentro do sorotipo 1 (**Tabela 2**), além das estirpes clássicas que são utilizadas, normalmente, na produção de vacinas comerciais, são encontradas as pertencentes ao sorotipo 1, caracterizadas como variantes de campo, quando comparadas às amostras clássicas (KIBENGGE et al., 1988). Através de teste de neutralização cruzada, pode-se demonstrar que essas variantes apresentavam apenas 10–20% de relação com as estirpes clássicas do vírus DIB (LUKERT, 1993).

TABELA 2. Classificação das estirpes virais representativas do VDIB classificados pelos subtipos e diferenças fenotípicas (VAN DEN BERG, 2000).

Subtipo viral	Fenótipo	Mortalidade (%)
Clássico	Estirpes vacinais de baixa e intermediária virulência (lesões BF moderada)	0% - 10%
	Virulenta (atrofia da BF, inflamação hemorrágica)	30% - 60%
	Hipervirulenta (atrofia BF, lesões em outros tecidos)	70% - 100%
Variante	Apresenta rápida e severa atrofia BF	0 %

Dessa forma, as estirpes clássicas incluem os isolados descritos antes da caracterização das variantes americanas (IKUTA, 2001). Estas por sua vez, provocam a doença subclínica em aves jovens, normalmente com menos que três semanas de idade. A partir da quarta semana as aves infectadas apresentam um agravamento do quadro clínico (LUKERT & SAIF, 1991).

As variantes antigênicas do sorotipo 1, embora, não manifestam sinais clínicos da doença, independentemente da idade em que as aves são afetadas, promovem uma severa atrofia na bursa, ocasionando intensa imunodepressão, até mesmo em aves que apresentam anticorpos maternos do sorotipo 1 (ROSENBERG & CLOUD, 1986; CAO et al., 1998).

1.10.2. Variação da patogenicidade

Em adição as diferenças antigênicas presentes no sorotipo e subtipo do VDIB, as estirpes virais podem também ser classificadas de acordo com a virulência (**Figura 5**) (VAN DEN BERG, 2000). De forma geral, as diferenças na patogenicidade são observadas entre as estirpes de um mesmo grupo antigênico (VAN DEN BERG et al., 2004).

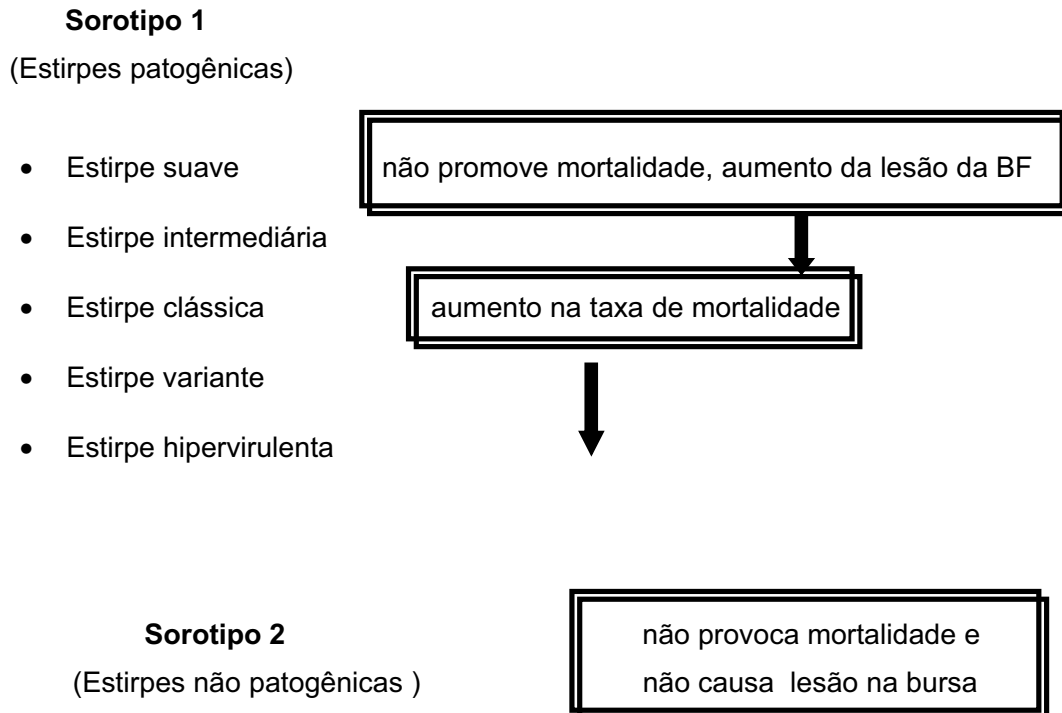


Figura 5. Classificação das estirpes do VDIB de acordo com o grau patogênico (VAN DEN BERG, 2000).

Os critérios utilizados para a classificação das estirpes VDIB como “patotipos”, está relacionado com a virulência (mortalidade e lesão na bursa) que as mesmas manifestam em aves, de 3 a 6 semanas de idade, livres de patógenos específicos. Portanto, esta classificação não considera a especificidade antigênica (VAN DEN BERG, 2000).

A correta identificação e diferenciação dos diferentes “patotipos” de VDIB é uma ferramenta importante na realização de uma vacinação efetiva (WU et al., 2007). Uma vez que, a escolha do tipo de vacina e do esquema de vacinação depende diretamente da virulência do VDIB e também do nível de anticorpos maternos (GIAMBRONE, 1984).

1.11. Atenuação e adaptação à cultura celular

A atenuação do VDIB está associada com a adaptação do vírus ao cultivo celular e com a redução da patogenicidade *in vivo* (CURSIEFEN et al., 1979; LANGE et al., 1987; HASSAN et al., 1996). Geralmente, estirpes de média e alta virulência, como o vvVDIB, são caracterizadas pela inabilidade de replicarem, ou seja, crescerem em cultura celular. Nesse caso, a adaptação viral requer um número alto de passagens em cultura celular ou ovos embrionados (SPIES et al., 1987; HASSAN et al., 1996; YAMAGUCHI et al., 1996a; YAMAGUCHI et al., 1996b). Este processo de atenuação do vírus, durante as passagens em modelos laboratoriais *in vivo* e *in vitro* é usado na produção de vacinas. Dessa forma, estirpes do VDIB têm sido adaptadas para replicar e produzir efeitos citopatogênicos em cultura celular primária como: células linfóides da bursa de galinhas, rim de embrião de galinha (CEK) e em fibroblasto de embrião de galinha (CEF) (LUKERT & DAVIS, 1974; MCNULTY et al., 1979; JACKWOOD et al., 1987). No entanto, poucos pesquisadores reportaram o crescimento do VDIB em linhagens celulares contínua de mamíferos. Dentre eles podemos citar, Rinaldi e colaboradores (1972) e Petek et al. (1973) que conseguiram propagar o VDIB na linhagem celular contínua derivada do rim de coelho (RK-13). Lukert et al. (1975) que adaptou o VDIB em células Vero, uma linhagem celular contínua originária do rim de macacos verdes africanos. Jackwood et al. (1987) que utilizou células de rim de macaco *grivet* (BGM-70) para replicar VDIB.

Na busca da seqüência responsável pela atenuação e a adaptação à cultura celular vários pesquisadores vem comparando a seqüência de nucleotídeos da estirpe

original e da amostra atenuada, tanto nas estirpes clássicas (MÜLLER et al., 1992) como na hipervirulenta (YAMAGUCHI et al., 1996b). Através destes estudos foi confirmada a natureza multigênica da atenuação, uma vez que as mutações foram localizadas em diferentes partes do genoma (VAN DEN BERG, 2000). No entanto, estudos envolvendo o seqüenciamento do gene VP2 têm revelado que algumas das substituições nos seus respectivos aminoácidos estão relacionadas com a adaptação do vírus a cultura celular (YAMAGUCHI et al., 1996b; LIM et al., 1999; MUNDT, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Padronizar o cultivo contínuo de células CER mantidas sem o uso de soro fetal bovino (SFB) e avaliar a adaptação do vírus vacinal Lukert e da estirpe virulenta Farangher (F52/70) neste sistema.

2.2. Objetivos Específicos

1. Padronizar o cultivo de células CER sem o uso de SFB nos meios de cultura, M-VSFM, 293-SFMII, VP-SFM, VP-SFM AGT, Glasgow, Leibovitz 15, adicionados de diferentes concentrações de IGF-1 (2µg/ml e 5µg/ml).
2. Avaliar nas culturas celulares a expressão da proteína de adesão, fibronectina, responsável pela manutenção das monocamadas de células CER, propriedade imprescindível para os ensaios laboratoriais de titulação viral: unidade formadora de placa e a técnica de imunoperoxidase.
3. Detectar a expressão da proteína laminina (LB1 e LB2) nas culturas para verificar apoptose celular.

4. Avaliar através do RT-PCR e subsequente seqüenciamento da região variável do VP2, se ocorreu alteração durante a adaptação ao sistema biológico da estirpe adaptada ao sistema proposto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As células CER foram obtidas e cultivadas segundo preconizam Ferreira et al., (2003). Para tanto, foi utilizada célula CER proveniente do Laboratório de Imunologia e Virologia (UNICAMP), gentilmente cedida para este estudo.

3.2. Manutenção das monocamadas

Essa linhagem de células foi mantida em frascos plásticos de 75 cm² (NUNC) com meio essencial mínimo MEM (Gibco-BRL[®]) adicionado de 10% de soro fetal bovino (Invitrogen[®]), 0,2mg de triptose fosfato (Merck[®]) e 0,1mg de extrato de levedura (Merck[®]). As monocamadas, quando totalmente confluentes, foram transferidas através do repique para outras garrafas na proporção de 1:5 e incubadas em estufa de CO₂ (2% de saturação) à temperatura de 37°C e observadas por 48 h até a completa formação do tapete celular. Também foi realizado o congelamento das mesmas com 10% de DMSO mais soro fetal bovino na concentração de 10%, as quais foram acondicionadas em frascos de criopreservação de 1,0 ml (Corning[®]) e estocadas à temperatura de -86°C por 6 meses ou até o momento de uso. As células foram mantidas em frascos 75 cm², na concentração pré-estabelecida de 4 x 10⁶ células/ml, em cultura estática.

3.3. Adaptação aos meios de cultura

A linhagem celular CER foi adaptada aos meios livres de soro por mudança direta do meio testado e adicionado de diferentes concentrações de IGF-1(Biosource®) (2µg/ml e 5µg/ml). Ensaios de cultura celular em frascos de 75 cm² foram incubados a 37°C, com uma concentração inicial de 4 x 10⁶ células/ml. As amostras, em duplicatas, foram coletadas diariamente para determinar a concentração celular.

3.4. Detecção das proteínas: Fibronectina e Laminina

Para averiguar a expressão da molécula de adesão das células CER em cultura sem SFB, foi realizado reação de imunofluorescência indireta para detecção da fibronectina. Já para a verificação da apoptose das células cultivadas na presença de IGF-1 foi realizado imunoperoxidase indireta para detecção da laminina B1 e B2. Para efeitos comparativos, foram utilizadas células CER cultivadas em meio essencial mínimo *Eagles's*, E-MEM (Gibco-BRL®) acrescido de SFB.

As monocamadas foram cultivadas em microplacas de cultura celular de 24 cavidades, após 240 h de cultivo as células foram fixadas com acetona e álcool metílico (3:1) em banho de gelo por 30 min. Após a fixação, as células foram lavadas 5 vezes com PBS 0,5% acrescido de Tween 80 e então, submetidas ao bloqueio de reações inespecíficas com uma solução contendo soro albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,5% durante 2 h a temperatura de 37°C. Em seguida, as mesmas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween.

Para a detecção da fibronectina através da imunofluorescência, após a lavagem com PBS/Tween, as células foram cobertas com aproximadamente 12µg/ml do anticorpo primário: monoclonal anti-FN (Molecular Probe Invitrogen®) diluído em PBS mais 0,1% BSA e incubados *overnight* em câmara úmida a temperatura de 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes consecutivas com PBS/Tween e incubadas por 2 h a temperatura ambiente com o conjugado anti-mouse IgG FITC (Sigma) diluído 1:500 com PBS contendo 0,5% BSA. Após 5 lavagens com PBS/Tween as placas foram examinadas com microscópio fluorescente invertido (Olympicus IX 70).

No procedimento da imunohistoquímica, antes do bloqueio das reações inespecíficas as células passaram pelo bloqueio da peroxidase endógena através de um banho de 30 min em uma solução a 50% de peróxido de hidrogênio, volume 20, (500 ml de H₂O₂ diluído em 500 ml de água destilada). Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween. A técnica prosseguiu com adição de 12µg/ml do anticorpo monoclonal anti-LB1 (Zymed®) e do anticorpo monoclonal anti-LB2 (Zymed®), respectivamente, sobre as células e estas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, a superfície das placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween, em seguida, submetidas à adição do anticorpo secundário: anti-mouse IgG ligado a Biotina (Sigma-Aldrich®) diluído 1:100 e incubado *overnight* em câmara úmida a 37°C. Após 5 lavagens consecutivas com PBS/Tween, as células foram cobertas com aproximadamente 100 µl do complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1 h a 37°C. Após este período de incubação, as mesmas foram submetidas a lavagens e posteriormente foram deixadas reagir com uma solução de

120 µg/10ml de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Gibco-BRL®) adicionada de 12 µl de peróxido de hidrogênio, sem a exposição à luz direta, após este processo a reação foi bloqueada com água corrente por 30 min. Por último, as placas levadas ao microscópico óptico para interpretação.

3.5. Contagem das células

Antes da contagem, as células que estavam crescendo em monocamadas foram liberadas da superfície em que se encontravam aderidas. Assim, foi adicionado 0,5 ml de uma solução de tripsina/EDTA (Gibco-BRL®) para cada 0,5 ml da amostra celular. Em seguida, o frasco foi incubado a 37°C com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 10 min. Após este período, as células foram submetidas ao corante azul de tripan (0,2 % v/v em PBS) que cora as células mortas, posteriormente as células foram contadas utilizando a câmara de Neubauer. Este procedimento foi realizado em triplicata e em intervalos de 24 h.

3.6. Infecção viral

As monocamadas de células CER foram infectadas pela estirpe vacinal Lukert e não vacinal Farangher através de 3 passagens consecutivas, segundo preconizado por Cardoso et al. (2000). A m.o.i (multiplicidade de infecção) utilizada foi de 1.0, quando 200 µl do inóculo foram adicionados às monocamadas de células. Após a infecção viral, as mesmas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante

72-96 h. Cada frasco contendo a monocamada infectada e o seu respectivo sobrenadante foi congelado e, descongelado duas vezes consecutivas, e o volume acondicionado no freezer -86°C.

3.7. Técnica de Unidades Formadoras de Placas (PFU) para a Soroneutralização

A técnica de unidade formadora de placas (PFU) foi padronizada em nosso laboratório, seguindo o protocolo descrito por Bussereau et al.(1982). As células CER foram submetidas à infecção pelas seguintes estirpes do VDIB: Lukert e Farangher. Para tanto, foram utilizadas placas retangulares com 8 e circulares com 6 orifícios (NUNC) que foram adicionadas de 3×10^3 células/orifício e mantidas com meio VP-SFM adicionado de 5µg/ml de IGF-1 durante 24-48 h, até o completo fechamento do tapete celular. Uma mistura de 0,5ml de soro (soro referência positivo e negativo para VDIB) e 0,5 ml de inóculo viral (m.o.i 1, estirpe Lukert e Farangher) foi deixada 1 h a temperatura de 37°C. O meio foi removido dos orifícios, e 1 ml da diluição foi adicionado sobre as monocamadas pré-formadas e submetidas à 1 h e 30 min de adsorção viral à temperatura de 37°C. Após este período, o inóculo foi removido e foram adicionados 2 ml de VP-SFM 2 x concentrado mais 5 µg/ml de IGF-1 e 2ml de agarose à 2%, e deixadas durante 5 dias consecutivos para a observação das placas formadas. A revelação foi realizada pela adição de 10% de “neutral red” a 1% que cora as células vivas e cristal violeta que ao contrário do “neutral red”, cora as células mortas, após as monocamadas foram fixadas com acetona 80% em banho de gelo. Para o soro de referência positivo, a leitura deve consistir de ausência de placas, e para o soro

referência negativo, a formação de placas em ambas as colorações devem ser observadas. Nesse caso em particular não houve avaliação de diluições, visto que o objetivo foi de avaliar o comportamento das células CER, cultivadas sob ausência de SFB, e metodologia previamente padronizada.

3.8. Reação de imunoperoxidase para soroneutralização

Para a padronização da técnica de imunoperoxidase para avaliar títulos virais, neste projeto, optou-se por utilizar o protocolo preconizado por Cardoso et al. (2000) ao invés do protocolo proposto inicialmente, preconizado por Bourgoun et al., (1987) para o modelo do Pestivirus bovino. O meio de cultura foi removido e as monocamadas submetidas à lavagem com PBS (130mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄ e 10mM NaH₂PO₄). Uma mistura igualmente utilizada no item anterior foi adicionada às monocamadas e deixadas por 1h e 30 min a 37°C. Após este tempo, 5 ml de meio VP-SFM adicionado de 5µg/ml de IGF-1 foi depositado gentilmente sobre as células e incubadas por 48 h a 37°C. Após a remoção do meio, as monocamadas foram fixadas pela adição de 5 ml de uma solução de acetona:etanol (3:2) em banho de gelo por 20 min para que não ocorresse opacidade da mesma. Após este procedimento, foi realizado o bloqueio com 3% de leite em pó diluído em PBS por 45 min em estufa à temperatura 37°C. Em seguida, as monocamadas foram incubadas com um soro hiperimune produzido em aves SPF, diluído a 1:200 em PBS adicionado de 3% de leite em pó no volume de 100 µl por orifício, sendo estas incubadas à temperatura ambiente sob agitação *overnight*. Após 15 h de incubação, as monocamadas foram lavadas por 5 vezes consecutivas

com PBS, em um volume de 100 µl por orifício. A seguir, adicionou-se o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG galinha acoplado à peroxidase (Sigma-Aldrich®) diluído 1:1000 em um volume final de 100µl por orifício, incubadas por 2 h, sob agitação, à temperatura ambiente.

O substrato imunoenzimático consistiu de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), dissolvido em tampão Tris-HCl pH 7,4, na proporção de 0,6mg DAB/ml, 0.03% H₂O₂ e 45 mM Tris HCl (pH7,5). Deste modo, cada placa foi incubada à temperatura ambiente (sem agitação) com 2,5 ml desta solução, e no início do aparecimento da coloração que variou de 8 a 10 min, com a visualização da presença de contraste com os controles, a solução foi dispensada, em seguida, foi adicionada água destilada e logo após foi observada ao microscópio invertido. Para melhor visualização foi realizado a contra coloração com hematoxilina, durante 5-10 min, para melhor destacar o núcleo do citoplasma. O soro de referência positivo deverá neutralizar a atividade viral, impedindo que o mesmo infecte as células, e dessa forma não será observada coloração, em contrapartida, o soro referência negativo, não neutralizará a partícula viral, e a coloração será evidenciada.

3.9. Extração do RNA

Para a extração do RNA viral foi utilizado o “PureLink™ Viral RNA/DNA Kits” (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante.

A primeira etapa deste procedimento promove a lise celular e conseqüentemente a liberação do material genético. Para este fim, inicialmente foi transferido 200 µl da

suspensão viral para um microtubo de 1,5 ml e no mesmo foi adicionado 200 µl do tampão “Viral Lysis Buffer” e 25 µl da Proteinase K (Invitrogen®). Após a adição dos reagentes, o tubo foi homogeneizado levemente por 15 s e posteriormente, incubado em banho-maria a 56°C por 15 min. A seguir, foi acrescentado 250 µl de etanol absoluto e homogeneizado, novamente, por 15 s. Por fim, foram incubados a temperatura ambiente por 5 min.

Para o processo de purificação do material lisado foi realizado a transferência do produto da lise para a coluna com filtro que é encaixada em um microtubo, o qual foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um tubo novo. A coluna foi lavada com 500 µl do “Wash Buffer” sendo centrifugado a 13.000 rpm por 1 min. Este processo foi realizado por 2 vezes consecutivas e ao final, o microtubo foi descartado e a coluna transferida para um outro tubo. Para remover o “Wash Buffer” residual a coluna foi submetida a uma centrifugação adicional de 13.000 rpm por 1 min e o microtubo foi mais uma vez substituído. A eluição do ácido nucléico foi realizada pela adição de 25 µl de “RNase-free Water” que foi deixado a temperatura ambiente por 1 min e posteriormente, centrifugado a 13.000 rpm por 1 min. No final do procedimento, o RNA viral purificado estava presente no microtubo. Quando necessário o ácido nucléico extraído foi armazenado a -86°C.

3.10. Primers

A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação da região hipervariável VP2 são apresentados na Tabela 3 e foram descritas por Kwon & Kim (2004).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados na reação de RT/PCR

Tipo do <i>Primer</i>	Sequência nucleotídica
Sense*	CCC AGA GTC TAC ACC ATA
Antisense	TCC TGT TGC CAC TCT TTC

* Sintetizados pela Invitrogen®

3.11. RT/PCR

Para desnaturar o RNA de fita dupla, 5 µl do RNA viral foi ressuspendido em 3 µl de DMSO, estes foram incubados a 95°C por 5 min e a 4°C por 10 min, respectivamente.

A técnica de RT/PCR inicia-se com uma amplificação global devido a utilização de 3 µg/µl primers randômicos (Invitrogen®), além de 10 mM de dNTP e 8 µl de RNA. A solução foi aquecida a 65°C por 5 min. Decorrido este tempo, foi acrescentado 4 µl do Tampão da transcrição reversa 5 X (250 mM de Tris-HCL [pH 8,3 a temperatura

ambiente], 375 mM de KCL e 15 mM de $MgCl_2$), 0,1 de mM DTT, 40 U de RNaseOUT (Invitrogen®), 200 U da SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen®) e 1 µl de água tratada com DEPC. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 min e a 55°C por 45 min. Para inativar a transcriptase reversa, a reação foi aquecida a 85°C por 5 min. Duas unidades da RNase H (Invitrogen®) foram adicionadas antes da incubação a 37°C por 20 min.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl contendo: 1 X de tampão de PCR a 10X (600 mM de Tris- SO_4 em pH 8,9 e 180 mM de Sulfato de Amônia), 50 mM de $MgSO_4$, 10 µM de cada *primer*, 10 mM da solução de dNTPs, 5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen®), 5 µl de cDNA e água destilada para completar 50 µl.

A amplificação do cDNA foi realizada em um termociclador (Eppendorf®), compreendendo de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 30 s, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo dos seguintes passos: 15 s a 94°C para a desnaturação do cDNA, 20 s a 58°C para o anelamento dos *primers* e 1 min a 68°C para a extensão das cadeias de DNA. Após o último ciclo a temperatura 68°C foi mantida por 10 min permitindo a extensão final das cadeias de DNA recém-sintetizadas.

3.12. Eletroforese

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Nos géis foram aplicados, no primeiro poço, o marcador molecular 100 pb. Nos demais, foram aplicados os produtos da PCR, sendo 5 µl desse corado com 2 µl de azul de bromofenol diluídos em 3 µl de água destilada.

A separação dos fragmentos obtidos procedeu-se através de uma voltagem constante de 110V por 1 hora. Posteriormente, estes géis foram visualizados sob iluminação UV.

3.13. Purificação do produto de RT/PCR

O kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®) foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante para purificar os produtos amplificados na RT/PCR.

3.14. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado utilizando o protocolo preconizado pelo Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence (Applied Biosystem®) e as reações submetidas ao seqüenciador ABI PRISM 377. Esta etapa foi executada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP.

3.15. Alinhamento e edição das seqüências

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram depositadas no *GenBank* com os respectivos números de acesso: FJ497057 (Lukert) e FJ497058 (Farangher). Estas seqüências foram alinhadas com as de outras 4 estirpes do VDIB (**Tabela 4**).

TABELA 4. Estirpes do VDIB usadas na análise do alinhamento

Número de acesso no <i>GenBank</i>	Estirpe	Classificação
X92760	UK661	Hipervirulenta
D00869	Farangher	Virulenta
D16679	Lukert	Clássica
AF362771	Cu-1M	Atenuada

Tanto o alinhamento quanto a tradução para seqüências de aminoácidos foram realizadas no programa BioEdit.

4. RESULTADOS

Os resultados demonstraram que o meio VP-SFM e 5µg/mL de IGF-1 aplicado às culturas estáticas foi o melhor para a adaptação direta do cultivo das monocamadas sem adição de soro fetal e replicação de VDIB. No início dos nossos estudos, diversos meios foram testados, entretanto o sucesso em manter as monocamadas, foi alcançado com a utilização do VP-SFM adicionado de 5µg/ml de IGF-1 (Figura 6); nos demais meios testados não ocorreu adaptação do cultivo celular.

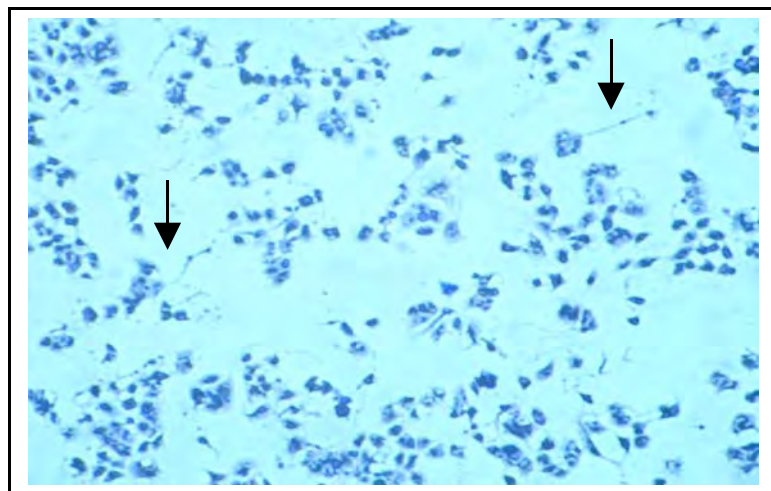


FIGURA 6 - Células CER cultivadas sem soro fetal bovino, com o meio VP-SFM (5µg/ml de IGF-I), 48 horas pós-repique. Seta prolongamentos observados durante a adaptação (20X).

Em relação à detecção da proteína fibronectina, presentes na matriz extracelular, responsável pela formação das monocamadas aderidas e confluentes o resultado pretendido foi alcançado. Uma vez que, nenhuma diferença na expressão da fibronectina foi visualizada quando comparada às células cultivadas em meio VP-SFM

acrescido de IGF-1 e as em meio E-MEM acrescido de SFB (Figura 7). Portanto, a fibronectina foi induzida na sua síntese com a adição de 5µg/ml de IGF-1. Em relação a esse resultado, nenhum relato na literatura demonstra a influência na produção de proteínas da matriz extracelular na presença ou não de soro fetal bovino.

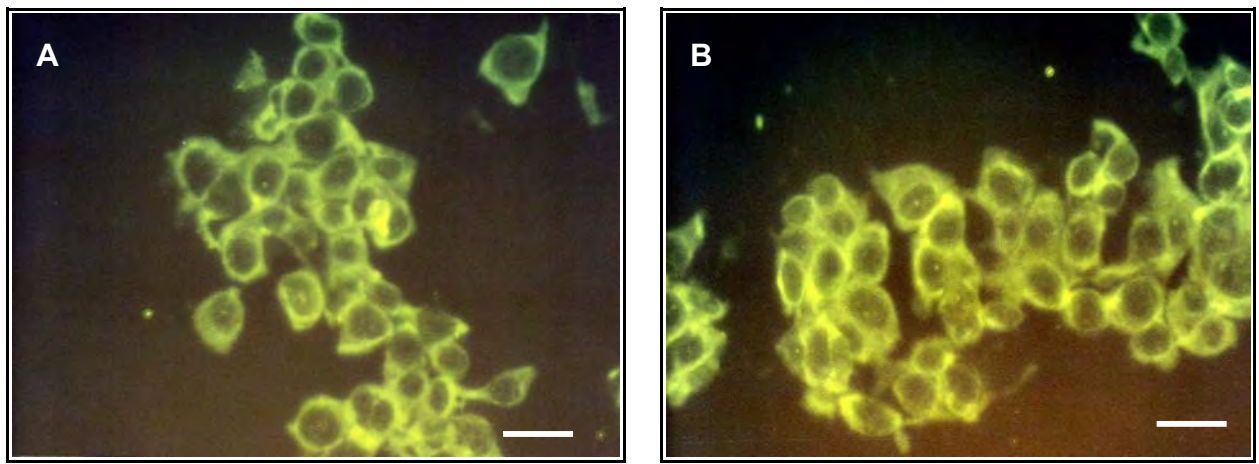


FIGURA 7- Imunomarcção positiva para Fibronectina em células CER com 10 dias de cultura. **A)** em meio E-MEM acrescido de SFB. **B)** em meio VP-SFM adicionado de IGF-1. (Barra 30µm).

A detecção da laminina B em processos de apoptose celular está relacionada com a não marcação da laminina B1 e B2 associada à membrana interna nuclear. Assim sendo, a degradação da LB1 e LB2 revela o início da dissociação dos componentes do ambiente nuclear o que leva a célula ao início da apoptose. Em resumo, quando a LB1 e LB2 foram investigadas, foi evidenciado a presença da LB1 e LB2 em ambos os cultivos celulares, assim comprovando a presença de células viáveis nestas culturas (**Figura 8 e 9**). No entanto, com 240 horas de cultivo as células CER

mantidas em meio sem SFB apresentaram maior expressão da laminina nuclear o que sugere maior viabilidade celular.

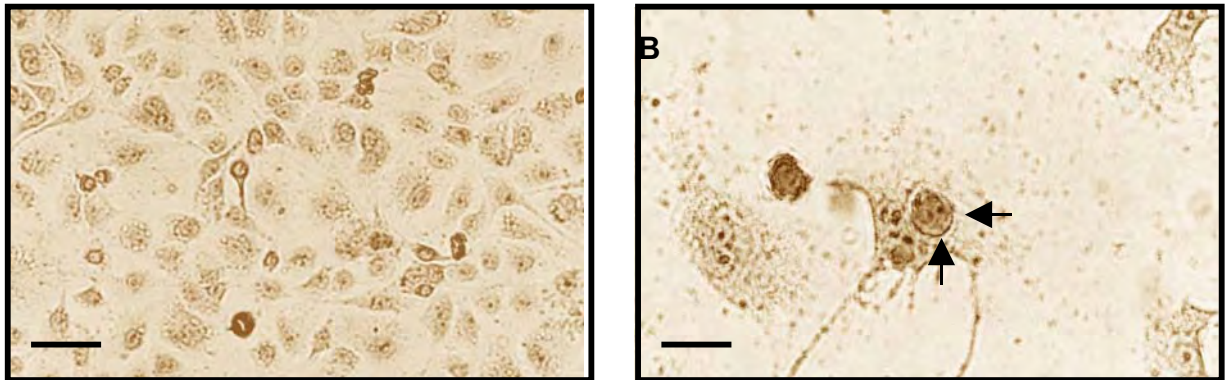


FIGURA 8- Imunohistoquímica positiva para LB2. **A)** Células CER crescendo em E-MEM mais SFB, mostrando o grande número de células não viáveis em cultura de 10 dias. **B)** Células CER em VP-SFM mais IGF-1 (setas: indicando a presença da camada LB2). (Barra 30µm).

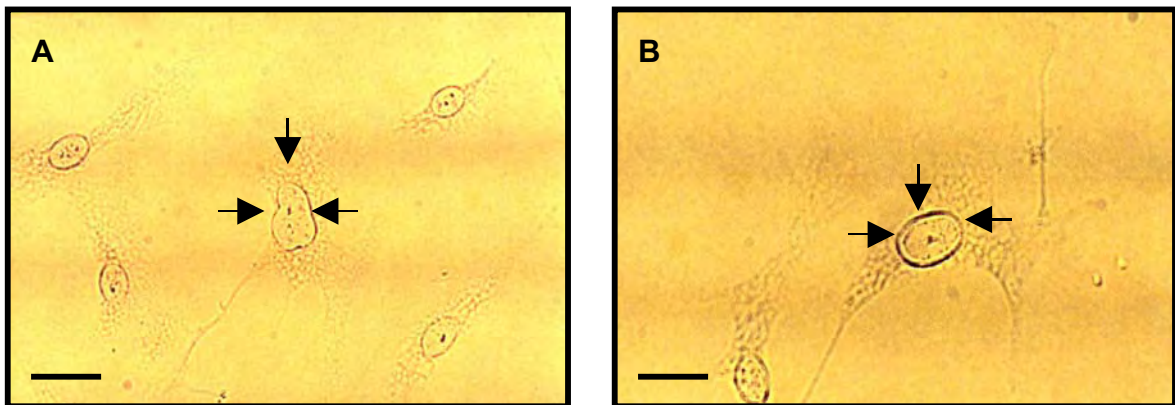


FIGURA 9- Imunohistoquímica positiva para LB1 (indicada pelas setas) em culturas de 10 dias. **A)** Células CER em E-MEM mais SFB, mostrando a marcação fraca para LB1 **B)** Células CER crescendo em VP-SFM mais IGF-1 (Barra 30µm).

De acordo com a concentração celular das células CER durante os 10 dias de cultivo tanto em meio de cultura E-MEM mais SFB quanto em meio VP-SFM mais IGF-1 foi evidenciado aproximadamente o mesmo número de células até o sétimo dia de cultura, para ambas condições. Entretanto, depois deste período, somente as células CER mantidas em VP-SFM mais IGF-1 manteve a viabilidade celular até o décimo dia do experimento (**Tabela 5**).

TABELA 5- Concentração das células CER em meio de cultura E-MEM mais SFB e VP-SFM acrescido IGF-I.

Dias de cultura										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Meio										
E-MEM	1,4x	1,6x	1,9x	2,3x	2,8x	3,8x	3,8x	2,9x	1,6x	1,8x
	10 ^{2a}	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ³
VP-	1,6x	1,8x	1,8x	1,8x	3,0x	3,8x	4,0x	3,8x	4,0x	3,8x
SFM	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

a-células por ml

A técnica de PFU foi adaptada ao meio VP-SFM acrescido de 5µg/mL de IGF-1, e as placas de diferentes tamanhos e morfologia, foram observadas como ilustra Figura 10. No ensaio de neutralização viral, no soro positivo nenhuma placa foi observada (**Figura 10 B e D**), em contrapartida para o soro negativo, as partículas virais infectaram as monocamadas promovendo a formação de placas confluentes e diferenciadas (**Figura 10 A e C**). Com relação à técnica de imunoperoxidase, a imunomarcagem foi facilmente identificada por coloração marrom, não sendo possível à observação da mesma no momento do uso de soro positivo, e facilmente visualizada no

uso de soro negativo (**Figura 11 A e B**). Achados anteriores não reportam o uso de tal metodologia, em meios ausentes de soro fetal bovino (BUSSEREAU et al., 1982; CARDOSO & PILZ, 2004). Os nossos resultados demonstram a neutralização viral pelo soro de referência positivo, e a infecção viral, quando o soro negativo foi utilizado.

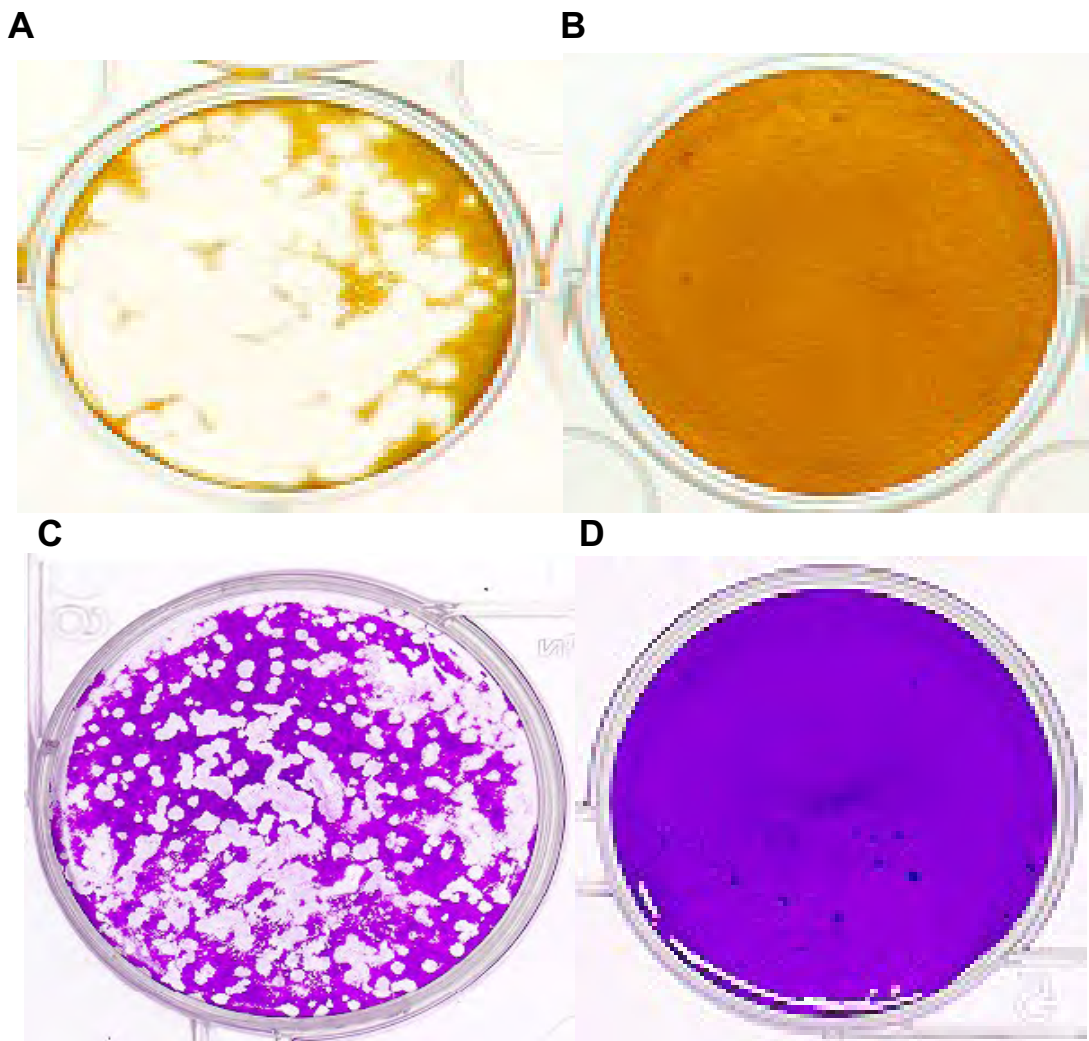


FIGURA 10. Padronização da técnica de Unidade Formadora de placas para a técnica de soroneutralização: **A)** Soro negativo com formação de placas confluentes coradas pelo neutral red; **B)** Soro positivo com ausência de placas; **C)** Soro negativo com formação de placas pequenas confluentes coradas pelo cristal violeta; **D)** Soro positivo com ausência de placas ilustrando a neutralização da partícula viral.

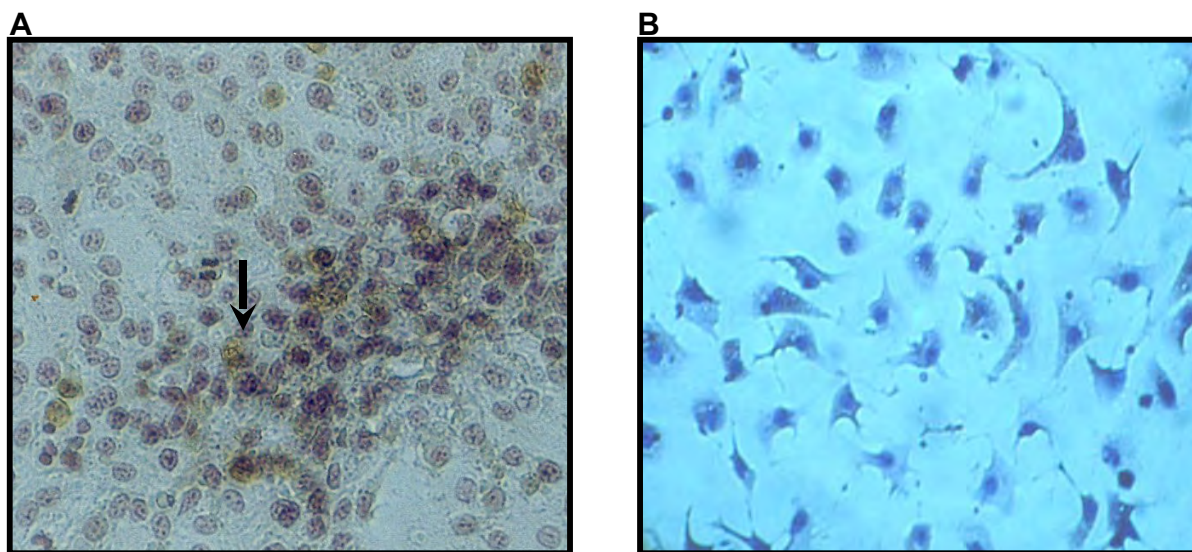


FIGURA 11. A) Imunomarcção positiva para VDIB com o soro negativo; **B)** com soro positivo ausência de imunomarcção. Contra coloração com hematoxilina de Harris. (aumento 10x).

A determinação da sequência de aminoácidos da região hipervariável VP2 foi estabelecida para as estirpes Lukert e Farangher adaptadas em cultura de células CER sem SFB. Estas seqüências foram alinhadas com as de outras 4 estirpes virais: UK661, Farangher original, Lukert original, Cu-1M, para determinar as posições das substituições genéticas.

Diferenças nos aminoácidos entre as estirpes adaptadas em cultivo celular sem SFB e a linhagem hipervirulenta UK661 foram encontradas nas seguintes posições: 222 (Ala → Ser ou Pro), 242 (Ile → Val), 256 (Ile → Val), 270 (Ala → Thr), 294 (Ile → Leu) e 299 (Ser → Asn), conforme ilustrado na figura 12 (**Anexo 1**).

No entanto, das três posições fundamentais para a adaptação viral: 253, 279 e 284; somente a posição 279 sofreu substituição de aminoácido (D → N). Em contra partida, as posições 253 e 284 não sofreram mutações. Nestas posições tanto a estirpe

Lukert quanto a Farangher foram compostas pelos aminoácidos Glutamina e Alanina, respectivamente, que foram idênticos às seqüências da linhagem hipervirulenta do VDIB (**Figura 12**).

Da mesma forma, o heptapeptídeo S-W-S-A-S-G-S (posição 326-332) que é conhecido por ser conservado em linhagens virulentas do VDIB, manteve esta ordem de aminoácidos na estirpe Lukert, sendo que apenas a estirpe Farangher apresentou trocas de aminoácidos nas posições: 329 (Ala → Gly) e 330 (Ser → Lys) (**Figura 12**).

						
	185	195	205	215	225	235
X92760	GDPIPAIGLD	PKMVATCDSS	DRPRVYTITA	ADDYQFSSQY	QAGGVITITLF	SANIDAITSL
LUKERT	-----	-----	-----		.S.....	
FARANGHER	-----	-----	-----		.P.....	
D00869					.P.....	
D16679	-----	-----	-----	-----	----X.....	
AF362771					.P.....	

						
	245	255	265	275	285	295
X92760	SIGGELVFQT	SVQGLILGAT	IYLI GF DGTA	VITRAVAADN	GLTAGTDNLM	PFNIVIPTSE
LUKERT	.V..G.....	...D.V....	T	.T.....N.	PI	...L.F..N.
FARANGHER	.V.....	...V....	..F.....T	N.	...A.....	...L.F..N.
D00869		...V....				...L...N.
D16679	H.	...A.N..	T	S..	...T.I....	...L...N.
AF362771	.V.....	..H..V....	T	N.	...T.....	...L..S.N.

						
	305	315	325	335	345	355
X92760	ITQPITSIKL	EIVTSKSGGQ	AGDQMSWSAS	GSLAVTIHGG	NYPGALRPVT	LVAYERVATG
LUKERT						-----
FARANGHER		.VG.....	GK	X.X.	..S.....	-----
D00869						
D16679					X-----	-----
AF362771			R	N..		

FIGURA 12. Seqüências de aminoácidos dos VDIBs da posição 181 a 360 da região VP2.

5. DISCUSSÃO

Nos tempos atuais, a cultura celular tornou-se uma ferramenta indispensável nas ciências biomédicas. Entretanto, em muitos casos, o sistema de cultivo celular necessita do uso de produtos de origem animal, principalmente do soro fetal bovino (SFB). Em 2003, sérias relações éticas foram levantadas sobre a coleta do SFB (VAN DER VALK et al., 2004), uma vez que, os fetos bovinos, dos quais o sangue é retirado para a produção do SFB são obtidos de vacas prenhas que são enviadas ao abate. Através destes questionamentos, a importância de métodos alternativos ao uso do SFB tornou-se amplamente difundido na comunidade científica (MCKEEHAN et al., 1990; BJARE, 1992; BUTLER et al., 2000; FRAZZATI-GALLINA et al., 2001; PAZOS et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Neste trabalho, a manutenção da cultura de célula CER sem a presença do SFB só foi alcançada com a utilização do meio de cultura VP-SFM adicionado de 5µg/ml de IGF-1. No entanto, na literatura consultada a utilização de promotores de crescimento só foi observada em culturas primárias (DUEL, 1987; MAGAKI et al., 2005; SUNSTROM et al., 2000). A concentração utilizada, na sua grande maioria, é 10 vezes inferior a utilizada no presente estudo, isto se deve ao fato que as células modificadas para o cultivo contínuo provavelmente tenham perdido os receptores para IGF-1, receptor natural encontrado nas células indiferenciadas (SUNSTROM et al., 2000). Como o SFB é composto por fatores responsáveis pela proliferação celular, diversos pesquisadores tem investido na procura por substâncias que possam substituí-lo. Pazos e colaboradores (2004) obtiveram sucesso na utilização de frações de proteína vegetal, chamada soro vegetal, para a manutenção de células epiteliais em cultura.

Após extensa revisão da literatura, foi constatado que este estudo foi o primeiro a reportar a aplicação do IGF-1, como fator de crescimento, no cultivo das células CER em substituição ao SFB. O IGF-1 tem sido bem caracterizado como fator de crescimento para muitos tipos celulares (SUNSTROM et al., 2000; VEILLEUX & SPECTOR, 2005). Além da sua atividade mitógena, o IGF-1 pode atuar como um fator responsável pela manutenção da viabilidade celular por um longo período de tempo (SUNSTROM et al., 2000) e também como um fator anti-apoptótico, assim, impedindo a morte celular por apoptose das células cultivadas em meios de cultura livres de SFB (BARSEGA et al., 1997; O'CONNOR et al., 1997). Entretanto, Sunstrom et al. (2000) observaram que a adição do IGF-1 não regula a proliferação celular das células *Chinese Hamster Ovary cells* (CHO), este resultado só foi obtido em cooperação com a transferrina. Isto porque, a transferrina está relacionada com o transporte de ferro para o interior das células, o qual é utilizado como co-fator para a enzima responsável pela síntese do DNA.

Com respeito à adesão das células, característica fundamental das culturas estáticas, a fibronectina foi secretada independente do meio de cultura utilizado, formando uma monocamada celular estável que é extremamente requerida para testes *in vitro*. Assim, o uso do IGF-1 não interferiu na expressão da fibronectina. Quando se deseja investigar a adesão celular ao substrato a proteína da matriz extracelular aconselhável a se investigar é a fibronectina. Isto porque esta proteína regula e sustenta a expressão das outras proteínas da matriz, como vitronectina, colágeno, laminina, entre outras (SASAKI et al., 1996; PEREIRA et al., 2002; SOTTILE & HOCKING, 2002).

A laminina nuclear (LB1 e LB2) consiste de uma camada de proteína justaposta à membrana nuclear interna. Durante a mitose, as lamininas são fosforiladas e solubilizadas antes da condensação dos cromossomos e da divisão nuclear. Da mesma forma, durante a apoptose alguns dos processos relacionados à mitose são também ativados. De fato, a solubilização da laminina tem sido estudada em células apoptóticas e parece que a condensação do cromossomo durante a apoptose é acompanhada pela degradação da camada de laminina nuclear. Portanto, esta degradação é utilizada como um marcador apoptótico (LEHNER et al., 1986a, LEHNER et al., 1986b; LEHNER et al., 1987; STICK et al., 1988). Recentemente, pesquisadores chineses demonstraram uma redução significativa da LB2 de células de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) infectadas pelo VDIB, o qual é responsável por induzir apoptose nestas culturas celulares (ZHENG et al., 2008).

No presente estudo a detecção da LB1 e LB2 foram observadas em ambos cultivos celulares, assim evidenciando a presença de células viáveis. Entretanto, a LB1 foi mais fortemente marcada nas células CER mantidas no meio VP-SFM com 10 dias de cultivo. No mesmo período, a cultura celular cultivada em E-MEM acrescido de SFB demonstrou um número inferior de células marcadas com LB2 quando comparadas com as células CER crescidas na presença de IGF-1. Portanto, este trabalho conclui que o IGF-1 promove a sobrevivência das células CER por no mínimo 10 dias de cultura, apresentando, neste período, maior viabilidade celular.

Devido à alta taxa de mutação no domínio variável do VP2 e assumindo que este tem um papel fundamental na entrada do vírus na célula, seqüências de aminoácidos desta região do VDIB foram comparadas. Na literatura, já são descritas as alterações genéticas na região da proteína viral VP2, necessárias para a adaptação dos diferentes

genótipos do sorotipo 1 do VDIB em diferentes modelos biológicos (YAMAGUCHI et al., 1996b; LIM et al., 1999; MUNDT, 1999; ZIERENBERG et al., 2000; SMILEY & JACKWOOD, 2001; TOROGHI et al., 2001; VAN LOON et al., 2002; KWON & KIM, 2004; JACKWOOD et al., 2008).

Evidências suportam a hipótese de que as posições 253, 279 e 284 dentro do VP2 são as principais por que controlam: a replicação do VDIB em cultura celular e a redução da patogenicidade. Estas posições apresentam aminoácidos característicos de linhagens virulentas: 253 (Q), 279 (D) e 284 (A) e de estirpes atenuadas: 253 (H), 279 (N) e 284 (T). (BAYLISS et al., 1990; KIBENGGE et al., 1990; BROWN et al., 1994; LIM et al., 1999; BRANDT et al., 2001; SCHRODER et al., 2001; VAN LOON et al., 2002; KWON & KIM, 2004). Neste trabalho, as estirpes Lukert e Farangher adaptadas através de três passagens em cultura de células CER apresentaram: 253 (Q), 279 (N) e 284 (A), sendo que apenas a posição 279 foi idêntica a da linhagem atenuada.

Estudos revelaram que os aminoácidos asparagina (N) na posição 279 e treonina (T) na posição 284 são essenciais no processo da replicação viral em cultura celular (YAMAGUCHI et al, 1996b; LIM et al., 1999; MUNDT, 1999; CHAI et al., 2001; LIU & VAKHARIA, 2004). No entanto, nossos achados revelaram que apenas a presença do aminoácido asparagina na posição 279 foi necessária e suficiente no processo de adaptação do VDIB à cultura celular. Da mesma forma, têm sido relatado que uma única substituição dentre as posições 253, 279 e 284 permite a replicação do vírus *in vitro*. Mundt (1999) e Van Loon et al.(2002) descreveram que somente a troca do aminoácido A → T na posição 284 foi necessária para obter-se infectividade na cultura celular. Em contrapartida, Jackwood e colaboradores (2008) caracterizaram que a simples troca de aminoácido na posição 253 pode alterar a virulência do VDIB, de

forma significativa. O significado de uma simples troca (A 284 T) ou uma dupla troca (D 279 N e A 284 T) está relacionada com a menor quantidade de vírus encontrada na cultura celular. Enquanto que, a troca adicional do aminoácido 253 (Q→H) é responsável por intensificar o título viral obtido (Van Loon et al., 2002),.

Usualmente, linhagens virais patogênicas não são facilmente adaptadas à cultura celular, sendo um processo que requer extensas passagens em membrana cório-alantóica (YAMAGUCHI et al., 1996a) ou em cultura de células (HASSAN et al., 1996). Portanto, o que pode interferir nas mutações das posições 253, 279 e 284 é o número de vezes e o tipo de células que as estirpes são replicadas. Kwon & Kim (2004) obtiveram sucesso em detectar as mutações características de estirpes atenuadas nestas regiões, ao mesmo tempo, após três passagens em membrana cório-alantóica de ovos embrionados e posteriormente, quatro vezes em cultura de células Vero. Ademais, estudos evidenciaram mutações nas posições 279 e 284 em decorrência de quatro passagens em células Vero (Chai et al., 2001). Provavelmente, as três passagens do VDIB em cultura de células CER não foram suficientes para obtermos as três mutações reportadas anteriormente.

As substituições dos aminoácidos nas posições: 242, 256, 270, 294 e 299 estão localizadas na porção hidrofóbica da região variável do VP2. Trocas nesta região são toleradas sem nenhuma consequência explícita na replicação do vírus (SCHNITZLER et al., 1993). Isto porque, embora o domínio variável VP2 seja altamente hidrofóbico com apenas pequenas regiões hidrofílicas em cada extremidade. Estes dois picos hidrofílicos serão expostos na superfície do vírus, constituindo os epítomos neutralizantes. Assim, mutações localizadas dentro dos picos hidrofílicos alteram a antigenicidade e conseqüentemente a virulência do vírus (VAN DEN BERG, 2000;

COULIBALY et al., 2005). Este é o caso das trocas de aminoácidos que ocorreram na posição 222 (A → P ou S).

Com relação ao heptapeptídeo S-W-S-A-S-G-S (posição 326-332), rico em serina, este parece ter influência na patogenicidade, devido ao fato, destes aminoácidos formarem pontes de hidrogênio envolvidas em interações intra e intermoleculares importantes em relação à virulência (WU et al., 2007). Assim, Heinc e colaboradores (1991) comprovaram que o heptapeptídeo, S-W-S-A-S-G-S, mantevesse conservado somente em linhagens de alta patogenicidade ao comparar as seqüências de aminoácidos de linhagens virulentas (F52/70, STC e variante E) com linhagens de baixa patogenicidade, adaptadas em cultura de células (002-73, CU-1 e PBG98). Em contra partida, o alinhamento das seqüências do segmento A de estirpes hipervirulentas, OKYM, com e estirpes adaptadas em cultura de células, OKYMT, e revelou que ambas linhagens apresentavam o heptapeptídeo, S-W-S-A-S-G-S, conservado (Yamaguchi et al., 1996b). Nossos resultados, da mesma forma demonstraram a conservação destes sete aminoácidos para a estirpe Lukert adaptada em cultura de células CER. Porém, a estirpe Farangher apresentou a substituição dos aminoácidos 329 (Ala → Gly) e 330 (Ser → Lys), sendo estas trocas consideradas irrelevantes. Este argumento foi comprovado por experimentos que apontaram as mutações na posição 330 sem influência na adaptação viral em cultura celular (MUNDT et al., 1999) .

6. CONCLUSÃO

As seguintes conclusões foram obtidas:

- 1- O IGF-1 na concentração de 5µg/mL pode substituir o SFB no cultivo de células CER quando em conjunto com o meio de cultura VP-SFM.
- 2- A expressão da fibronectina, proteína de adesão celular, não foi alterada com a utilização do IGF-1.
- 3- A expressão da laminina B em processo de apoptose celular revelou maior viabilidade das células CER cultivadas sem SFB.
- 4- De acordo com o seqüenciamento, foi detectada mutação única na posição 279 (D→N), necessária e suficiente no processo de adaptação das estirpes Lukert e Farangher na cultura de células CER sem SFB.

7. REFERÊNCIAS

AATB. American Association of tissue culture banks. In: STANDARDS for tissue banking. 10th ed. McLean, VA: *American Association of Tissue Banks*, 2002, p. 530.

AHASAN, M.M.; HOSSAIN, K.M.; ISLAM, M.R. Adaptation of infectious bursal disease virus on Vero cell line. **Journal of Biological Science**, v.9, p. 633-635, 2002.

ANDERSON, W.I.; REID, W.M.; LUKERT, P.D.; FLETCHER, O.J. Influence of infectious bursal disease on the development of immunity to *Eimeria tenella*. **Avian Disease**, v. 21, p. 637-641, 1977.

AZAD, A.A.; JAGADISH, M.N.; BROWN, M.A.; HUDSON, P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. **Virology**, v.161, p.145-152, 1987.

BARSEGA, R.; RESNICOFF, M.; D'AMBROSIO, C.; VALENTINIS, B. The role of the IGF-I receptor in apoptosis. **Vitamins Hormones**, v. 53, p. 65-98, 1997.

BAYLISS, C.D.; SPIES, U.; SHAW, K.; PETERS, R.W.; PAPAGEORGIOUS, A.; MULLER, H.; BOURSNEILL, M.E.G. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. **Journal of General Virology**, v.71, p. 1303-1312, 1990.

BECTH, H.; MULLER, H.; MULLER, H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of the two serotypes of infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, v. 69, p.631-640, 1988.

BJARE, U. Serum-free cell culture. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 53, p. 355-374, 1992.

BÖTTCHER, B.; KISELEV, N.A.; STEL'MASHCHUK, V.Y.; PEREVOZCHIKOVA, N.A.; BORISOV, A.V.; CROWTHER, R.A. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. **Journal of Virology**, v.71, p. 325-330, 1997.

BRANDT, M.; YAO, K.; LIU, M.; HECKERT, R.A.; VAKHARIA, V.N. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11974-11982, 2001.

BRENTANO, L. Importância das doenças imunossupressoras na produção de frangos de corte. In: IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 2005, Florianópolis. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=720>. Acesso em: 23 mar. 2008

BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. **Intervirology**, v.75, p. 141-143, 1986.

BROWN, M.D.; GREEN, P.; SKINNER, M.A. VP2 sequence of recent European very virulent isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strain. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 675-680, 1994.

BUSSEREAU, F.; FLAMAND, A.; PESE-PART, D. Reproducible plaquing system for rabies in CER cells. **Journal of Virological Methods**, v. 4, p. 277-282, 1982.

BUTLER, M.; SPIER, R.E. The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures. **Journal of Biotechnology**, v.1, p. 187-196, 1984.

BUTLER, M.; BURGNER, A.; PATRICK, M.; BERRY, M.; MOFFAT, D.; HUZEL, N.; BARNABÉ, N.; COOMBS, K. Application of a serum-free medium for the growth of vero cells and the production of Reovirus. **Biotechnology Progress**, v.16, p. 854-858, 2000.

CAO, Y.C.; YEUNG, W.S.; LAW, M.; BI, Y.Z.; LEUNG, F.C.; LIM, B.L. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variants strains. **Avian Disease**, v. 42, p. 340-351, 1998.

CARDOSO, T.C.; RAHAL, P., PILZ, D., TEIXEIRA, M.C., ARNS, C.W. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. **Avian Pathology**, v. 29, p. 213-217, 2000.

CARDOSO, T.C.; PILZ, D. Wild rabies virus detection by plaque assay from naturally infected brains in different species. **Veterinary Microbiology**, v. 103, p. 161-167, 2004.

CARDOSO, T.C.; TEIXEIRA, M.C.B.; FACHIN, N.; PILZ, D. Pathogenecity, Antigenicity and Immunogenecity of infectious bursal disease virus (IBDV) due to propagation in chicken embryo related cell line using serum-free medium. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 4, p. 453-458, 2005a.

CARDOSO, T.C.; TEIXEIRA, M.C.B.; FACHIN, N.; CAMARGO, T.L.; GOMES, D.E.; CORTE JUNIOR, A.O., ANSELMO, B. Evaluation of serum and animal protein free media for the production of infectious bronchitis virus (M41) strain in a continuous cell line. **ALTEX**, v. 3, p. 152-156, 2005b.

CARDOSO, T.C.; QUEIROZ DA SILVA, L.; SILVA, S.E.L.; ALBAS, A.; PARDO, P.E.; TANAKA, A.H.; COSSY, L.B.; PERRI, S.H.V. Chicken embryo related (CER) cell line for quantification of rabies antibody by fluorescent focus inhibition test. **Biologicals**, v. 34, p. 29-32, 2006.

CASTON, J.R.; MARTINEZ-TORRECUADRADA, J.L.; MARAVER, A.; LOMBARDO, E.; RODRIGUEZ, J.F.; CASAL, J.I.; CARRASCOSA, J.L. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. **Journal of Virology**, v.75, p.10815-10828, 2001.

CHAI, Y.F.; CHRISTENSEN, N.H.; WILKS, C.R.; MEERS, J. Characterization of New Zealand isolates of infectious bursal disease virus. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1571-1580, 2001.

CHEVILLE, N.F. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the burse of Fabricius, spleen and thymus of the chicken. **American Journal of Pathology**, v.51, p. 527-551, 1967.

CHO, B.R.R. Experimental dual infections of chickens with infectious bursal and Mrek's disease agents, I: preliminary observation on the effect of infectious bursal agent on Mrek's disease. **Avian Disease**, v.14, p. 665-675, 1970.

COBO, F.; TALAVERA, P.; CONCHA, A. Diagnostic for viruses and prions in stem cell banks. **Virology**, v. 347, p. 1-10, 2006.

CONTI, C.; MASTROMARINO, P.; RICCIOLI, A.; ORSI, N. Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. **Research Virology**, v. 142, p. 17-24, 1991a.

COOK, J.K.A.; ORBELL, S.J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M.B. Breadth of protection of respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathology**, v. 28, p. 477-485, 1999.

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

COULIBALY, F.; CHEVALIER, C.; GUTSCHE, I.; POUS, J.; NAVAZA, J.; BRESSANELLI, S.; DELMAS, B.; REY, F.A. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. **Cell**, v.120, p. 761-772, 2005.

CRUZ, H.J., MOREIRA, J.L., STACEY, G., DIAS, E.M., HATES, K., LOOBY, D., GRIFFITHS, B., CARRONDO, M.J.T. Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum free medium and protein free medium. **Cytotechnology**, v. 26, p. 59-64, 1998.

CRUZ, H.J.; FREITAS, C.M.; ALVES, P.M.; MOREIRA, J.L.; CARRONDO, M.J.T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism and productivity of BHK cells. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 43-52, 2000.

CURSIEFEN, D.; KÄUFER, I.; BECTH, H. Loss of virulence in a small plaque mutant of the infectious bursal disease virus. **Archives of Virology**, v. 59, p.39-46, 1979.

DI FABIO, J. Gumboro: vacinação no incubatório. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas. Anais... Campinas:FACTA, 2001, p. 195-205.

DOBOS, P.; HILL, B.J.; HALLET, R.; KELLS, D.T.C.; BECHT, H.; TENINGES, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **Journal of Virology**, v.32, p.593-605, 1979.

DORMITORIO, T.V.; GIAMBRONE, J.J.; GUO, K.; JACKWOOD, D.J. Molecular and phenotypic characterization of infectious bursal disease virus isolates. **Avian Disease**, v. 51, p. 597-600, 2007.

DUEL, T.F. Polypeptide growth factor: roles in normal and abnormal cell growth. **Annual Review Cell Biology**, v. 3, p. 443-492, 1987.

ELIOT, M. Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control. **Developments in Biological Standardization**, v. 99, p. 9-16, 1999.

FAHEY, K.J.; O'DONNELL, I.J.; BAGUST, T.J. Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity *in vitro* and confers protection on young chickens. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 2693-2702, 1985.

FAHEY, K.J.; ERNY, K.; CROOKS, J. A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 1473-1481, 1989.

FAHEY, K.J.; MCWATERS, P.; BROWN, M.A.; ERNY, K.; MURPHY, V.J.; HEWISH, D.R. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. **Avian Disease**, v. 35, p. 365-373, 1991.

FARAGHER, J.T.; ALLAN, W.H.; WYETH, C.J. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. **Veterinary Record**, v.95, p.385-388, 1974.

FERREIRA, H.L.; PILZ, D.; MESQUITA, L.G.; CARDOSO, T.C. Infectious bronchitis virus replication in the chicken embryo related cell line. **Avian Pathology**, v. 31, p. 413-417, 2003.

FERREIRA, T.B.; FERREIRA, A.L.; CARRONDO, M.J.J.; ALVES, P.M. Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1809-1813, 2005.

FRAZZATI-GALLINA, N.M.; PAOLI, R.L.; MOURÃO-FUCHES, R.M.; JORGE, S.A.C.; PEREIRA, C.A. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 67-72, 2001.

FREDERIC, S.; KIBENGÉ, F.S.B.; KENNA, K.M. Isolation and propagation of infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line. **Avian Disease**, v. 36, p. 256-261, 1992.

GENZEL, Y.; RITTER, J.B.; KÖNIG, S.; ALT, R.; REICHL, U. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 58-69, 2005.

GERHARD, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

GHENDON, Y.Z.; MARKUSHIN, S.G.; AKOPOVA, I.I.; KOPTIEVA, L.B.; NECHAEVA, E.E.; MAZURKOVA, L.A.; RADAIEVA, I.F.; KOLOKOLTSEVA, T.D. Development of cell culture (MDCK) live cold adapted (CA) attenuated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 23, p. 4678-4684, 2005.

GIAMBRONE, J.J. IBD spray vaccination. If water fails, try it. **Broiler Industry**, v. 46, p. 52-54, 1984.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, p. 275-281, 2003.

HARTUNG, T.; BALLS, M.; BARDOUILLE, C.; BLANCK, O.; COECKE, S.; GSTRAUNTHALER, G.; LEWIS, D. Good cell culture practice. **ATLA**, v. 30, p. 407-414, 2002.

HASSAN, M.K.; NIELSEN, C.K.; WARD, L.A.; JACKWOOD, D.J.; SAIF, Y.M. Antigenicity, pathogenicity, and immunogenicity of small and large plaque infectious bursal disease virus clone. **Avian Disease**, v. 40, p. 832-836, 1996.

HEINC, I.I.G.; HARITOU, M.; FAILLA, P.; FAHEY, K.; AZAD, A. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type 1 strain. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1835-1843, 1991.

HIRAGA, M.; NUNOYA, T.; OTAKI, Y.; TAJIMA, M.; SAITO, T.; NAKAMURA, T. Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infectious in intact and bursectomized chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 56, p. 1057-1063, 1994.

HUDSON, P.J.; MCKERN, N.M.; POWER, B.E.; AZAD, A.A. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. **Nucleic Acids Research**, v.14, p. 5001-5012, 1986.

IKUTA, N. Diagnóstico molecular do vírus da doença de gumboro. In: II SIMPÓSIO A DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, 2001, p. 94 – 101.

ISMAIL, N.M., SAIF, Y.M. Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. **Avian Disease**, v. 35, p. 460-469, 1991.

JACKWOOD, D.H.; SAIF, Y.M.; HUDGES, H.J. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. **Avian Disease**, v. 31, p. 370-375, 1987.

JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. **Avian Disease**, v. 43, p. 310-314, 1999.

JACKWOOD, D.J.; SREEDEVI, B.; LEFEVER, L.J.; SOMMER-WAGNER, S.E. Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. **Virology**, v. 377, p. 110-116, 2008.

JOEHENS, C.E.A.; VAN DER VALK, J.B.F.; STAFLEU, F.R.; BAUMANS, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? **ATLA**, v. 30, p. 219-227, 2002.

KALLEL, H.; JOUINI, A.; MAJOUL, S.; ROUROU, S. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 195-204, 2002.

KAUFER, I.; WEIS, E. Significance of bursa of Fabricius as target organ infectious bursal disease of chickens. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 364-367, 1980.

KIBENGGE, F.S., DHILLON, AS., RUSSEL, R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1757-1775, 1988.

KIBENGGE, F.S.; JACKWOOD, D.J.; MERCADO, C.C. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 569-577, 1990.

KING, A.A. Cell culture of rabies virus. In: MESLIN FX, KAPLAN, MM, KOPROWSKI H (Ed) *Laboratory Techniques in rabies*, 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.85-93.

KWON, M.H.; KIM, S.J. Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease virus passage in Vero cells. **Virus Genes**, v. 28, p. 285-291, 2004.

LANGE, H.; MÜLLER, H.; KÄUFER, I.; BECTH, H. Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. **Archives of Virology**, v. 92, p. 187-196, 1987.

LEE, Y.Y.; YAP, M.G.S.; HU, W.; WONG, K.T.K. Low-Glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 501-509, 2003.

LEHNER, C.F.; EPPENBERGER, H.M.; FAKAN, S.; NIGG, E.A. 1986a . Nuclear substructure antigens: monoclonal antibodies against components of nuclear matrix preparations. **Experimental Cell Research**, v.162, p.205-219, 1986a.

LEHNER, C.F.; KURER, V.; EPPENBERGER, H.M.; NIGG, E.A. The nuclear lamin protein family in higher vertebrates: identification of quantitatively minor lamin proteins by monoclonal antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p.13293-13301, 1986b.

LEHNER, C.F.; STICK, R.; EPPENBERGER, H.M.; NIGG, E.A. Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. **Journal of Cell Biology**, v.105, p.577-587, 1987.

LIM, B.L.; CAO, Y.; YU, T.; MO, C.W. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. **Journal of Virology**, v. 73, p. 2854–2862, 1999.

LIU, M.; VAKHARIA, V.N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. **Virology**, v.33., p.62-73, 2004.

LOMBARDO, E.; MARAVER, A.; ESPINOSA, I.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; RODRIGUEZ, J.F. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. **Virology**, v. 277, p. 345-357, 2000.

LUKERT, P.D.; DAVIS, R.B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell culture. **Avian Diseases**, v. 18, p. 243-250, 1974.

LUKERT, P.D.; LEONARD, J.; DAVIS, B. Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 539-540, 1975.

LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. **Infectious bursal Disease**. In: **Disease of Poultry**, 9 ed., Iowa State University Press: Ames, 1991, 929 p.

LUKERT, P.D. A doença de Gumboro nos EUA. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 1993, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, 1993, p. 36-39.

MAGAKI, T.; KURISIU, K.; OKASAKI, T. Generation of bone marrow derived neural cells in serum free monolayers culture. **Neuroscience Letters**, v. 384, p. 282-287, 2005.

MARANGA, L.; COROADINHA, AS.; CARRONDO, M.J.T. Insect cell culture medium-supplementation with fetal bovine serum and bovine serum albumin. Effects on Baculovirus adsorption and infection kinetics. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 855-861, 2002.

MARINHO, C.E.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Estudo do ciclo de replicação do vírus da doença infecciosa da bursa na linhagem celular RK-13. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 70, p. 5-9, 2003.

MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S.; KILLOP, E.R.; CONNOR, T.J.; MCCRACKEN, R.M.; COLLINS, P.S.; ALLAN, G.M. Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. **Avian Pathology**, v. 9, p. 395-404, 1980.

MCKEEHAN, W.L.; BARNES, D.; REID, L. STANBRIDGE, E.; MURAKAMI, H.; SATO, G.H. Frontiers in mammalian cell culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 99, p. 167-180, 1990.

MCNEILLY, F.; WALKER, I.; ALLAN, G.M.; ADAIR, B.M. Bursal lymphocyte proliferation in the presence of phorbol myristate acetate: effect of IBDV strain on the proliferation response. **Avian Pathology**, v. 28, p.301-304, 1999.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B. Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys. **Avian Pathology**, v. 8, p. 205-212, 1979.

MERTEN, O.W.; KALLEL, H.; MANUGUERRA, J.C.; TARDY-PANIT, M.; CRAINIC, R.; DELPEYROUX, F.; VAN DER WERF, S.; PERRIN, P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. **Cytotechnology**, v. 30, p. 191-201, 1999.

MERTEN, O.W. Development of serum free media for cell growth and production viruses/viral vaccines-safety issues of animal products used in serum-free media. **Development Biology**, v. 111, p. 233-257, 2002.

MOCHIZIKI, M. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. **Vaccine**, v. 24, p. 1744-1748, 2006.

MOUSSA, M.I.; WOOD, O. L.; ABDEL, W.K.S. Reduced pathogenicity associated with small plaque variant of the Egyptian strain of Rift Valley fever virus (ZH501). **Tropical Medicine Hygiene**, v. 76, p. 482-486, 1982.

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

MÜLLER, H.; BECHT, H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. **Journal of Virology**, v.44, p. 384-392, 1982.

MÜLLER, H.; NITSCHKE, R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000 – Da protein. **Virology**, v. 159, p. 174-177, 1987.

MÜLLER, H.; SCHNITZLER, D.; BERNSTEIN, F.; BECHT, H.; CORNELISSEN, D.; LUTTICKEN, D.H. Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 175–183, 1992.

MÜLLER, H.; ISLAM, R.; RAUE, R. Research on infectious bursal disease - the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 153-165, 2003.

MUNDT, E.; BEYER, J.; MULLER, H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. **Journal of General Virology**, v.76, p. 437-443, 1995.

MUNDT, E.; KOLLNER, B.; KRETZSCHMAR, D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. **Journal of Virology**, v. 71, p. 5647-5651, 1997.

MUNDT, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2067–2076, 1999.

NAKANO, M.; PORTUGAL, M.A.S.C.; SALIBA, A.M.; NOBRE, D.; NARIMATSU, M.N. A ocorrência de doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anatomopatológico. **Biológico**, São Paulo, v. 38, p. 60-66, 1972.

NIEPER, J.P.; TEIFKE, A.; JUNGSMANN, A.; LOHR, C.V.; MULLER, H. Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius, studied by double-labelling techniques. **Avian Pathology**, v. 28, p. 279-286, 1999.

O'CONNOR, R.; KAUFFMAN-ZEH, A.; LIU, Y.; LEHAR, S.; EVAN, G.; BARSEGA, R.; BLÄTTLER, W.A. Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p.427-435, 1997.

ÖPPLING, V.; MÜLLER, H.; BECHT, H. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. **Archives of Virology**, v.119, p. 211– 223, 1991.

PAZOS, P.; BOVERI, M.; GENNARI, A.; CASADO, J.; FERNANDEZ, F.; PRIETRO, P. Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin. **ALTEX**, v. 21, p. 67-72, 2004.

PEREIRA, M.; RYBARCZYK, B.J.; ODRLJIN, T.M.; HOCKING, D.C.; SOTTILE J.; SIMPSON-HAIDARIS, P.J.J. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 609-617, 2002.

PETEK, M.; D'APRILE, N.; CANCELLOTTI, F. Biological and physio-chemical properties of the infectious bursal disease virus. **Avian Pathology**, v. 2, p. 135-152, 1973.

PRIECE, P.J.; AND GREGORY, E.A. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of serum supplement. **In vitro**, v. 18, p. 576-584, 1982.

RASOOL, M.H.; HUSSAIN, I. Preparation and evaluation of Vero-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. **Vaccine**, v. 24, p. 2810-2814, 2006.

RINALDI, A.; LODETTI, E.; CESSI, D.; LODRINI, E.; CERVIO, G.; NARDELLI, L. Coltura del vírus de Gumboro (IBA) su fibroblast di embrioni di pollo. **Nuova Veterinaria**, v.48, p. 195-201, 1972.

RODRIGUES, O. Paradoxos da Doença Infecciosa da Bursa (DIB). **Sanidade Avícola**, ano III, n.8, p. 4-5, 2002.

ROSENBERGER, J.K.; GELB, J.JR.; Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. **Avian Disease**, v. 22, p. 95-105, 1978.

SAKODA, Y.; HIKAWA, M.; TAMURA, T.; FUKUSHO, A. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. **Journal Virological Methods**, v. 75, p. 59-68, 1998.

SAPATS, S.I.; IGNJATOVIC, J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. **Archives of Virology**, v. 145, p. 773-785, 2000.

SASAKI, T.; WIEDEMANN, H.; MATZNER, M.; CHU, M.L.; TIMPL, R.J. Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix **Journal of Science**, v. 109, p. 2895-2904, 1996.

SCHNITZLER, D.; BERNSTEIN, F.; MÜLLER, H.; BECHT, H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1563–1571, 1993.

SCHRODER, A.; VAN LOON, A.A.W.M.; GOOVAERTS, D.; TEIFKE, J.P.; MUNDT, E. VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 159-169, 2001.

SHARMA, J.M. Effect of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. **Avian Disease**, v. 28, p. 629-640, 1984.

SIMON, V.; ISHIZUCA, M. Doenças virais – Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricius – DIB. In: Berchieri JR., MACARI, M. Doença das Aves, FACTA: Campinas, 2000, 800 p, Cap.5, Item 5.5, p.301-314, 2000.

SIMONI, I.C.; FERNANDES, M.J.B.; MADEIRA, A.M.B.N.; ARNS, C.W. Propagation of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. **Virus Reviews Research**, v. 3, p. 66-69, 1998.

SIMONI, I.C.; FERNANDES, B.M.J.; CUSTÓDIO, R.M.; MADEIRA, A.M.B.N.; ARNS, C.W. Susceptibility of different cell lines to avian viruses. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 373-376, 1999.

SMILEY, J.R.; JACKWOOD, D.J. Genetic stability of the VP2 hypervariable region of four infectious bursal disease virus isolates after serial passage in specific-pathogen-free chicken embryos. **Avian Disease**, v. 45, p. 1-8, 2001.

SMITH, A.; TIGNOR, G.H.; MIFUNE T.K.; MOTOHASHI, T. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cell. **Intervirology**, v. 8, p. 92-99, 1977.

SNYDER, D.B.; LANA, D.P.; CHO, B.R.; MARQUARDT, W.W. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. **Avian Disease**, v. 32, p. 527-534, 1988.

SNYDER, D.B.; VAKHARIA, V.N.; SAVAGE, P.K. Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United State. **Archives of Virology**, v. 127, p. 89-101, 1992.

SOTTILE, J.; HOCKING, D.C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 3546-3559, 2002.

SPIES, U.; MÜLLER, H.; BECTH, H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. **Virus Research**, v. 8, p. 127-140, 1987.

SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; CAMPALANS, J.; ARNS, C.W. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. **Journal Virological Methods**, v. 131, p. 130-133, 2006.

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

STICK, R.; ANGRES, B.; LEHNER, C.F.; NIGG, E.A. The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Biology**, v.107, p.397-406, 1988.

SUNSTROM, N.A.; GAY, R.D.; WONG, D.C.; KITTCHEEN, M.A; DEBOER, L.; GRAY, P.P. Insulin-like growth factor 1 and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 698-702, 2000.

SUPERTI, F.; DERER, M.; TSIANG, H. Mechanisms of rabies virus entry into CER cells, **Journal of General Virology**, v. 65, p. 781-789, 1984.

SUPERTI, F.; GIRMENTA, C.; SEGANTI, L.; ORSI, N. Role of sialic acid in cell receptor for vesicular stomatitis virus. **Acta Virologica**, v. 30, p. 8-10, 1986.

SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; ORSI, N. Effect of cellular inhibitors on the infection of various susceptible cells with vesicular stomatitis. **Acta Virologica**, v. 32, p. 487-493, 1988.

TANTAWI, H.H.; ZAGHLOUL, T.M.; ZAKARIA, M. Poxvirus infection in rat (*Rattus norvegicus*) in Kuwait. **International Journal Zoonoses**, v. 10, p. 28-32, 1983.

TOROGHI, R.; KATARIA, J.M.; VERMA, K.C.; KATARIA, R.S.; TIWARI, A.K. Amino acid changes in the variable region of VP2 in three infectious bursal disease viruses with different virulence, originating from a common ancestor. **Avian Pathology**, v. 30, p. 667-673, 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VAN DEN BERG, T.P. Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: a Review. **Avian Pathology**, v. 29, p. 175-194, 2000.

VAN DEN BERG, T.P.; MORALES, D.; ETERRADOSSI, N.; RIVALLAN, G.; TOQUIN, D.; RAUE, R.; ZIERENBERG, K.; ZHANG, M.F.; ZHU, Y.P.; WANG, C.Q.; ZHENG, H.J.; WANG, X.; CHEN, G.C.; LIM, B.L.; MÜLLER, H. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. **Avian Pathology**, v. 33, p. 470-476, 2004.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; FISCHER, R.; GRUBER, F.; GSTRATHALER, G.; HELLEBREKERS, L.; HYLLNER, J.; JONKER, F.H.; PRIETO, P.; THALEN, M.; BAUMANS, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 1-12, 2004.

VAN LOON, A.A.W.M.; HAAS, N.; ZEYDA, I.; MUNDT, E. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chicken. **Journal of General Virology**, v.83, p. 121-129, 2002.

VEILLEUX, N.; SPECTOR, M. Effects of FGF 2 and IGF 1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen glycosaminoglycan scaffolds in vitro. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, p. 278-286, 2005.

VON EINEM, U.I.; GORBALENYA, A.E.; SCHIRRMIEIER, H.; BEHRENS, S.E.; LETZEL, T.; MUNDT, E. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2221-2229, 2004.

WU, C.C.; RUBINELLI, P.; LIN, T.L. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. **Avian Disease**, v. 51, p. 515-526, 2007.

WYETH, P.J. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. typhimurium* and *E. coli* infectious. **Veterinary Record**, v. 96, p. 238-243, 1975.

YAMAGUCHI, T.; KONDO, T.; INOSHIMA, Y.; OGAWA, M.; MIYOSHI, M.; YANAI, T.; MASEGI, T.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. **Avian Diseases**, v. 40, p. 501– 509, 1996a.

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. **Virology**, v. 223, p. 219–223, 1996b.

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

ZHENG, X.; HONG, L.; SHI, L.; GUO, J.; SUN, Z.; ZHOU, J. Proteomics analysis of host cells infected with infectious bursal disease virus. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 612-625, 2008.