



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José do Rio Preto

Dissertação de Mestrado

DERIANE ELIAS GOMES

**Aspectos da patogenia e análise da variabilidade da
glicoproteína S do *Coronavirus dos Perus* isolado no
Brasil**

São José do Rio Preto

2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Dissertação de Mestrado

DERIANE ELIAS GOMES

**Aspectos da patogenia e análise da variabilidade da
glicoproteína S do *Coronavirus dos Perus* isolado no
Brasil**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp -
Campus de São José do Rio Preto como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Área de Concentração: Virologia

São José do Rio Preto - SP

2009

Gomes, Deriane Elias.

Aspectos da patogenia e análise da variabilidade da glicoproteína S do *Coronavirus dos Perus* isolado no Brasil / Deriane Elias Gomes. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

65 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Coronavírus. 3. *Coronavirus dos Perus* I. Cardoso, Tereza Cristina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 578.834



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José do Rio Preto

Dissertação de Mestrado

DERIANE ELIAS GOMES

**Aspectos da patogenia e análise da variabilidade da
glicoproteína S do *Coronavirus dos Perus* isolado no
Brasil**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso
UNESP-Araçatuba

Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro
UNESP-Jaboticabal

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP-São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 22 de dezembro de 2009.

Dedico aos meus amores, Adrieene L. Elias e

Ademir B. de Oliveira.

Agradecimentos

Em especial dedico a minha gratidão:

A essa força superior a qual chamamos de **DEUS** por ter me dado força, coragem e perseverança para superar as dificuldades encontradas no decorrer de toda minha vida acadêmica.

Agradeço à minha orientadora Tereza Cristina Cardoso da Silva pela atenção e preocupação com meu desenvolvimento acadêmico durante minha graduação, por todas as atividades que desenvolvemos juntas durante os vários anos de convivência e por aceitar o desafio de me orientar neste mestrado colaborando mais uma vez para minha formação, e me estimulando a aprender sempre.

Agradeço à minha mãe, pela luta incessante, incansável e imensurável pelo meu bem-estar, sacrificando-se, muitas vezes, para assegurar que minha formação não fosse interrompida, nunca. Agradeço os ensinamentos, o zelo o pulso firme, a presença, o carinho e o amor.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Alexandre Lima de Andrade e Profa. Maria Cecília Rui Luvizotto, esta que além das sugestões, participou ativamente deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa de mestrado, Profa. Fátima Pereira de Souza e Profa. Maria da Glória Buzinaro deixo os meus sinceros agradecimentos pela correção

desta dissertação.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Virologia Animal Ane Franciele Tapparo, Ana Carolina Guedes Rosa, Camila da Silva Frade e Heitor Flávio Ferrari, pelo companheirismo, o espírito de equipe e a amizade que nos une.

À Gilmara Castilho, pelos anos de amizade, pelo ombro sempre à disposição.

A todos os estagiários do Laboratório de Virologia Animal, em especial à Isabela Fortuna Gasparello, Karina Yukie Hirata e Leonardo Cárdia Caserta

A todos meus professores pela dedicação e ensinamentos, os quais colaboraram para minha formação profissional e 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, essencial para o desenvolvimento deste trabalho e, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

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

*“Os conceitos e os princípios fundamentais da ciência são
invenções livres do espírito humano.”*

(Albert Einstein)

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só
deve ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

No últimos anos, a avicultura brasileira posicionou o país como o terceiro maior produtor mundial de perus, entretanto o setor permanece em acentuado crescimento e tem uma grande importância econômica, movimentando cerca de 10 milhões de dólares por ano. A indústria avícola brasileira obteve novos mercados, mostrando novas perspectivas no comércio internacional. O *Coronavirus dos Perus* (*Turkey Coronavirus*, "TCoV) é um vírus envelopado, com RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronavirus* e gênero *Coronavirus* (grupo III). Trata-se de um agente causador de enterites altamente transmissíveis, gerando grandes perdas econômicas no Brasil e no mundo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de apoptose celular e a variabilidade molecular em tecidos de embriões de perus experimentalmente infectados com TCoV (primeiro isolado brasileiro, 2007). A infecção experimental foi desenvolvida por meio da inoculação viral na cavidade amniótica de embriões de perus com 23-25 dias de incubação por nove vezes consecutivas. Foi empregada a técnica de imunoistoquímica no intuito de detectar os marcadores apoptóticos Anexina V, Caspase 2, Caspase 3, p53 e ainda a detecção de apoptose com o emprego do kit TUNEL. Foi realizado o sequenciamento do vírus original e suas passagens em ovos embrionados a fim de detectar mutações decorrentes das passagens virais. O TCoV propagou em ovos embrionados de perus (*Melleagris gallopavo*) apresentando vacuolização dos enterócitos e congestão como lesões histopatológicas. A análise das lesões macroscópicas mostrou congestão moderada, acúmulo de líquidos e processo inflamatório. A apoptose foi identificada pelo uso do kit comercial TUNEL e mostrou a presença viral no intestino bem como a ocorrência de apoptose celular nos enterócitos. Os resultados demonstraram marcação positiva para Anexina V, Caspase 2, Caspase 3, p53, exatamente como descrito por outros autores para outros *Coronavirus*. Analisando as sequências foi detectada a ocorrência de três mutações nunca descritas e 19 mutações de ocorrência comum no TCoV. Por fim, a presente investigação é de extrema importância para a sociedade científica, uma vez que suas descobertas podem abrir espaço para futuras pesquisas contribuindo para um melhor conhecimento da patogenicidade do *Coronavirus*.

Palavras chaves: *Coronavirus dos Perus* (TCoV), apoptose celular, variabilidade genética, glicoproteína S.

ABSTRACT

The Brazilian poultry industry represents third world producer of turkeys, in last years, whereas the sector is in growth and has a large economic importance moving around 10 million of dollars per year. Brazilian's industry obtained new markets, showing new perspectives into the international trade. *Turkey Coronavirus* (TCoV) is an agent that causes high transmissible enteritis, causing great economic lost, in Brazil and worldwide. It is an enveloped virus, with single strand RNA, non segmented, positive sense, belongs to *Nidovirales* order, *Coronaviridae* family and *Coronavirus* group III. The present work evaluated the apoptosis process and the molecular variety in turkey embryo tissues experimentally infected by turkey *Coronavirus* (first isolated in Brazil, 2007). The experimental infection was performed trough viral inoculation into amniotic cavity in embryonated turkey eggs with 23-25 days of incubation for nine times consecutively. Immunohistochemistry was performed to detect the apoptotic factors Annexin V, Caspase 2, Caspase 3, p53 and apoptosis detection by TUNEL kit. The sequencing of original virus and the respective passages developed to detect mutations acquired through passages. TCoV propagated in turkey eggs (*Melleagridis gallopavo*) presenting enterocytes vacuolization and congestion as histopathologic lesions. Analysis of macroscopic lesions showed mild congestion, liquid accumulation and inflammation process. The apoptosis identification performed applying the commercial kit TUNEL shown the viral presence in intestinal tissue, as well, the cellular apoptosis occurrence. The results demonstrated positive signals to annexin V, caspase 2, caspase 3 and p53, exactly how described in others authors to others *Coronavirus*. Regarding to the sequences, it was detected the occurrence of three mutations never described before and 19 mutation of common occurrence in TCoV. Finally, the present investigation is of extreme importance to scientific society, because its discoveries can open spaces to future assays contributing to a better known of *coronavirus* pathogenicity.

Key Words: *Turkey Coronavirus* (TCoV), cellular apoptosis, genetic variability, Spike Glycoprotein.

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1.1	Considerações sobre o vírus	02
1.2	Apoptose em doenças virais	12
1.2.1	Mecanismos de apoptose	19
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.2	Obtenção da amostra e infecção experimental	22
3.3	Análise histopatológica	24
3.4	Imunoistoquímica para os mediadores da apoptose	24
3.5	Técnica de TUNEL	26
3.6	Extração de RNA, RT-PCR e PCR	27
3.7	<i>Primers</i>	28
3.8	Eletroforese	29
3.9	Sequenciamento	29
3.9.1	Purificação do produto de RT-PCR	29
3.9.2	Seqüenciamento	29
3.9.3	Análise das sequências	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Infecção experimental de TCoV em ovos embrionados	33
4.1.1	Lesões macroscópicas	33
4.1.2	Lesões microscópicas	33
4.2	Imunoistoquímica para os marcadores de apoptose	35
4.3	Sequenciamento	42
4.4	Análise das sequências	43
4.5	Análise filogenética	46
5	CONCLUSÕES	52
6	REFERÊNCIAS	55
7	ANEXOS	63
7.1	Código Genético Universal	64
7.2	Legenda de Aminoácidos	65

LISTA DE FIGURAS

01	Organização genômica do <i>Turkey Coronavirus</i> .	03
02	Mecanismos extrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada.	15
03	Fluxograma de execução do trabalho.	22
04	Fotomicrografias de embriões de perus inoculados com o TCoV aos 28 dias de incubação.	35
05	Fotomicrografias apresentando marcação para as Caspases 3 e 2.	38
06	Fotomicrografias apresentando marcação para p53 e anexina V.	39
07	Aspectos observados nos cortes de intestinos de perus obtidos após a infecção com o TCoV para o processo de apoptose pela técnica de TUNEL	41
08	Alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas a partir da amplificação da região S2	43
09	Árvore filogenética gerada pelo método de Neighbor Joinning com Bootstrap de 1000 réplicas nos programas Clustaw X e ME	48

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01	Proteínas não estruturais formadas após a clivagem da poliproteína 1a 1b e suas funções.	05
Tabela 01	Primers empregados na amplificação da Glicoproteína S.	28
Tabela 02	Relação de sequências de <i>Coronavirus</i> utilizadas nas análises de variabilidade e filogenética	31
Tabela 03	Relação das mutações em aminoácidos presente as passagens de <i>Turkey Coronavirus</i>	46
Tabela 04	Porcentagem de identidade entre as sequências.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAX	Bcl-2 associated X protein
BCoV	Coronavírus Bovino
BID	BH3 interactin domain death agonist
BSA	Albumina Sérica Bovina
CY3	Cyanine Dye
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Microscopia Eletrônica
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GE	General Electric Health Care
HA	Hemaglutinação
HCoV 229E	<i>Coronavirus</i> Humano isolado 229E
HCoV OC43	<i>Coronavirus</i> Humano isolado OC43
HE	Hematoxilina-Eosina
HI	Inibição da Hemaglutinação
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa
IFA	Imunofluorescência Indireta
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney Cells
MEM	Meio Essencial Mínimo
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
NC-95	TCoV estirpe Carolina do Norte
ORF	Região de Leitura Aberta
pb	Pares de base

PBS	Solução Tamponada de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PEMS	Síndrome da Enterite e Mortalidade dos Perus
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Propidium iodide
PIB	Produto Interno Bruto
rpm	Rotação por Minuto
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Severa
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilssulfato de Sódio
TCoV	Coronavírus dos Perus
TGEV	Vírus da Gastroenterite Transmissível
TNF	Fator de Necrose Tumoral
U/ μ L	Unidades por microlitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
VN	Vírus Neutralização

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Considerações sobre o vírus

O gênero *Coronavirus* pertence à família *Coronaviridae*, da ordem *Nidovirales* (LIU et al., 2005; STEPHENSEN et al., 1.999). *Coronavirus* são pleomórficos, envelopados, com diâmetro variando entre 140-150nm, e espículas superficiais de aproximadamente 20nm (LOA, et al., 2006; LIU et al., 2005; LIN et al., 2004; GUY, 2000; BRESLIN, et al., 1999a; BRESLIN et al., 1999b) as quais são responsáveis por um aspecto de coroa solar da partícula viral quando observado a microscopia eletrônica (LIN, et al., 2002). O genoma, com 27 kb, é composto por RNA linear, não segmentado (LIU et al., 2005; STEPHENSEN et al., 1.999; VERBEEK & TIJSSEN, 1991), de fita simples e sentido positivo, com CAP na extremidade 5' e cauda poliadenilada na extremidade 3' (CAO, et al., 2008a; CAO, et al., 2008b; GOMAA et al., 2008a; LIU et al., 2005; LOA et al., 2004; LIN et al., 2002; GUY, 2000).

Coronavius são divididos em três grupos, com base em caracterização genotípica e sorológica (WOO et al., 2009, GOMAA et al., 2008a). Os grupos I e II contem vírus de mamíferos, enquanto o grupo III é composto por *Coronavirus* aviários (BRESLIN et al., 1999a). O grupo I compreende o *Coronavirus* Humano (HCoV 229E), Virus da Gastroenterite Transmissível (TGEV), Coronavírus Canino e Peritonite Infecciosa Felina. O virus da Hepatite Murina, *Coronavirus* Humano (HCoV OC43) e *Coronavirus* Bovino

(BCoV) são alguns dos membros do grupo II (VELAYUDHAN et al., 2003; CAVANAGH et al., 2001; BRESLIN et al., 1999b). O grupo III foi inicialmente composto pelo Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) e *Coronavirus* dos Perus (TCoV). Recentemente diversos *Coronavirus* de aves tem sido descritos e adicionados a este grupo como codornas (CIRCELLA et al, 2007) e faisões (CAVANAGH, 2002).

A organização genômica do TCoV é 5'UTR-Replicase-S-3-E-M-5-N-3'UTR-poliA, conforme representado na figura 01.



Figura 01: Organização genômica do *Coronavirus* dos Perus, caracterizada por uma região não traduzida na extremidade 5' (5'UTR), seguida dos genes da replicase (gene 1), glicoproteína S (Spike, gene 2), genes 3a, 3b e 3c (proteína E, Envelope Viral), proteína de Matriz (gene 4), genes 5a e 5b, proteína do Nucleocapsídeo (gene 6) e outra região não traduzida na extremidade 3' (3'UTR).

O genoma dos *Coronavirus* é dividido em duas porções, a porção 5' proximal do genoma está envolvida na tradução de uma poliproteína não estrutural, responsável pelo processamento e replicação do genoma e pela transcrição de RNAs mensageiros subgenômicos (GOMAA et al., 2008a). A porção 3' terminal é responsável pela síntese das proteínas estruturais (GOMAA et al., 2008a). As três proteínas estruturais são a Spike

(S; 90-180 kD), a proteína de matriz (M; 20-35 kD) e a proteína do nucleocapsídeo (N; 50-60kD) (CAO *et al.*, 2008a; GOMAA *et al.*, 2008a; GOMAA *et al.*, 2008b; LOA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2004; VELAYUDHAN *et al.*, 2003; GUY, 2000; BRESLIN *et al.*, 1999a; BRESLIN *et al.*, 1999b; STEPHENSEN *et al.*, 1999). Um quarto tipo de proteína, a Hemaglutinina-Esterase (HE) está presente em alguns membros do grupo II (GOMAA *et al.*, 2008b; VELAYUDHAN *et al.*, 2003), não ocorrendo nos *Coronavirus* aviários (grupo III), sendo, desta forma, um dos critérios para a separação do grupos.

A região 5'UTR é representada por uma sequência correspondente a 428 aminoácidos, muito conservada e rica em GC (Citosina-Guanina) na extremidade 5' do genoma (GOMAA *et al.*, 2008a). Imediatamente em seguida encontra-se o gene 1, de aproximadamente 19 kb, que possui duas ORFs (1a e 1b) e expressa uma poliproteína que é clivada em 16 produtos na maioria dos *Coronavirus* (CAO *et al.*, 2008a; CAO *et al.*, 2008b; WOO *et al.*, 2009; GOMAA *et al.*, 2008a), porém IBV e TCoV caracterizam-se por apresentarem 15 proteínas não estruturais (GOMAA *et al.*, 2008a), como demonstrado na quadro 01.

Quadro 01. Proteínas não estruturais formadas após a clivagem da poliproteína 1a 1b e suas funções.

NSPS	Abrev.	Nome	Função	Autores
NSP1	P87		Inexistente em IBV e TCoV. Perdida durante a evolução viral.	GOMAA et al., 2008 ^a
NSP2	P87		Desconhecida	GOMAA et al., 2008 ^a
NSP3	PL ^{pro}	Protease tipo Papaína	Clivagem da poliproteína 1a1b.	GOMAA et al., 2008a; WOO et al., 2008; CAO et al., 2008a;
NSP4	HD	Domínio Hidrofóbico	Acredita-se que compõem um domínio transmembrana hidrofóbico que desempenha um papel importante no processo de replicação e tradução.	GOMAA et al., 2008a
NSP5	3CLP	Protease tipo Quimiotripsina 3	Clivagem da poliproteína 1a1b . Compõem, juntamente com nsps 4 e nsps 6, um domínio transmembrana hidrofóbico que desempenha um papel importante no processo de replicação e tradução.	GOMAA et al., 2008a; WOO et al., 2008; CAO et al., 2008a; CAO et al., 2008b
NSP6	HD	Domínio Hidrofóbico	Compõem, juntamente com nsps 3 e nsps 5, um domínio transmembrana hidrofóbico que desempenha um papel importante no processo de replicação e tradução.	GOMAA et al., 2008 ^a
NSP7			Desconhecida	
NSP8			Desconhecida	
NSP9			Desconhecida	
NSP10	GFL	Domínio tipo Fator de Crescimento	É rico em cisteína e histidina e compõe um domínio ligante de metal.	GOMAA et al., 2008 ^a
NSP11			Pequeno peptídeo de 23 aa que cliva o produto C-terminal de 1a.	GOMAA et al., 2008a;
NSP12	RdRp	RNA polimerase dependente de RNA	Replicação e Transcrição genômica.	GOMAA et al., 2008a; WOO et al., 2009; CAO et al., 2008a; CAO et al., 2008b
NSP13	Hel	Domínio NTPase / Helicase	Desenrola o RNA dupla fita para replicação genômica.	GOMAA et al., 2008a; WOO et al., 2009; CAO et al., 2008a; CAO et al., 2008b
NSP14	Exon N	Exoribonuclease	Associado ao metabolismo de RNA como recombinação e rearranjo.	GOMAA et al., 2008a; CAO et al., 2008 ^a

NSP15	Nendo	Endorribonuclease específica para uridilato	Cliva RNA dupla fita em sequências contendo uridilato, atividade essencial para produção da progênie viral.	GOMAA et al., 2008a; CAO et al., 2008a; CAO et al., 2008b
NSP16	MT	2'-O-ribose-metiltransferase	Aividade Metiltransferase.	GOMAA et al., 2008a; CAO et al., 2008a; CAO et al., 2008b

NSP: Proteína Não Estrutural

O gene 2 expressa a glicoproteína S (Spike), cuja sequência nucleotídica é a mais variável em todo o genoma (GOMAA et al., 2008a; LOA et al., 2006) e suas projeções são grandes dão o aspecto característico de coroa solar ao vírion (LOA et al., 2004). Possui aproximadamente 3,6 kb e é clivada em duas subunidades S1 (N-terminal) e S2 (C-terminal) no sítio composto por Arg-Arg-Ser localizado entre o aminoácido 542 e 543 (GOMAA et al., 2008a). A subunidade S2 forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios. A subunidade S1 forma o bulbo da proteína S, é mais variável que a subunidade S2 e apresenta a função biológica de ligação do vírus às células pela fusão do envelope viral com a superfície celular (CAVANAGH, 2005). Por formar o bulbo da proteína S, a subunidade S1 contém a maior parte de sítios antigênicos, portanto o segmento do genoma que a codifica é mais exposto a pressões seletivas imunológicas e, sendo assim mais propenso ao encontro de polimorfismo que os demais genes e proteínas dos *Coronavirus*.

A glicoproteína S contém neutralizantes e/ou epítomos grupo específicos (LOA et al., 2006a; LOA et al., 2006b) e é responsável pela ligação ao receptor e, consequente, fusão do vírus à membrana celular do hospedeiro (GOMAA et al., 2008a). Também é

responsável pela virulência e o tropismo por tecidos específicos (VERBEEK & TIJSSEN, 1991).

Um gene monocistrônico e um gene dicistrônico codifica a proteína do envelope (E) nos grupos I e II, respectivamente (CAVANAGH et al., 2001). No grupo III, onde se insere o TCoV, este gene é tricistrônico e a proteína E é codificada pela terceira Região de Leitura Aberta (Open Reading Frame – ORF) do gene (3c) (LOA et al., 2006; LOA et al., 2004; CAVANAGH et al., 2001). A proteína E é uma porina que desempenha papel importante na permeabilidade celular (GOMAA et al., 2008a).

As proteínas M e N são altamente conservadas entre as diferentes espécies (GOMAA et al., 2008a; LOA et al., 2006a; LOA et al., 2006b). A proteína da Matriz pode estar relacionada na patogênese viral (VERBEEK & TIJSSEN, 1991). A proteína do Nucleocapsídeo é a única que não fica aderida à membrana bilipídica do hospedeiro (VERBEEK & TIJSSEN, 1991), é altamente imunogênica e compõe a estrutura do nucleocapsídeo viral (LOA et al., 2004).

O gene 5 é dicistrônico, possuindo duas ORFs (GOMAA et al., 2008a), que também é considerado uma peculiaridade dos CoVs do grupo III (LOA et al., 2004; CAVANAGH, 2001). À semelhança do gene 3, o gene 5 não tem suas funções bem esclarecidas. Sabe-se que não são essenciais à replicação viral e especula-se que possam desempenhar um papel importante na patogênese de *Coronavirus* de espécies aviárias (LIN et al., 2004).

A região 3'UTR está localizada próxima ao gene 6 (Nucleocapsídeo), é altamente conservada e apresenta importância na diferenciação das principais estirpes, uma vez que Indiana e Minnesota apresentam 502 nucleotídeos, enquanto NC95 apresenta 349 (GOMAA et al., 2008a; BRESLIN et al., 1999b). Esta região é importante na iniciação da síntese da fita negativa de RNA (BRESLIN et al., 1999b).

TCoV acomete preferencialmente perus jovens na segunda semana de vida causando desidratação (LIN et al., 2002), enterite aguda, diarreia, anorexia, penas arrepiadas, redução de ganho de peso, redução de crescimento (LOA et al., 2006; VILLARREAL et al., 2006; LOA et al., 2004; VELAYUDHAN et al., 2003; LOA et al., 2002c; LIN et al., 2002; CAVANAGH et al., 2001; LIN et al., 2001; LOA et al., 2001), resultando em perda econômica devido a baixa conversão alimentar (LOA et al., 2006; GUY, 2000), morbidade variável e alta mortalidade (VELAYUDHAN et al., 2003).

A enterite causada por coronavírus foi responsável pelo surto em perus de maior importância no estado norte-americano de Washington na década de 40 (CAVANAGH et al., 2001) e em Minnesota entre os anos de 1.951 e 1.971, sendo erradicada em 1.976. Reapareceu em Indiana em 1.996, no estado de Carolina do Norte em 1.997 (LOA et al., 2006a; LOA et al., 2006b; VELAYUDHAN et al., 2003; LIN et al., 2002, CAVANAGH et al., 2001) e em outros estados norte-americanos no mesmo período (LOA et al., 2006; LIN et al., 2002), bem como em Quebec, no Canadá (GOMAA et al., 2008a). As principais estirpes de TCoV receberam o nome dos estados americanos onde ocorreram os

primeiros surtos, ou seja, Minnesota, Indiana e Carolina do Norte.

O *Coronavirus* dos perus também tem sido designado como um dos agentes causais da Síndrome da Enterite e Mortalidade dos Perus (Poultry Enteritis and Mortality Syndrome – PEMS). A PEMS é considerada uma doença ocasionada por co-infecção, que inclui vírus e bactérias enteropatogênicas, como o TCoV, Turkey Astrovírus, Adenovírus, Rotavírus, Reovírus (VILARREAL et al., 2006), *Escherichia coli* (VILARREAL et al., 2006; CAVANAGH et al., 2001), e *Salmonella* spp. (VILARREAL et al., 2006).

A disseminação do vírus ocorre por meio do movimento de pessoas, veículos e equipamentos (CALIBEO-HAYES et al., 2002) nos criatórios de perus e acredita-se que alguns insetos possam atuar como vetores mecânicos como é o caso do besouro *Alphitobius diaperinus* (WATSON et al., 2000) e a mosca *Musca domestica* (CALIBEO-HAYES et al., 2002). A transmissão mecânica em insetos pode ocorrer de duas formas, o agente pode ser transportado na cutícula ou exoesqueleto do inseto ou pode ser ingerido pelo inseto sendo eliminado ainda em formas viáveis (WATSON et al., 2000). Desta forma, a prevenção e o controle se tornam difíceis exigindo a implementação de normas rígidas de biossegurança e medidas agressivas durante os surtos como desocupação e descontaminação das instalações (CALIBEO-HAYES et al., 2002), uma vez que não há vacinas ou medicamentos efetivos para prevenir a doença (LOA et al., 2006a; LOA et al., 2006b; LOA et al., 2002b, LOA et al., 2002c).

Segundo Lin et al. (2002), as infecções por TCoV causam rápidas mudanças no

epitélio da mucosa intestinal dos perus. As maiores alterações são o aspecto granuloso das células epiteliais, perda das microvilosidades, marginação da cromatina nuclear, diminuição da celularidade da lâmina própria (VILLARREAL et al., 2006; LIN et al., 2002) hiperativação das células das glândulas intestinais, descamação das células epiteliais, exsudação mucosa e edema da submucosa (CASTANHEIRA et al., 2007). Estas alterações na mucosa causam diminuição da absorção intestinal e acúmulo de fluido e gases na luz intestinal, que resultam em diarreia (VILLARREAL et al., 2006; LIN et al., 2002).

O tropismo estrito do TCoV por epitélio intestinal e epitélio da bursa de Fabrício é uma diferença biológica importante entre TCoV e IBV. Muitas estirpes enterotrópicas de IBV têm sido identificadas, entretanto todas elas replicam *in vivo* em epitélio respiratório e intestinal (GUY, 2000). TCoV e IBV também apresentam outras diferenças importantes em relação ao crescimento *in vitro*. O IBV pode ser propagado em membrana ou cavidade alantóica de ovos embrionados de galinha ou ainda crescer em culturas celulares de galinha. O TCoV não apresenta esta característica, ele tem sido propagado em ovos embrionados de perus através de inoculação na cavidade amniótica (LOA et al., 2002; CAVANAGH et al., 2001; GUY, 2000; BRESLIN et al., 1999), apresentado crescimento nas células do epitélio intestinal (enterócitos da porção superior da vilosidade intestinal) e epitélio da bursa de Fabrício (epitélio folicular e interfolicular) (CAVANAGH et al., 2001; GUY, 2000). Diversas tentativas de propagação do TCoV em cultivo celular contínuo

foram realizadas. Foi descrita, por Dea et al. (1990) e Verbeek e Tijssen (1991), a propagação de TCoV em células HRT-18, células estas, derivadas de adenocarcinoma retal humano, porém estudos posteriores não obtiveram sucesso em repetir tal propagação (LOA et al., 2002; GUY, 2000; BRESLIN, 1999a).

A detecção do *Coronavirus* diretamente do tecido intestinal tem sido realizada através da microscopia eletrônica (EM), imunofluorescência indireta (IFA), ELISA (LOA et al., 2006b; CASTANHEIRA et al., 2007; VELAYUDHAN et al., 2003; BRESLIN et al., 1999) e técnicas moleculares como RT-PCR e PCR multiplex (CASTANHEIRA et al., 2007; CAVANAGH et al., 1997). A determinação das diferenças antigênicas é realizada por meio da EM, inibição da hemaglutinação (HI) e vírus neutralização (VN) (BRESLIN et al., 1999).

A enterite dos perus associada ao *Coronavirus* tem sido causa de grandes perdas econômicas aos produtores de perus (LOA et al., 2006; LOA et al., 2002b; LOA et al., 2001). A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência no âmbito nacional e internacional. Nesse sentido, o agronegócio avícola brasileiro movimenta em torno de 10 bilhões de dólares ao ano, representando quase 2% do PIB do país, além de empregar milhões de pessoas direta e indiretamente. A produção de perus vem crescendo nos últimos anos de maneira acentuada, demonstrando um acréscimo de 23% em 2005 sobre a produção de 2002. Em um estudo econômico mais recente, concluíram que foram destinadas para o mercado interno 161 mil toneladas de

carne de perus do total produzido e para o mercado externo 110,4 mil toneladas, gerando uma receita cambial de US\$ 152,3 milhões decorrentes das exportações (AVISITE, 2006).

Em face da não sazonalidade do consumo de seus subprodutos, o Brasil consolidou a posição de segundo maior produtor e exportador de perus, sendo superado apenas dos Estados Unidos, sendo responsável por 5,1% da produção mundial. No aspecto de comercialização internacional, o país abriu novos e importantes mercados, criando novas perspectivas de crescimento e participação no cenário mundial (AVISITE, 2006).

1.2. Apoptose em doenças virais

Inúmeros vírus possuem como parte do seu arsenal a habilidade de modular as principais etapas dos processos de morte celular programada, ou apoptose. Esta se caracteriza como um processo fisiológico importante para eliminação de células danificadas que não podem ser recuperadas (SUZUKI et al., 2008). Diante desta constatação, é extraordinário pensar que um microrganismo com estrutura físico-química simples pode regular os processos líticos celulares em seu favor. Os vírus já demonstraram ao longo dos séculos, a alta capacidade de regular integralmente o sistema de defesa celular do hospedeiro, fato exemplificado pelas epidemias de AIDS, Pneumonia asiática (SARS), poliomielite e varíola. Certos vírus possuem a habilidade de

induzir apoptose celular, especialmente os vírus de RNA, incluindo a família *Coronaviridae*. Nesse sentido, a apoptose induzida por vírus trata-se de um processo complexo e importante na patogênese de infecções virais. Ela pode ser prejudicial ao hospedeiro, e ocorre comumente em infecções virais líticas.

Vários *Coronavirus*, que ocorrem nos animais e no homem, promovem uma infecção lítica aguda e a morte celular é ocasionada por apoptose, desse modo, a apoptose pode representar o mecanismo de injúria celular induzida pelo *Coronavírus* (RUGGIERI et al., 2007). Embora a morte celular apoptótica limite a distribuição do vírus, a mesma é prejudicial às células infectadas ao promover a destruição celular e tissular. Desse modo, quando o *Coronavírus* está associado à gastroenterites, a apoptose de células da mucosa epitelial pode estar envolvida na patogenia induzida pela infecção por *Coronavírus* (RUGGIERI et al., 2007), o que torna relevante o estudo dos mecanismos de indução de apoptose pelo TCoV para uma melhor compreensão de sua patogenia.

Neste sentido, a maioria dos processos bioquímicos que ocorrem durante o processo de apoptose celular é mediado por proteases, e as mais importantes são as denominadas caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*), que são capazes de catalizar etapas da morte celular devido à clivagem de substratos em sítios específicos contendo ácido aspártico (LIU et al., 2001). Já foram descritos inúmeros modelos virais que utilizam esse mecanismo, e mais recentemente, para a SARS (BORDI et al., 2006). Atualmente já foram descritos 13 tipos distintos de caspases nos mamíferos,

caracterizados por uma absoluta especificidade enzimática pelos seus substratos, principalmente os que possuem aspartato em sua composição bioquímica. As caspases descritas nos processos de apoptose são: 2, 8, 9, 10, e 12 (iniciadoras), assim como 3, 6, 7, e 14 (efetoras). As caspases 1, 4, 5 e 11 possuem atividade inflamatória (JONES et al., 2000). A ativação deste mecanismo depende basicamente de dois caminhos, intrínseco e extrínseco, como ilustra a Figura 2.

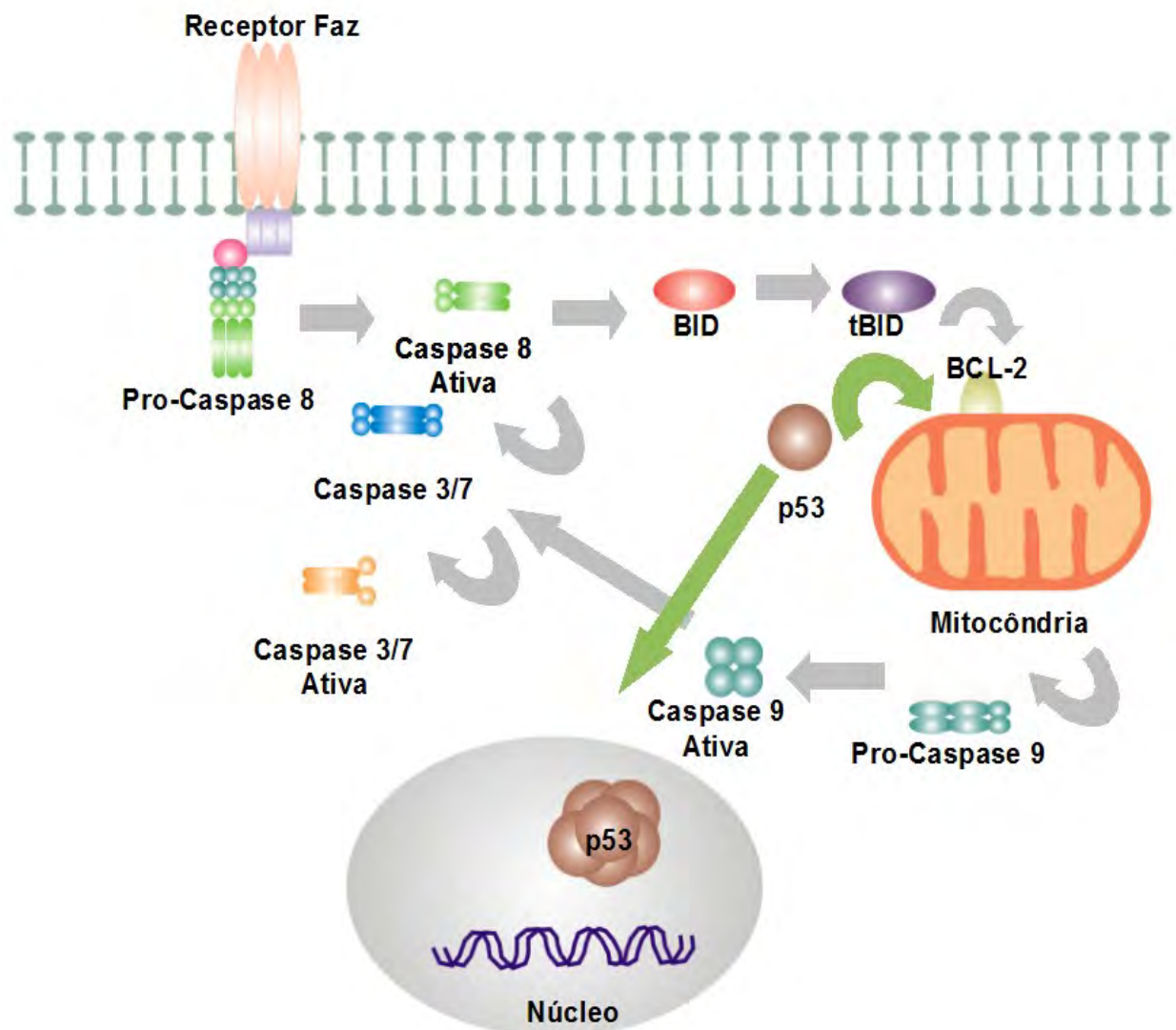


Figura 02: Mecanismos extrínsecos de morte celular programada. Sinais de estresse convergem para p53 e ativam várias proteínas cinases e/ou acetiltransferases, que fosforilam ou acetilam p53, respectivamente. Estas modificações pós-transcricionais geralmente resultam em estabilização e ativação de p53 no núcleo, onde p53 interage com sequências específicas de DNA ligando-se à regiões de genes alvos. A ativação transcricional conduz a diversas respostas celulares como apoptose, parada do ciclo celular ou reparo do DNA. P53 ainda pode agir fora do núcleo induzindo apoptose através da ligação com a proteína anti-apoptótica BCL-2.

1.2.1. Mecanismos de apoptose

* **Mecanismo extrínseco:** Geralmente ocorre pela ativação de receptores de morte celular na sua maioria mediado pelo fator de necrose tumoral (TNF). Essa ligação, como ilustra a figura 02 resultam em complexos de sinalização para induzir a morte celular, ativando pro-caspase 8 que após a clivagem gera a caspase 8, que ativa diretamente a caspase 3 (JONES et al., 2000).

* **Mecanismo intrínseco:** Ocorre geralmente pela translocação de componentes pro-apoptose, como as moléculas de BCL-2, Bid e/ou Bax, no interior das mitocôndrias levando a alteração de permeabilidade da membrana citoplasmática iniciando o processo de morte celular programada (JONES et al., 2000).

O *Coronavírus* induz apoptose via caspase-dependente, a qual é ativada pela interação entre a proteína viral e a superfície celular e pode ser detectada pela mensuração da atividade da caspase em células infectadas com o vírus (SUZUKI et al., 2008). Suzuki et al. (2008) e Ruggieri et al. (2007) observaram aumento da atividade da caspase em células infectadas com *Coronavírus* eqüino (ECoV) e canino (CCoV), respectivamente.

Pantin-Jackwood et al. (2007) utilizaram a técnica de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP nick end labelling) com sucesso para a detecção de apoptose induzida por *Reovírus*, em que observaram aumento da marcação

de apoptose na bursa de Fabricius de perus inoculados com o vírus, quando comparados com o grupo controle negativo. Además, foi descrito que BCL-2 inibe a ativação da caspase pela indução do processo de infecção viral ocasionado pelo Coronavirus humano (grupo IV). A conclusão foi que o processo de infecção não foi alterado pela prevenção apoptose, o que sugere que o *Coronavirus* grupo IV é capaz de infectar e multiplicar independente do processo de morte celular ativado ou suprimido (BORDI et al., 2006).

Recentemente foi descrito que a presença do polipeptídeo p53, oriundo do gene protetor (P53) do processo de apoptose celular, com função de reparação dos danos ao DNA celular, não depende do processo de infecção viral pelo IBV (Infectious bronchitis virus) (LI et al., 2007). Os mesmos autores concluíram que o processo de morte celular programada ocorre nas células infectadas por um período maior, independente da presença do p53.

Alterações da membrana plasmática, com translocação da fosfatidilserina do interior da célula para a superfície externa da membrana plasmática é um indício de estágios iniciais de apoptose (VERMES et al., 1995; RUGGIERI et al., 2007). Essa condição pode ser detectada por marcação do tecido com Anexina V, a qual possibilita identificar e quantificar células apoptóticas.

As anexinas pertencem às classes de proteínas dependentes de cálcio para sua ligação, normalmente envolvidas nos processos de exocitose, inibição da proteína kinase C e canais de cálcio das células eucariotas. Durante os estágios iniciais da morte celular

programada, os compostos de fosfatidilserina, normalmente encontrados no lado citoplasmático das membranas celulares, são translocados da face interior para a face exterior, expondo dessa forma a Anexina V. Ainda, o uso concomitante do corante fluorescente nuclear iodeto de propídio (PI) permite verificar alterações nucleares características dos estágios finais de apoptose. Quando examinadas à microscopia de fluorescência, as células revelam aspectos morfológicos característicos de células apoptóticas. Em estudos recentes, células infectadas com o *Coronavírus* apresentaram marcação positiva com Anexina V, sugerindo que a infecção por *Coronavirus* induz alterações de membrana características de células apoptóticas (RUGGIERI et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Realizar a infecção experimental do *Coronavirus* dos Perus a partir do vírus isolado de amostras positivas no Brasil, por inoculação na cavidade amniótica de embriões de perus com 23 a 25 dias de incubação;

2.2. Avaliar a patogenia da infecção experimental do *Coronavirus* dos Perus por meio dos marcadores de apoptose Caspase 2, Caspase 3, Anexina V, p53 e o teste de TUNEL (Invitrogen™);

2.3. Avaliar a variabilidade genética do gene 2, codificante da Glicoproteína S (subunidades S1 e S2) do *Coronavirus* dos Perus;

2.4. Sequenciar os produtos de RT-PCR e analisar as sequências obtidas do material original e das passagens consecutivas (n=9), comparando-as com as sequências de aminoácidos dos *Coronavírus* de perus catalogados até o momento com o isolado brasileiro;

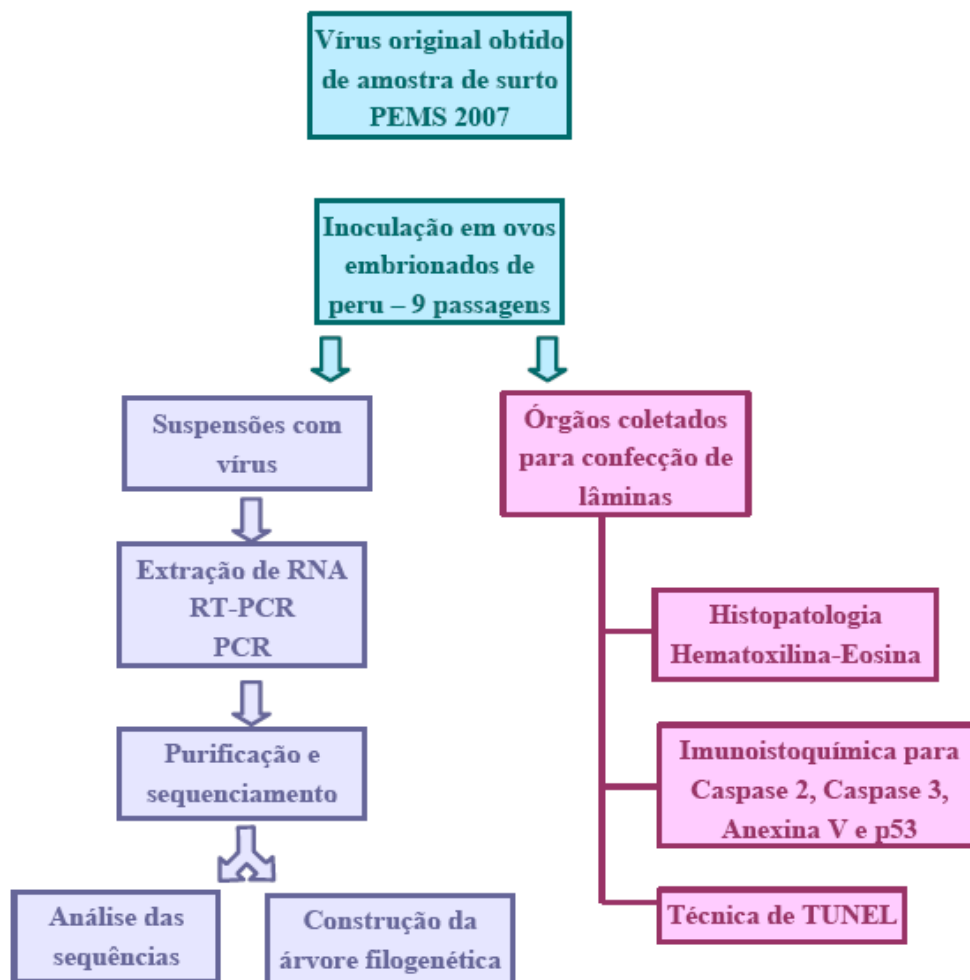
2.5. Construir a árvore filogenética utilizando o gene da glicoproteína S do material original, o material das passagens e as sequências já catalogadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma de execução do trabalho

Figura 03: Fluxograma de execução de trabalho.



3.2. Obtenção da amostra e infecção experimental.

As amostras foram provenientes de um surto de PEMS ocorrido no ano de 2007 na região sudeste, sendo as coletas realizadas pelo médico veterinário Sérgio Eustáquio

Lemos da Silva. Para o isolamento viral fragmentos da junção íleo-cecal (região onde ocorre maior replicação viral segundo Cardoso et al., 2008) e fezes de perus, com até 30 dias de idade apresentando quadro característico de PEMS.

A amostra do vírus original foi selecionada ao acaso entre as amostras positivas detectadas por Teixeira et al. (2007). Esta foi empregada no isolamento viral e o vírus isolado foi utilizado para a infecção experimental (vírus original).

A suspensão contendo o vírus original foi pré-filtrada em filtros de seringa de 0.45µm, e em seguida em filtros de 0.25µm para a realização de inoculações em três ovos embrionados de 23 a 25 dias de incubação. Os embriões foram inoculados após ovoscopia, segundo a sua viabilidade e higidez. Os ovos foram higienizados com álcool 70% e inoculados com um volume de 0,3mL do vírus isolado com o auxílio de uma seringa de 1mL, na cavidade amniótica. Os ovos foram então incubados por 72 h em estufa bacteriológica com umidade e ventilação controladas. Foram feitas ovoscopias diárias para acompanhar a viabilidade dos embriões descartando os que sofriam morte embrionária prematura em decorrência de causas que não fosse a infecção viral. Após este período, os mesmos foram colocados, *overnight* a 4°C, para provocar a morte embrionária daqueles que por ventura, não morreram pela infecção. Foram inoculados dois a três ovos com o vírus original, sendo um destes separados para obtenção da suspensão destinada à inoculação da próxima passagem e à análise molecular. Os demais embriões foram destinados à colheita dos órgãos para o estudo das técnicas de

TUNEL e imunohistoquímica. Este processo foi repetido nove vezes consecutivas.

3.3. Análise histopatológica

Os órgãos colhidos (intestino e bursa de Fabrícus) na ocasião da abertura dos ovos foram fixados em solução de formol 10% tamponado (pH 7,2). Foram, então, incluídos em parafina para confecção dos cortes histológicos. Em seguida, lâminas com cortes histológicos de 4µm foram confeccionadas, sendo que uma de cada lâmina foi corada pelo método de Hematoxilina e Eosina e as demais reservadas para as técnicas de imunohistoquímica e TUNEL.

3.4. Imunohistoquímica para os mediadores da apoptose

O emprego da técnica de imunohistoquímica seguiu protocolo descrito por Teixeira et al (2007) com alterações. As lâminas com os cortes de tecido foram desparafinizadas e, em seguida, hidratadas, sendo que este procedimento foi realizado por meio da submersão das lâminas em soluções decrescentes de álcool.

Para a realização do bloqueio da peroxidase endógena, preparou-se uma solução com 50% de água oxigenada (H_2O_2) e 50% de álcool metílico (CH_3OH), que foi pipetada sobre as lâminas, até cobrir os cortes. As lâminas foram incubadas por 15 minutos, em câmara úmida, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas por cinco vezes

consecutivas, com solução de PBS Tween 80.

A recuperação antigênica foi realizada empregando-se tampão citrato sob calor (100°C). Lavou-se com PBS Tween por 5 vezes consecutivas. Para a realização do bloqueio de ligações inespecíficas, preparou-se uma solução com 20 ml de PBS Tween e 5 g de leite em pó desnatado. Pipetou-se a solução sobre as lâminas, incubou-se em câmara úmida, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se por cinco vezes com solução de PBS Tween, deixou-se escorrer para colocar o anticorpo primário.

Para adicionar-se o anticorpo primário (contra Caspase 2, Caspase 3, Anexina V e p53), calculou-se a diluição do mesmo com BSA (Soro Albumina Bovina) e PBS, utilizando-se de 100ul para cada lâmina. A solução de PBS remanescente de lavagens anteriores, presente ao redor dos cortes, foi seca com o auxílio de papel absorvente. Os cortes histológicos foram cobertos com o anticorpo primário diluído (Diluições: Caspase 02 1:200; Caspase 03 1:1000; Anexina V 1:2000 e p53 1:500) e incubados em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C. Em seguida, permaneceram de 12 a 18 horas em geladeira, a 4°C. Após o período de incubação, lavou-se por 5 vezes com solução de PBS Tween.

As lâminas receberam o anticorpo secundário (específico contra a espécie na qual foi produzido o anticorpo primário), que também foi diluído com BSA (Soro Albumina Bovina) e PBS. Pipetou-se 100 µL em cada lâmina. Todas as lâminas foram incubadas em câmara úmida, por 45 minutos, em estufa a 37°C. Em seguida, lavou-se por 5 vezes,

com solução de PBS Tween. As lâminas, em duplicata foram coradas de duas formas diferentes:

A. Medade das lâminas foram coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC Goat anti-mouse IgG – Zymed – diluição 1:100) por 30 minutos e em seguida lavadas e contra coradas com iodeto de propídio (quantidade suficiente para cobrir o corte por 15 minutos).

B. As demais lâminas foram coradas com CY3 (diluição 1:200) por 30 minutos, lavadas e posteriormente, contra coradas com DAPI (diluição 1:1000) por 15 minutos.

As lâminas foram montadas em lâmina para microscopia com meio aquoso de montagem (Dako Cytomation) e lamínula. A leitura das lâminas foi realizadas em microscópio de fluorescência e fotodocumentadas pelo programa AxioVision 4,7 (Zeiss). Um controle negativo (embrião não inoculado) foi acrescentado em cada bateria de lâminas empregada na técnica de imunoistoquímica para cada marcador apoptótico.

3.5. Técnica de TUNEL

As células em processo de apoptose foram detectadas com o kit comercial APO-BrdU TUNEL Assay kit (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e adaptado segundo Liu et al. (2001). As lâminas foram desparafinizadas e rehidratadas. Adicionou-se paraformaldeído a 1% (p/v)

em PBS e as lâminas foram colocadas em gelo por 15 minutos e, em seguida lavadas com PBS. Adicionou-se, então, etanol 70% e incubou-se *overnight*. Lavou-se com o tampão de lavagem e preparou-se a solução DNA labeling com um volume total de 50µL (requerido para cada amostra), no qual foram acidionados 10µL do tampão de reação, 0,75µL da enzima TdT, 8µL de BrdUTP e 31,25µL de água. Incubou-se por 60 minutos a 37°C. Ao final da incubação adicionou-se 1mL de Rinse Buffer. A solução do anticorpo foi preparada, num total de 100µL para cada amostra, adicionando-se 5µL de Alexa Flúor 488 dye – labeled anti-BrdU à 95µL de Rinse Buffer. As lâminas foram incubadas nesta solução por 30 minutos a temperatura ambiente protegidas da luz. Foram, então, passadas em álcool absoluto I por 5 minutos e álcool absoluto II por mais 5 minutos. Em seguida, foram montadas com lamínula e glicerina tamponada para a leitura em microscópio de fluorescência. Semelhante à imunistoquímica um controle negativo (embrião não inoculado) foi acrescentado em cada bateria de lâminas empregada na técnica TUNEL.

3.6. Extração de RNA, RT-PCR e PCR

O RNA do vírus original e das passagens virais foi extraído com a utilização do kit comercial PureLink Viral RNA/DNA kits (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante.

A reação de RT-PCR para síntese de cDNA foi realizada com o emprego do *kit*

Superscript II Rnase H – Reverse Transcriptase de acordo com o protocolo do fabricante, excetuando-se a temperatura de transcrição na qual foi empregado 50°C, conforme descrito por Teixeira et al. (2007). A amostra adicionada de 10pmol de cada *primer* foi utilizada na reação a 50°C por 30 minutos, seguido de uma inativação de 70°C por 15 minutos. O cDNA (2µL) foi adicionado a 25ul da reação de PCR (20pmol de cada primer, 1,6mM MgCl₂, 1µM de dNTP, 2,5U/50µL TAQ DNA) e amplificado utilizando TAQ DNA polimerase (Invitrogen) 5U/µL. A amplificação envolveu uma denaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e extensão final de 7 minutos.

3.7. Primers

A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação das regiões S1 e S2 da Glicoproteína S são apresentados na Tabela 01 e amplificam um produto de 895 nucleotídeos.

Tabela 01. Primers empregados nas reações de PCR para amplificação da Glicoproteína S.

Nome	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Posição
Primer S+	TTA ATT GTT AGA GAC TCG TGA TAT	1178
Primer S-	ACC TGT ATT AAT AGC TTC CGC A	2073

3.8. Eletroforese

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL. No primeiro poço dos géis foi aplicado o marcador de peso molecular de 100 pb. Nos demais, foram aplicados 5µL dos produtos da PCR, adicionados de 2 µL de azul de bromofenol e diluídos em 3 ul de água destilada.

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

3.9. Sequenciamento

3.9.1. Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen®) foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante.

3.9.2. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando o protocolo preconizado pelo *Kit Big Dye U2.0* (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.

3.9.3. Análise das sequências

A análise das sequências obtidas foi realizada com o emprego dos programas de bioinformática BioEdit (HALL, 1999) e Clustal X (LARKIN et al., 2007) para alinhamento e edição das sequências. O programa MEGA (KUMAR et al., 2008) para confecção da árvore filogenética e o suíte de aplicativos DNASTar – Lasergene (Madison, Wisconsin, EUA. Windows®), o qual abrange todas as funções comumente empregadas nas análises de sequências de *Coronavirus*.

Foram utilizadas as sequências catalogadas no banco de dados GenBank descritas na tabela 02.

Tabela 02. Relação de sequências de *Coronavirus* utilizadas nas análises de variabilidade e filogenética.

Número de Acesso	Descrição
AY342357	Turkey Coronavirus, isolado GI
FJ95898	Turkey Coronavirus isolado brasileiro, amostra original
FJ957899	Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 1 a 5
FJ957900	Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 5 a 9
AY342356	Turkey Coronavirus, isolado Gh
NC_010800	Turkey Coronavirus, genoma completo
EU022525	Turkey Coronavirus isolado TcoV-540
EU022526	Turkey Coronavirus isolado TcoV-ATCC
U49858	Infectious Bronchitis Virus (IBV), isolado alemão, estirpe CU-T2
M21515	Infectious Bronchitis Virus (IBV), isolado japonês KB8523
AJ311317	Infectious Bronchitis Virus (IBV) estirpe Beaudette
NC_004718	SARS: Severe and Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
U72635	MHV: Murine Hepatitis Coronavirus
L14643	HCoVOC43: Human Coronavirus estirpe OC43
L07748	HECoV: Human Enteric Coronavirus
AF344186	HCoV229E: Human Coronavirus estirpe 229E
Z25483	PEDV: Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus
X77047	CCoV: Canine Coronavirus
X80799	FECoV: Feline Enteric Coronavirus
AJ271965	TGEV: Porcine Transmissible Gastroenteritis Coronavirus

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Infecção experimental de TCoV em ovos embrionados

O TCoV replicou em ovos embrionados de perus com 23 a 25 dias de incubação por meio da infecção na cavidade amniótica e apresentou lesões em caráter macroscópico e microscópico, descritas a seguir.

4.1.1. Lesões macroscópicas

Como lesão macroscópica, notou-se a presença de dilatações gasosas nas alças intestinais. Em um dos embriões, a bursa de Fabricius apresentou-se excessivamente aumentada de volume. Tais alterações observadas nos embriões de perus são condizentes com as já descritas anteriormente (TEIXEIRA et al., 2007; CARDOSO et al., 2008). Circella et al (2007) ao efetuarem a necropsia de aves acometidas por *Coronavirus* descreveram a enterite catarral como principal lesão macroscópica. Lin *et al.* (2002) descreve ainda o acúmulo de gases e fluídos no trato intestinal resultando em diarreia.

4.1.2. Lesões microscópicas

As lâminas coradas com HE revelaram lesões no intestino de embriões, em especial na junção íleo-cecal, como intensa congestão, vacuolização do citoplasma dos

enterócitos das vilosidades e, pouca presença de células inflamatórias. Em alguns embriões foi observado o descolamento da mucosa e achatamento das vilosidades (Figura 04). Tais alterações foram descritas por outros pesquisadores como por Teixeira et al. (2007), Castanheira et al. (2007) e Cardoso et al. (2008), como pode ser observado na figura 03. Lin et al. (2002) caracteriza as principais alterações histopatológicas do TCoV como granulosidade das células epiteliais, perdas das microvilosidades e aumento da celularidade da lâmina própria, o que condiz com os achados histopatológicos deste trabalho. Teixeira et al (2007) relatou ainda exsudato mucoso no lúmen intestinal e a presença de depleção e destruição linfocítica na medula e atrofia folicular da bursa de Fabrícus. Estas alterações são causadas pela replicação viral na porção apical das vilosidades e podem estar diretamente relacionadas com a má absorção presente nas infecções por TCoV e consequentemente com o quadro de diarreia (Villarreal et al., 2006; Lin et al., 2002).

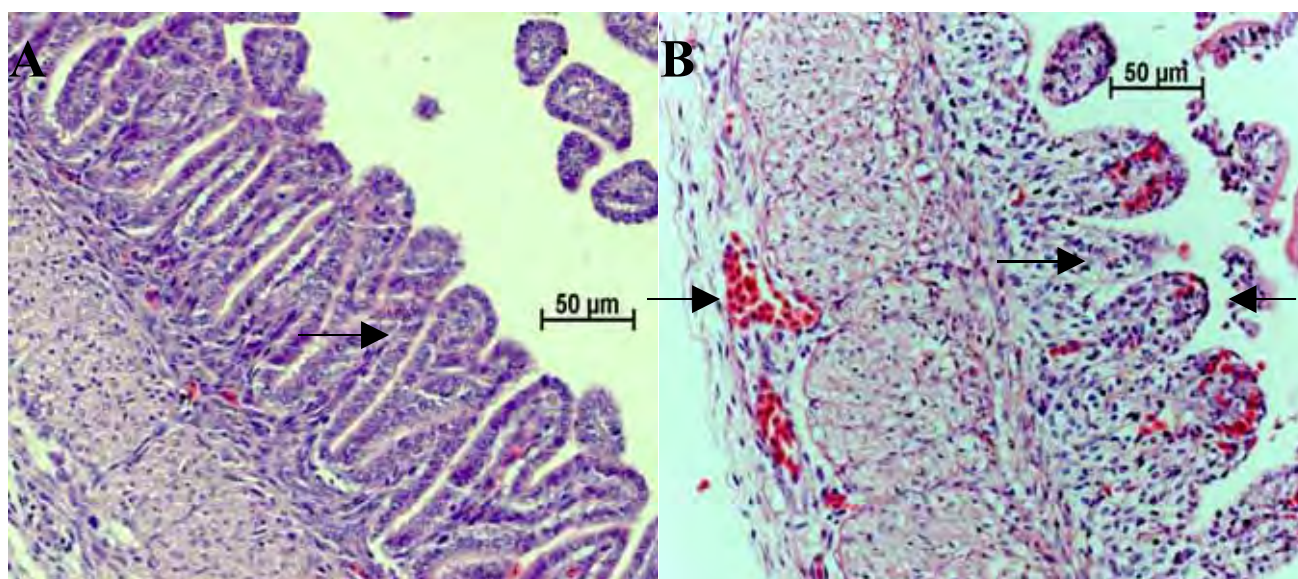


Figura 04: Fotomicrografias de embriões de perus inoculados com o TCoV aos 28 dias de incubação. A) Intestino (íleo) da primeira passagem viral apresentando vacuolização dos enterócitos das vilosidades (seta). Coloração com HE, aumento de 40X. B) Intestino (íleo) da quinta passagem viral apresentando congestão dos vasos intestinais (seta), vacuolização de enterócitos (seta) e redução do tamanho das vilosidades (seta para a esquerda). Coloração com HE, aumento de 40X.

4.2. Imunoistoquímica para os marcadores de apoptose

A apoptose é um processo fisiologicamente importante para eliminar células com danos e é definido por mudanças típicas na morfologia celular e em suas características bioquímicas, incluindo fragmentação do DNA, vacuolização do citoplasma, condensação e marginação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Muitos vírus possuem capacidade de induzir apoptose, que representa uma propriedade citolítica das infecções virais, principalmente em vírus de RNA como *Coronavirus* (SUZUKI et al., 2008).

As lâminas de imunoistoquímica observadas à microscopia de fluorescência mostraram áreas de apoptose celular no intestino, coradas pela fluoresceína ou por CY3.

As lâminas revelaram uma discreta marcação positiva para Caspase 2 (figura 04 C e D) e intensa marcação para Caspase 3 (Figura 05 A e B), principalmente observadas no íleo, uma vez que a região intestinal onde ocorre maior replicação do vírus é a junção íleo-cecal. A marcação para caspase 3 foi mais intensa no interior das vilosidades intestinais.

Poucos trabalhos avaliaram as interações apoptóticas causadas por TCoV, dentre eles, Liu et al. (2001) relata um aumento na ativação da caspase 3 após a infecção de células Vero com o Vírus da Bronquite Infecciosa, associado com a super expressão da proteína E e de uma proteína de 58kDa codificada pela ORF 1a. Ruggieri et al. (2007) realizou a infecção de células A-72 com *Coronavirus* canino e observou ativação da caspase 3 com apenas 33 horas de infecção. Suzuki et al. (2008) realizou estudo semelhante infectando células MDBK com *Coronavirus* Equino e relatou ativação das caspases 3, 7, 8 e 9. Liu et al., (2006) observaram aumento na ativação das caspases 8 e 9 após a infecção de oligodendrócitos com *Mouse Hepatitis Virus* associado com aumento da expressão da proteína E. Houve ainda aumento da apoptose dependente de caspase nas células 293T após a infecção com SARS *Coronavirus* associado ao aumento da expressão da proteína 7a (TAN et al., 2004).

IBV e TCoV pertencem ao grupo III dos coronavírus, são filogeneticamente separados dos demais coronavirus, entretanto, seu comportamento biológico é semelhante, uma vez que todos os vírus citados apresentam o mesmo perfil em relação a ativação do processo apoptótico via caspase.

A apoptose é mediada por uma ativação sequencial das caspases, que estão constitutivamente presente nas células como pró-enzimas inativas. A caspase 3, em particular, demonstra ser um enzima chave na apoptose, uma vez que tem sido reportada como indispensável para a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (RUGGIERI et al., 2007), justificando sua marcação mais intensa.

Tais resultados estabelecem a maneira pela qual TCoV ativa o processo apoptótico, ou seja via de ativação de caspases, entretanto, mais trabalhos são necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual ele é capaz de ativar essas caspases. Muito provavelmente, devido à proximidade filogenética, ele deve lançar mão de mecanismos semelhantes aos empregados pelo IBV, ou seja por meio de um aumento na expressão da proteína E.

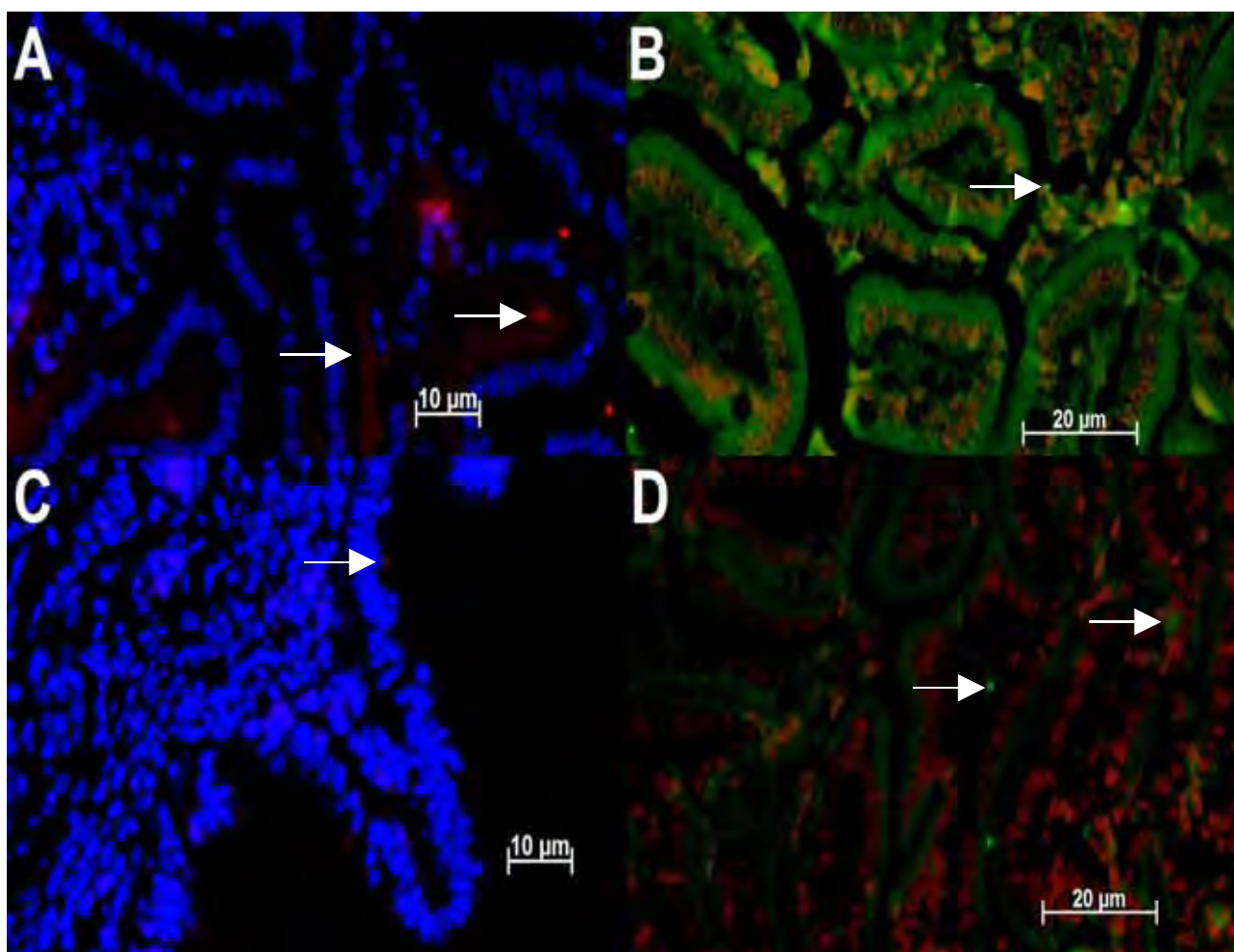


Figura 06: Fotomicrografias apresentando marcação para as Caspases 3 e 2. A) Marcação positiva de Caspase 3 (seta) no interior das vilosidades do íleo de embrião de peru infectado. Coloração de CY3 e DAPI, aumento de 40X; B) Caspase 3, coloração de FITC e PI, aumento de 40X; C) Marcação positiva de Caspase 2 (seta) no íleo de embrião de peru infectado, coloração de CY3 e DAPI, aumento de 40X; D) Marcação de Caspase 2, coloração de FITC e PI, aumento de 40X.

Em relação à marcação de anexina V, foi observada intensa marcação positiva nas superfícies das vilosidades do íleo (figura 06 C e D). Ruggieri et al. (2007) demonstram um aumento de 90% na expressão de anexina V na infecção de células A-72 com *Coronavirus* canino.

A proteína anti-apoptótica p53 demonstrou uma marcação uniforme no interior e

superfície das vilosidades (figura 06 A e B). Li et al. (2007) observaram que células H1299 infectadas com IBV entraram em processo de apoptose na presença e na ausência da expressão da proteína p53, sugerindo que a infecção por IBV é capaz de induzir apoptose independentemente da presença funcional de p53.

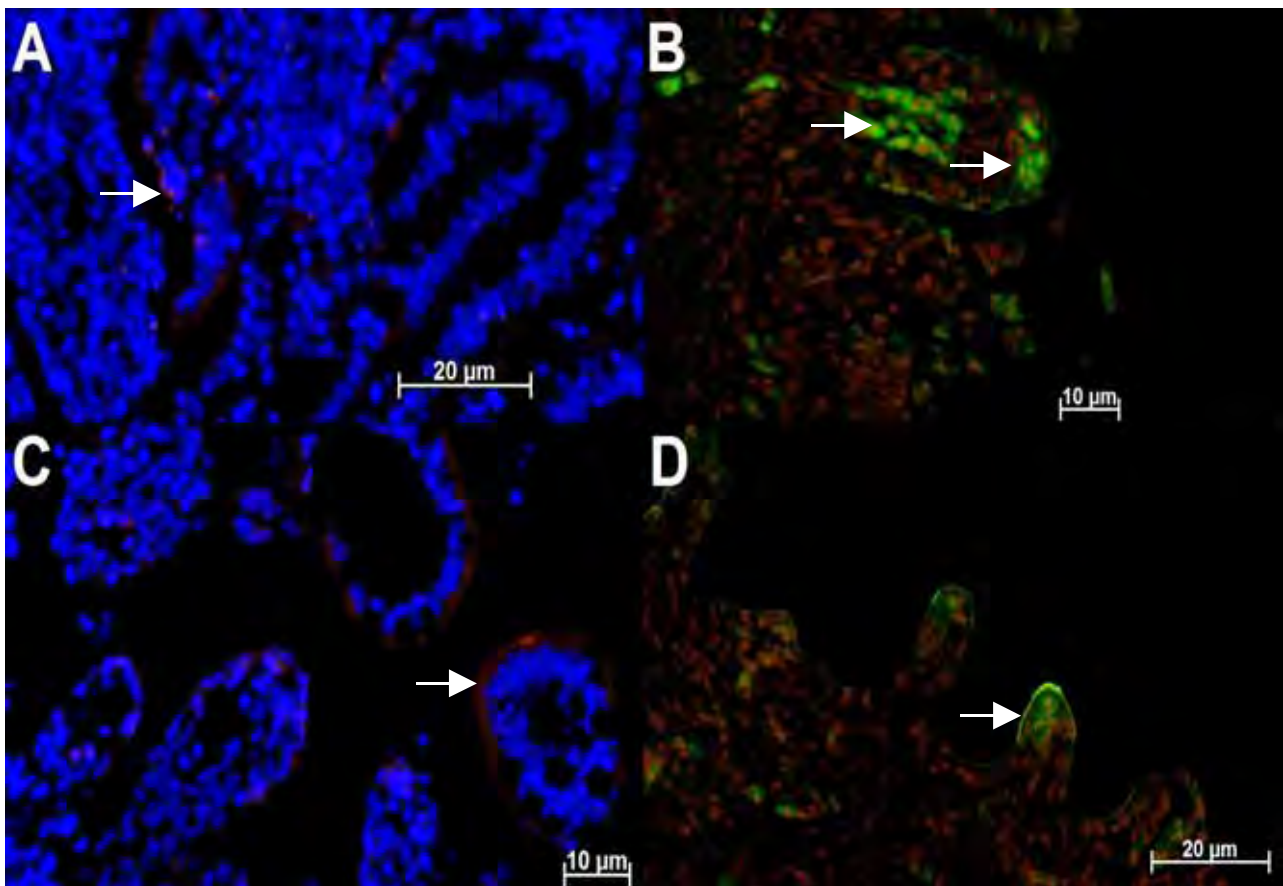


Figura 06: Fotomicrografias apresentando marcação para p53 e anexina V. A) Marcação de p53 na superfície das vilosidades do íleo de embrião de peru infectado (seta), Coloração de CY3 e DAPI, aumento de 40X; B) Marcação de p53 no interior das vilosidades do íleo de embrião de peru infectado (seta). Coloração de FITC e PI, aumento de 40X; C) Marcação de Anexina V nas superfície das vilosidades do íleo de embrião de peru infectado (seta). Coloração de CY3 e DAPI, aumento de 40X; D) Marcação de Anexina V (seta), Coloração de FITC e PI, aumento de 40X.

Na análise do teste de TUNEL (Figura 07), responsável por detectar fragmentação de DNA, foi possível observar marcação intensa na região íleo-cecal. Liu et al. (2001) detectou pela técnica de TUNEL fragmentação de DNA com apenas 8 horas após a infecção de células Vero com IBV. Ruggieri et al. (2007) avaliou a fragmentação de DNA causado na infecção de células A-72 com *Coronavirus* canino por eletroforese e observou que o DNA extraído apresentava perfil de fragmentação indicando que as células estavam sofrendo processo de apoptose. Suzuki et al. (2008) também avaliou o processo de fragmentação do DNA nas células MDBK infectadas com *Coronavirus* Equino e observou que histologicamente as células apresentaram fragmentação da cromatina. Tais resultados confirmam que TCoV ativa o processo de apoptose tanto em cultura de células quanto em embriões de perus e este processo pode ser detectado de forma rápida pelo teste de TUNEL.

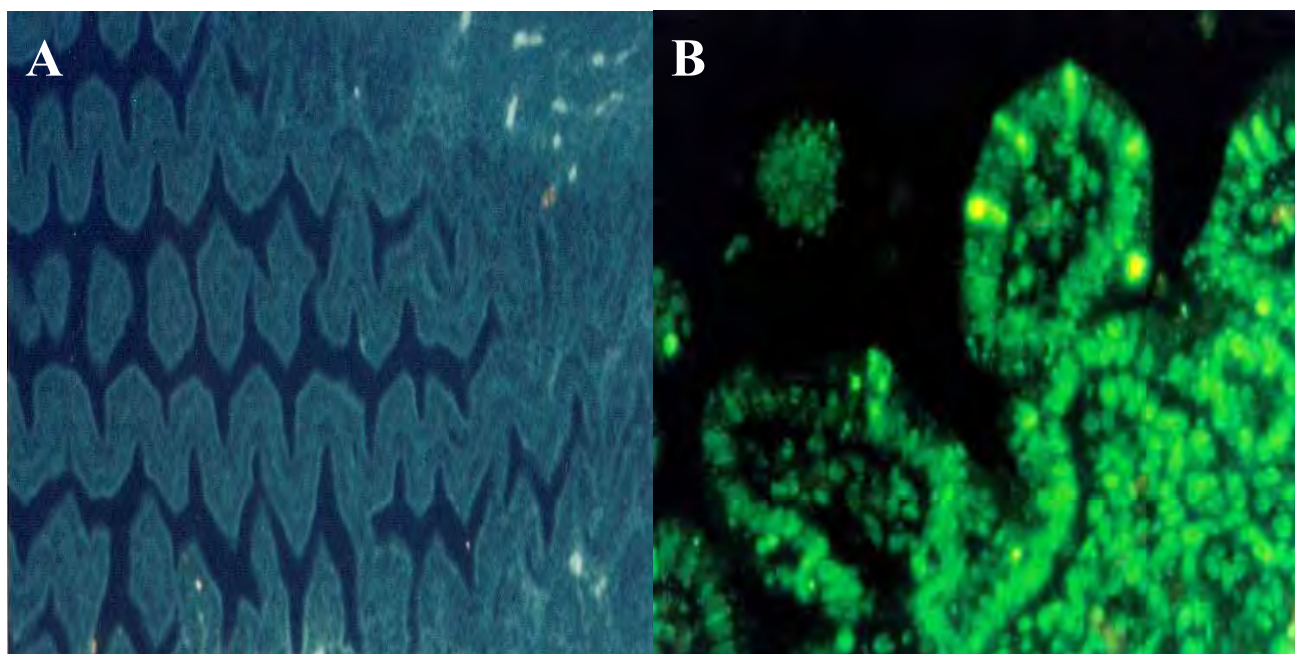


Figura 07. Aspectos observados nos cortes de intestinos de perus obtidos após a infecção com o TCoV para o processo de apoptose pela técnica de TUNEL. A) controle negativo, embrião não inoculado; B) Acentuada marcação de DNA fragmentado (processo inicial de apoptose) em íleo de embrião de peru.

Os resultados revelaram que em 15% dos cortes histológicos analisados não foram detectados os marcadores utilizados, entretanto em 85% foram detectados tanto os marcadores de apoptose (caspase 2, caspase 3 e anexina v) quanto o anti-apoptose (p53). Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, onde o Coronavírus humano (SARS) demonstrou ser indiferente aos processos celulares, produzindo progênie viral independente do estado da célula infectada (BORDI et al., 2006). Na análise pelo teste de TUNEL, maior intensidade (97%) foi observada na junção íleo-cecal dos embriões infectados.

4.3. Sequenciamento:

A amostra original de TCoV, obtida do surto de PEMS, a qual foi empregada nas passagens de ovos embrionados foi sequenciada. Das suspensões obtidas das passagens dos ovos embrionados foram realizados dois *pools*, sendo que o primeiro contempla as passagens de 1 a 5 e o segundo *pool* abrange as passagens de 5 a 9. Após diversas tentativas de sequenciar as amostras, optou-se por agrupá-las em *pools* devido à pouca quantidade de DNA obtido em cada passagem. Após a realização dos pools o sequenciamento foi possível. As sequências obtidas apresentam 895 nucleotídeos.

Após a obtenção das primeiras sequências, estas foram depositadas no GenBank, com os seguintes números de acesso:

- **FJ957898:** *Amostra original, proveniente do surto brasileiro de PEMS.*
- **FJ975899:** *Pool das passagens 1 a 5.*
- **FJ978900:** *Pool das passagens de 5 a 9.*

4.4. Análise das sequências

						
	365	375	385	395	405	415
NC_010800	IYNNIGFNRF	CVTKLLTTRD	ISSITQYTCV	YVVSVEGFDS	YNQGIVYSYV	GVNFDFGTAM
EU022525	..K.....	E...			..W..I....	
EU022526	...S.....	.A...FE...		Y..	..M.LK....	.I.....
AY342356		E...			.HS.LK....	
AY342357		E...			.HN..K....	
FJ957898	-----	---..E...			.HN..K....	
FJ957899	-----	---..E...			.HN..K....	
FJ957900	-----	---..E...			.HN..K....	
						
	425	435	445	455	465	475
NC_010800	YSVKTAPMQF	IYTEQCHKYN	IYNIRGVGQI	LNVTGKDNTT	LVDGGLVITS	GSGLLAFRNN
EU022525	S.....	N..			A...	
EU022526	S..T..	N..			A...	
AY342356	S..K..	N..			A...	
AY342357	SV.....	N..			A...	
FJ957898	SV.....	N..			A...	
FJ957899	SV.....	N..			A...	
FJ957900	SV.....	N..			A...	
						
	485	495	505	515	525	535
NC_010800	GSLFSVQPCR	TVSTQAVIVN	GSFVGLFVPA	SCWLADQFNL	GNHTEYVDGG	CLISNKTISR
EU022525	...Y.....Q		L..	..R..G..G.		ST.
EU022526	Q			..G..S...		TT.
AY342356	...Y.....Q			..R..Q...		TI.
AY342357	...Y.....Q			..N.....		TI.
FJ957898	...Y.....Q			..N.....		TI.
FJ957899	...Y.....Q			..N.....		TI.
FJ957900	...Y.....Q			..N.....		TI.

	
	545 555 565 575 585 595
NC_010800	KRRSTNAVYT GECTGLFAAM GTSCIYSNGT VLNRTLPPQS VQTSVQPLLQ VVANVSIPKE
EU022525	E.....
EU022526	R..A.S.... ...I....S.
AY342356	M....S.... ...I...V.. ..K.....S.
AY342357	T....S.... ..V.I....
FJ957898	T....S.... ..V.I....
FJ957899	T....S.... ...I....
FJ957900	T....S.... ...I....
	
	605 615 625 635 645 655
NC_010800	LTLAVTTEYL QTRYQKVTID CAKYVCGDST RCRTLLQQYG SFCQSVNAIL SGVNENEDNG
EU022525	
EU022526	
AY342356	
AY342357	
FJ957898	
FJ957899	
FJ957900	
	
	665 6875 685 695 705 715
NC_010800	LLQYAEAIN T GYT LNFTGYN VSNLGGFDLS LVL PKNLTLA QN QGRSTIED LLFDKVVTLG
EU022525	
EU022526	
AY342356	
AY342357	
FJ957898	
FJ957899	
FJ957900	

Figura 08: Alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas a partir da amplificação da região S2. NC_010800: Turkey Coronavirus, genoma completo; EU022525: Turkey Coronavirus isolado TcoV-540; EU022526: Turkey Coronavirus isolado TcoV-ATCC; AY342356: Turkey Coronavirus, isolado Gh; AY342357: Turkey Coronavirus, isolado GI; FJ957898: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, amostra original; FJ957899: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 1 a 5; FJ957900: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 5 a 9; (.) os pontos indicam aminoácidos idênticos ao da sequência molde; Em amarelo estão destacadas as mutações comuns às sequências brasileiras e às outras sequências presentes no GenBank; Em ciano, mutações decorrentes das passagens virais. Em vermelho, os resíduos de aminoácidos onde ocorre a clivagem entre as subunidades S1 e S2.

No alinhamento (Figura 08) foi observado o surgimento de 3 mutações de aminoácidos decorrentes das passagens virais (não descrita em outras sequências disponíveis no banco de dados GenBank), ou seja, que não apareceram na amostra original, mas ocorreram nos *pools* das passagens virais. Estas mutações ocorreram nas posições 621 (C para S), 629 (S para F) e 646 (S para C). Dentre estas, as mutações das posições 621 e 646 não apresentaram alteração na característica do aminoácido, uma vez que serina e cisteína são aminoácidos hidrofílicos, entretanto, apenas a mutação da posição 629 teve a alteração de um aminoácido hidrofílico (serina) para um aminoácido hidrofóbico (fenilalanina). Tais mutações, ocorreram na subunidade S2, muito embora a subunidade S1 seja a mais variável do genoma. A clivagem entre as subunidades S1 e S2 ocorre entre as posições 542-543 da proteína S, onde localiza-se os resíduos de aminoácidos Arginina-Arginina-Serina (RRS). Nesta posição foi possível observar a inexistência de mutações no isolado brasileiro, confirmando a hipótese de que esta posição deve manter-se estável para que a proteína seja clivada corretamente e assim adquira sua conformação adequada.

Foram observadas ainda dezenove mutações (descritas na tabela 03) que ocorrem no isolado brasileiro, tanto na amostra original, quanto nas passagens, porém, são mutações presentes em outras sequências já descritas.

Tabela 03: Posições das mutações em aminoácidos presentes na glicoproteína S de TCoV após as passagens em ovos embrionados.

Posição da mutação na proteína S	Mutação
377	T → E
402	N → H
403	Q → N
406	V → K
425	T → S
426	A → V
438	K → N
467	V → A
484	F → Y
490	R → Q
516	D → N
538	I → T
539	S → I
541	R → T
546	N → S
552	E → V
554	T → I
630	T → A
646	V → I

Legenda de Aminoácidos presente no anexo 02

4.5. Análise filogenética

A análise filogenética baseada nos nucleotídeos sequenciados para as regiões S1 e S2 da Glicoproteína S (Figura 09) indica que TCoV está presente na mesma linhagem genômica em que se encontram as estirpes de IBV, compondo um cluster para os *Coronavirus* do grupo 3 enquanto os outros coronavírus de mamíferos estão agrupados

em clusters separados correspondendo aos grupos I e II exatamente como encontrado por Lin et al. 2004. É possível observar que a distância entre o TCoV isolado no Brasil e os demais TCoV é muito pequena acumulando um número de substituições por nucleotídeos inferior a 0,05. Estes resultados demonstram claramente a proximidade da relação filogenética entre TCoV e IBV, os Coronavirus aviários de maior importância na atualidade.

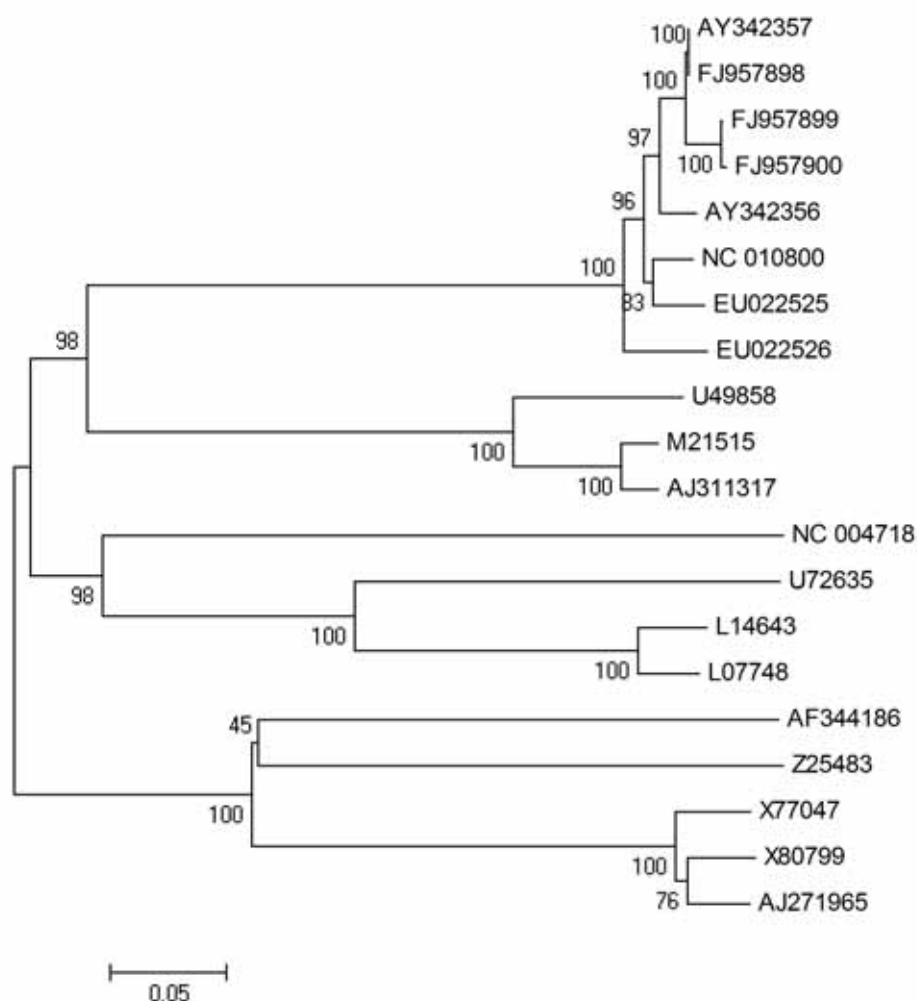


Figura 09: Árvore filogenética gerada pelo método de Neighbor Joining com Bootstrap de 1000 réplicas nos programas Clustaw X e MEGA. AY342357: *Turkey Coronavirus*, isolado GI; FJ95898: *Turkey Coronavirus* isolado brasileiro, amostra original; FJ 957899: *Turkey Coronavirus* isolado brasileiro, pool das passagens 1 a 5; FJ 957900: *Turkey Coronavirus* isolado brasileiro, pool das passagens 5 a 9; AY342356: *Turkey Coronavirus*, isolado Gh; NC_010800: *Turkey Coronavirus*, genoma completo; EU022525: *Turkey Coronavirus* isolado TcoV-540; EU022526: *Turkey Coronavirus* isolado TcoV-ATCC; U49858: *Infectious Bronchitis Virus* (IBV), isolado alemão, estirpe CU-T2; M21515: *Infectious Bronchitis Virus* (IBV), isolado japonês KB8523; AJ311317: *Infectious Bronchitis Virus* (IBV) estirpe Beaudette; NC 004718: SARS: *Severe and Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*; U72635: MHV: *Murine Hepatitis Coronavirus*; L14643: HCoVOC43: *Human Coronavirus* estirpe OC43; L07748: HECov: *Human Enteric Coronavirus*; AF344186: HCoV229E: *Human Coronavirus* estirpe 229E; Z25483: PEDV: *Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus*; X77047: CCoV: *Canine Coronavirus*; X80799: FECov: *Feline Enteric Coronavirus*; AJ271965: TGEV: *Porcine Transmissible Gastroenteritis Coronavirus*.

Tabela 04. Porcentagem de identidade e divergência entre as sequências.

Porcentagem de identidade entre as sequências											
	AY342356	AY342357	NC 01800	EU022526	EU022525	FJ857898	FJ85789	FJ8579	U49858	M21515	AJ311317
AY342356		97.8	96.4	94.4	96.2	97.8	96.6	96.2	53,5	55,2	54,9
AY342357	2.6		96.6	94.7	96.2	100.0	98.2	98.0	53,6	55,5	55,1
NC 01800	4.3	4.0		94.3	96.9	96.6	95.4	94.8	53,3	54,7	54,6
EU022526	6.8	6.4	6.9		94.2	94.7	93.5	92.9	53,9	55,5	54,9
EU022525	4.6	4.6	3.7	7.1		96.2	94.9	94.5	52,7	54,4	54,3
FJ857898	2.6	0.0	4.0	6.4	4.6		98.6	98.0	53,6	55,4	55,1
FJ857899	4.0	1.7	5.6	8.0	6.2	1,7		99.4	52,9	54,9	54,4
FJ857900	4.6	2.4	6.3	8.8	6.7	2,4	0,7		52,6	54,6	54,1
U49858	86,5	86,1	87,3	84,8	89,5	86,1	88,3	89,3		87,6	88,8
M21515	80,2	79,2	82,4	79,1	83,0	79,2	81,2	82,1	15,8		97,1
AJ311317	81,7	80,9	82,8	81,6	83,7	80,9	83,00	83,9	14,0	3,4	

Tabela gerada pelo programa DNASTar. AY342356: Turkey Coronavirus, isolado Gh; AY342357: Turkey Coronavirus, isolado GI; NC 01800: Turkey Coronavirus isolado TcoV-ATCC; EU022526: Turkey Coronavirus isolado TcoV-ATCC; EU022525: Turkey Coronavirus isolado TcoV-540; FJ857898: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, amostra original; FJ857899: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 1 a 5; FJ857900: Turkey Coronavirus isolado brasileiro, pool das passagens 5 a 9; U49858: Infectious Bronchitis Virus (IBV), isolado alemão, estirpe CU-T2; M21515: Infectious Bronchitis Virus (IBV), isolado japonês KB8523; AJ311317: Infectious Bronchitis Virus (IBV) estirpe Beaudette; NC 004718.

Foi gerado pelo suíte de aplicativos DNASTar – Lasergene 8 (MegAlign) uma tabela com as porcentagens de identidade e divergência entre as sequências de *Turkey Coronavirus* e *Infectious Bronchitis Virus*, vírus que compõem o Grupo dos *Coronavirus* aviários. Comparando-se as sequências nucleotídicas de TCoV obtidas no sequenciamento das passagens virais com as outras sequências disponibilizadas no banco de dados do GenBank foi possível observar uma porcentagem de identidade entre

estas sequências variando entre 92,9 e 100% de similaridade, conforme demonstrado na tabela 04. Quando comparados as sequências de TCoV com a mesma região do Vírus da Bronquite Infecciosa essa porcentagem de identidade caiu para 52,9 a 55,5%. Se compararmos apenas sequências de IBV entre si, observa-se que a porcentagem de identidade variou entre 87,6 e 97,4% indicando que esta região é mais conservada no genoma de TCoV. Breslin et al. (1999) realizaram estudo semelhante considerando um segmento do gene do Nucleocapsídio. Em seus estudos observou que as sequências de TCoV comparadas entre si apresentam similaridade entre 90,8 e 96,0% e 78,5 e 94,4% de similaridade com IBV. Lin et al. (2004) observaram uma identidade entre 90,2 e 96,8% entre as sequências completas da glicoproteína S de TCoV e nas sequências de IBV foi observada uma identidade entre 83,2 a 94,4%. Quando comparadas as sequências de TCoV e IBV foram observadas porcentagens de identidade variando entre 50,2 e 52,5%. Tais resultados demonstram que a proteína S é mais variável entre as estirpes de IBV do que entre as estirpes de TCoV como já descrito por Cavanagh et al. (2005) e Gomaa et al. (2008). A proteína Sipke é sabidamente responsável pela adsorção, fusão e penetração dos vírus nas células hospedeiras. Provavelmente este fato esteja associado ao papel da glicoproteína S na determinação do receptor ligante dos *Coronavirus* aos seus hospedeiros, explicando a diferença de tropismo e patogenicidade, uma vez que IBV causa doença respiratória enquanto TCoV é responsável por enterites em perus jovens.

Diante do exposto é possível afirmar que as passagens virais em ovos

embrionados são capazes de induzir mutações pontuais no TCoV uma vez que mimetizam a disseminação hospedeiro-hospedeiro em lotes de perus acometidos pelo vírus. Mais pesquisas são necessárias a fim de determinar o efeito destas mutações sobre a patogenicidade viral, isto é, ocasionando atenuação ou aumento da virulência. O mesmo é válido para a indução de apoptose pela qual o TCoV é responsável, uma vez que os mecanismos apoptóticos estão elucidados, ou seja, o vírus induz apoptose celular principalmente por meio da ativação de caspases, resta saber o qual fator viral de TCoV é responsável por ativar estas caspases.

Por fim, a presente investigação é de extrema importância, uma vez que suas descobertas podem abrir espaço para futuras pesquisas contribuindo para um melhor conhecimento da patogenicidade do *Coronavirus*.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

5.1. A infecção experimental do *Coronavirus* dos Perus a partir do vírus isolado de amostras positivas no Brasil mostrou que o TCoV replicou em ovos embrionados de perus causando alterações histopatológicas e macroscópicas;

5.2. A infecção experimental do TCoV (isolado brasileiro) mostrou que ocorre ativação de marcadores de apoptose celular para Caspase 2, Caspase 3, Anexina V; p53 no íleo dos embriões infectados com marcação mais intensa nas primeiras passagens e o teste de TUNEL (Invitrogen™) também apresentou marcação positiva com maior intensidade na região íleo-cecal dos embriões infectados;

5.3. A análise genética mostrou que a glicoproteína S do TCoV apresentou genética decorrente das passagens virais em ovos embrionados de perus, com divergência de 1,7% entre o vírus original e a quinta passagem e uma divergência de 2,4% entre o vírus original e a nona passagem;

5.4. A comparação dos produtos sequenciados para o gene 2 mostrou que o TCoV isolado no Brasil apresentou 19 mutações de comum ocorrência nas sequencias catalogadas e 3 mutações decorrentes das passagens virais em ovos embrionados de

perus;

5.5. A construção da árvore filogenética utilizando o gene da glicoproteína S do material original, o material das passagens e as sequências já catalogadas mostrou que o TCoV (isolado brasileiro) agrupou-se de forma correta nos cluster do *Coronavirus* de Perus.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

AVISITE Ciência & Tecnologia: produção industrial de perus: características e exigências. Disponível em: <<http://www.avesite.com.br/cet/5/13/index.shtm>> - Acesso em 26 junho 2006.

BORDI, L., CASTILLETI, C., FALASCA, L. et al. Bcl-2 inhibits the caspase-dependent apoptosis induced by SARS-CoV without affecting virus replication kinetics. **Archives of Virology**, v.151, p.369-377, 2006.

BRESLIN, J. J.; SMITH, L.G.; FULLER, F. J. et al. Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid region of turkey coronavirus. *Intervirology*, v.42, p.22-29, 1999.

BRESLIN, J. J.; SMITH, L.G.; FULLER, F. J. et al. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid protein and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infection bronchitis virus. **Virus Research**, v.65, n.2, p.187-193, 1999b.

CALIBEO-HAYES, D.; DENNING, S. S.; STRINGHAM, S. M. et al. Mechanical transmission of turkey coronavirus by domestic houseflies (*Musca domestica Linnaeus*). **Avian Diseases**, v.47, n.1, p.149-153, 2003.

CAO, J.; WU, C.; LIN, T. L. Complete nucleotide sequence of ployprotein gene 1 and genome organization of turkey coronavirus. **Virus Research**, 2008a.

CAO, J.; WU, C.; LIN, T. L. Turkey Coronavirus non-struture protein nsps15 – an endoribonuclease. **Intervirology**, v.51, p.342-351, 2008b.

CASTANHEIRA, T. L.; FERRARI, F. H; LUVIZOTTO, M. C. R. et al. Immunohistochemistry assay to detect Turkey Coronavirus (TCoV) from experimentally infected poult. **American Journal of Immunology**, v.3, n.2, p.31-34, 2007.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHAW, K. et al. Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 3, p. 281-298, 1997.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, S. E. et al. Detection of coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathology**, v.30, p.355-368, 2001.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. B.; et al. Coronavirus from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronavirus of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, n.1, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.

CIRCELLA, E.; MARTELLA, V.; BRUNI, G. et al. Case Report: Coronavirus-associated enteritis in a quail farm. **Italian Journal of Animal Science**, v.6, p.326-329, 2007.

GOMAA, M. H.; BARTA, J. R.; OJKIC, D. et al. Complete genome sequence of turkey coronavirus. **Virus Research**, 2008.

GOMAA, M. H.; BARTA, J. R.; OJKIC, D. et al. Seroprevalence of turkey coronavirus in north american turkeys determined by developed Enzyme Linked Immunosorbent Assay based on recombinant antigen. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, n.12, p.1839-1844, 2008.

GUY, J. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. **Avian Pathology**, v. 29, p.212-217, 2000.

Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41 p. 95-98, 1999.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6^a ed. Manole: Barueri - SP, 2000.

KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LI, F. Q.; TAM, J. P.; LIU, D. X. Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53. **Virology**, v.365, p.435-445, 2007.

LIN, T. L.; LOA, C. C.; TSAI, S. C.; et al. Characterization of turkey coronavirus from turkey poult with acute enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1-2, p. 179-186,

2002

LIN, T. L.; LOA, C. C.; WU, C. C. Complete sequence of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. **Virus Research**, v.106, p.61-70, 2004.

LIU, C.; XU, H. Y.; LIU, D. X. Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v.75, n.14, p.6402-6409, 2001.

LIU, S.; CHEN, J.; CHEN, J. et al. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafow (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). **Journal of General Virology**, v.86, p.719-725, 2005.

LIU, Y.; PU, Y.; ZHANG, X. Role of the mitochondrial signaling pathway in Murine Coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 01, p.395-403, 2006.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al. D. Humoral and cellular immune responses in turkey poult infected with turkey coronavirus. **Poultry Science**, v.80, n.10, p.1416-1424, 2001.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al. Purification of turkey coronavirus by Sephacryl size-exclusion chromatography. **Journal of Virological Methods**, v.104, p.187-194, 2002.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al. Specific mucosal IgA immunity in turkeys poult infected with turkeys coronavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88,

n. 1-2, p. 57-64, 2002b.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al.. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **Journal of Virological Methods**, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

LOA, C. C.; WU, C. C.; LIN, T. L. Comparision of 3' end regions of turkey coronavirus isolates from Indiana, North Carolina, and Minnesota with chicken infectious bronchitis coronavirus strains. **Intervirology**, v. 49, p.230-238, 2006a.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al. Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 1, p. 86-91, 2006b.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C. et al. The effect of the immunosuppression on protective immunity of turkeys poultts against infection with turkey coronavirus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p.127-138, 2002c.

RUGGIERI, A.; DI TRANI, L.; GATTO, I. et al. *Canine Coronavirus* induces apoptosis in cultured cells. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 64-72, 2007.

STEPHENSEN, C. B.; CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v.60, n.2, p.181-189, 1999.

SUZUKI, K.; MATSUI, Y.; MIURA, Y. et al. *Equine Coronavirus* induces apoptosis in cultured cells. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 390-395, 2008.

TAN, Y. J.; FIELDING, B. C.; GOH, P. Y. et al. Overexpression of 7a, a protein specially encoded by the Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus, induced apoptosis via caspase-dependent pathway. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p.14043-14047, 2004

TEIXEIRA, M. C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F. et al. Detection of Turkey Coronavirus in commercial turkey poult in Brazil. *Avian Pathology*, v. 36, n. 01, p. 29-33, 2007.

VELAYUDHAN, B. T.; SHIN, H-J.; LOPES, V. C. et al. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the diagnosis of turkey coronavirus infection. **Journal of Vetereinary Diagnostic Investiation**, v. 15, n. 6, p. 592-596, 2003.

VERBEEK, A; TIJSSEN, P. Sequence analyses of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes: a close relationship with bovine coronavirus. **Journal of General Virology**, v.72, p1659-1666, 1991.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKEN, H. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, p.39-51, 1995.

VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S.; BRANDÃO, P.E. et al. Idebtification of Turkey Astrovirus and Turkey Coronavirus in an outbreak of Poultry Enteritis and Mortality

Syndrome. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.2, p.131-135, 2006.

WATSON, D. W.; GUY, J. S.; STRINGHAM, S. M. Limited transmission of Turkey Coronavirus in young turkeys by adult *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Medical Entomology**, v.37, n.3, p.480-483, 2000.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; LAM, C. S. F. et al. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **Journal of Virology**, v.83, n.2, p.908-917, 2009.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1 Anexo 01: Código genético universal

1ª Posição	2ª Posição				3ª Posição
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

7.2 Anexo 02: Legenda de aminoácidos

	Letra	Abreviação	Nome
01	A	Ala	Alanina
02	R	Arg	Arginina
03	N	Asn	Asparagina
04	D	Asp	Ácido Aspártico
05	C	Cys	Cisteína
06	Q	Gln	Glutamina
07	E	Glu	Ácido Glutâmico
08	G	Gly	Glicina
09	H	His	Histidina
10	I	Ile	Isoleucina
11	L	Leu	Leucina
12	K	Lys	Lisina
13	M	Met	Metionina
14	F	Phe	Fenilalanina
15	P	Pro	Prolina
16	S	Ser	Serina
17	T	Thr	Treonina
18	W	Trp	Triptofano
19	Y	Tyr	Tirosina
20	V	Val	Valina