

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO – FARMACÊUTICA

Área de Tecnologia de Fermentações

**Desenvolvimento de uma vacina HVT recombinante expressando a
proteína VP2 (IBDV GBV-8) para a prevenção da doença de
Gumboro e Marek**

Richard Saldaña Gonzales

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo

2021

Richard Saldaña Gonzales

Desenvolvimento de uma vacina HVT recombinante expressando a proteína VP2
(IBDV GBV-8) para a prevenção da doença de Gumboro e Marek

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção o título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas

Área de Tecnologia de Fermentações

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G643d Gonzales, Richard Saldaña
Desenvolvimento de uma vacina HVT recombinante expressando a proteína VP2 (IBDV GBV-8) para a prevenção da doença de Gumboro e Marek / Richard Saldaña Gonzales. - São Paulo, 2021.
168 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio Stephano

1. VACINAS. I. T. II. Stephano, Marco Antônio Stephano, orientador.

Richard Saldaña Gonzales

Desenvolvimento de uma vacina HVT recombinante expressando a proteína VP2
(IBDV GBV-8) para a prevenção da doença de Gumboro e Marek

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
Orientador

Professor _____ Assinatura _____
1° examinador

Professor _____ Assinatura _____
2°. Examinador

Professor _____ Assinatura _____
3°. Examinador

Professor _____ Assinatura _____
4°. examinador

São Paulo, junho, 2021

Dedico este trabalho à minha família, por acreditar em mim. Sua presença, mesmo assim na distância, significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, pela orientação, pelo apoio, pela confiança e, principalmente, pelas conversas que me ajudaram a evoluir como pessoa e profissional.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de fazer meu doutorado.

À empresa Biovet-Vaxxinova por acreditar no meu trabalho e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do meu projeto. Aos meus colegas do Centro de Pesquisa.

À minha amiga Tamires Cordeiro por me ajudar a dar meus primeiros passos no mundo a Biologia Molecular.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos (LIB) pelo apoio, principalmente por essa troca de ideias que me permitiram evoluir como profissional e pessoa.

À minha companheira, amiga, namorada, Diana Marylin Vargas Rojas por me ajudar na fase final deste processo, principalmente nos piores momentos, sendo ela minha fortaleza.

GONZALES, R. S. Desenvolvimento de uma vacina HVT recombinante expressando a proteína VP2 (IBDV GBV-8) para a prevenção da doença de Gumboro e Marek. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

RESUMO

O vírus da doença infecciosa da bursa, chamado também Doença de Gumboro, causa imunossupressão em aves, em função do vírus infectarem os linfócitos B na Bursa de Fabricius. O vírus da doença de Marek está associado a problemas oncogênicos em aves (linfomas viscerais, lesões em nervos periféricos, lesões na pele e também imunossupressão). O controle das doenças de Gumboro e Marek é de enorme importância econômica, já que ocasiona um grande impacto na indústria avícola e conseqüentemente na exportação de carne de frango. O uso da tecnologia do DNA recombinante permitiu criar estratégias para produzir novas vacinas usando a manipulação genéticas e a produção de proteínas recombinantes, e também de microrganismos recombinantes com o intuito de elaborar vacinas mais seguras e eficazes. O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma vacina vetorial HVT contra as doenças de Gumboro e Marek, de modo que o Herpesvírus de Peru (HVT FC-126) expresse a proteína VP2 madura do Vírus da Doença Bursa Infecciosa (IBDV). Dos resultados apresentados, foi possível elaborar a estratégia da construção do plasmídeo a ser utilizado na transfecção em células FEG. Foi realizado um estudo de sensibilidade ao antibiótico G418. As células FEG foram sensíveis ao antibiótico a concentrações superiores a 1,5mg/mL. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de transfecção de vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 para inserir a fase de leitura aberta (ORF) da proteína VP2 no genoma do HVT FC-126. Usando este sistema, foi inserido o gene VP2 IBDV GBV-8 por recombinação homóloga na região US2 sob controle de dois promotores (CMV e SV40). Como perspectivas futuras deste trabalho, experimentos complementários para a verificação da expressão serão realizados.

Palavras Chaves: vacina vetorial, VP2, IBDV, HVT.

GONZALES, R. S. Development of recombinant HVT vector vaccine (Marek's disease) inserted with the VP2 protein expression gene of infectious bursal disease virus. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo

Abstract

Infectious bursal disease virus, also called Gumboro disease, causes immunosuppression in birds due to the destruction of B lymphocytes in the bursa of Fabricius. Marek's disease virus is associated with oncogenic mutations in birds (visceral lymphomas, peripheral nerve damage, skin lesions, and immunosuppression). The control of the diseases of Gumboro and Marek is very important since it causes a great economic impact in the poultry industry. The use of recombinant DNA technology has allowed the creation of strategies to produce new vaccines using genetic manipulation and the production of recombinant proteins aiming for the development of safe and effective vaccines. The aim of the present work is to develop a recombinant vaccine against Gumboro and Marek diseases using Turkey Herpesvirus (HVT FC-126) expressing the VP2 protein of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). From the attained results, was possible to elaborate the strategy for constructing the plasmid to be used in transfection in CEF cells. A study of sensitivity to antibiotic G418 was carried out. FEG cells were sensitive to antibiotics at concentrations above 1.5mg/mL. Furthermore, a transfection system of vectors pCMV US2-VP2-GBV8 and pSV40 US2-VP2-GBV8 was developed to insert the open reading frame (ORF) of the VP2 protein in the genome of HVT FC-126. Using this system, the VP2 IBDV GBV-8 gene was inserted by homologous recombination in the US2 region under the control of two promoters (CMV and SV40). As future perspectives of this work, complementary experiments to verify the expression will be carried out

Keywords: recombinant vaccine, VP2, IBDV, HVT

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE UM PLASMÍDEO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA INSERÇÃO DO GENE DE EXPRESSÃO VP2 MADURA NA REGIÃO DO US3 DO GENOMA DE HVT FC-126 USANDO O SOFTWARE SNAPGENE.

Figura 1.	Esquema do genoma do vírus do da doença de Marek.....	30
Figura 2.	Representação esquemática do genoma do vírus de Gumboro.....	32
Figura 3.	Modelo de estrutura do vírus da Bursa Infecciosa (IBDV).....	33
Figura 4.	Células DF-1 infectadas com HVT FC-126 e IBDV GBV-8.....	46
Figura 5.	Gel de eletroforese do material após da síntese da fita dupla de DNA.....	49
Figura 6.	Estratégia de clonagem do segmento contendo o gene da proteína VP2 no vetor pBluescript SK (+) com inserção de sítios de restrição usando PCR por sobreposição.....	51
Figura 7.	Mutagênese para inserção de códon de parada para criar o ORF de expressão para a proteína VP2 madura.....	52
Figura 8.	Resultados <i>in silico</i> do Genoma do HVT FC-126 com a enzima de restrição HindIII.....	53
Figura 9.	Resultados <i>in silico</i> do do fragmento HindIII com a enzima de restrição BamHI.....	54
Figura 10.	Amplificação por PCR das regiões flaqueadores (DOWN e TOP) do segmento US3 com inserção de sequências de restrição.....	55
Figura 11.	Clonagem do fragmento flanqueador TOP no sítio XhoI-HindIII do vetor pCMV para formação do fragmento CMV-Poli(A) SV40-DOWN	56
Figura 12.	Estratégia para construção do vetor com os flanqueadores da região US3 (DOWN e TOP) do genoma do HVT DC-126, junto com o promotor CMV e a sequência poli (A) sinal SV40.....	57
Figura 13.	Estratégia a construção do vetor final (DOWN-CMV-VP2-Poli(A) SV40-UP) para usar na transfeção do HVT em células fibroblasto de embrião de galinha (FEG).....	58
Figura 14.	Estudo de sensibilidade a antibióticos com diferentes concentrações e tempos de incubação em células UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220.....	60

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECIOSA DA BURSA (IBDV) CEPA GBV-8.

Figura 1.	Representação esquemática da fita de nucleotídeos do segmento A do genoma do IBDV GBV-8.....	80
Figura 2.	Árvore filogenética deduzida da sequência da proteína VP2 madura do genoma de comprimento total de 17 cepas de IBDV usando o método <i>neighbor-joining</i>	82
Figura 3.	Alinhamentos múltiplas das sequências de resíduos de aminoácidos das cepas muito virulentas, clássicas, atenuadas clássicas e uma variante antigênica.....	83
Figura 4.	Gráfica de predição de epítomos de células B por BepiPred.....	84
Figura 5.	Gráfica de dados plotados da predição de células B por hidrofiliçidade de Parker.....	86
Figura 6.	Gráfica de predição de epítomos de células B por antigenicidade por Kolaskar & Tongaonkar.....	87
Figura 7.	Gráfica de predição de epítomos de células B por Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz.....	89
Figura 8.	Gráfica de predição de epítomos de células B por acessibilidade da superfície de Emini.....	90
Figura 9.	Gráfica de predição de epítomos de células B por previsão de giro beta de Chou e Fasman.....	92
Figura 10.	Gráfica de comparação de solubilidade de VP2 com a solubilidade média da população de proteínas de E.coli.....	93
Figura 11.	Predição da estrutura secundária da VP2 usando o servidor PSIPRED.....	96
Figura 12.	Modelo 3D da VP2 madura usando dois servidores de modelagem por homologia.....	99
Figura 13.	Validação pelo servidor ProSA da estrutura terciária dos modelos da VP2 refinados.....	101
Figura 14.	Representação tridimensional de epítomos conformacionais ou descontínuos de células B da VP2 gerada por Phyre2 baseada em multi-epítomos.....	102
Figura 15.	Representação tridimensional de epítomos conformacionais ou descontínuos de células B da VP2 gerada por SWISS-MODEL baseada em multi-epítomos.....	103

Figura 16.	Comparação dos modelos 3D da proteína VP2 madura da cepa IBDV GBV-8 gerados usando o programa PyMOL.....	104
CAPÍTULO 3: CONSTRUÇÃO DE DOIS VÍRUS DE MAREK RECOMBINANTES EXPRESSANDO O GENE VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA SOB O CONTROLE DOS PROMOTORES CMV E SV40.		
Figura 1.	Construção dos vetores contendo o gene VP2 maduro sob o controle de diferentes promotores.....	131
Figura 2.	Isolamento das células E. coli DH5α transformadas com os vetores..	132
Figura 3.	Gráfica de espectro de absorbância dos vetores com comprimentos de onda relevantes para determinar a pureza do material genético....	133
Figura 4.	Digestão por enzimas de restrição dos vetores pBlueScript II KS(+), pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	134
Figura 5.	Gráfica de sensibilidade das células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) ao antibiótico Geneticin (G418).....	136
Figura 6.	Células de fibroblasto de embrião de galinhas (FEG) observados por microscópio invertido.....	138
Figura 7.	Células de fibroblasto de embrião de galinhas (FEG) observados por microscópio invertido (100X) com diferentes concentrações do antibiótico G418.....	139
Figura 8.	Gráfica de sensibilidade das células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) ao antibiótico Geneticin (G418) as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL.....	140
Figura 9.	Inibição da replicação viral do pelo antibiótico Geneticin (G418) em células de FEG infectadas por HVT FC-126.....	142
Figura 10.	Transfecção de células FEG semeadas a $2,5 \times 10^4$ células/ oço em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas com Lipofectamina complexado com vetor.....	145
Figura 11.	Transfecção de células FEG semeadas a $2,0 \times 10^4$ células/ poço em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas com Lipofectamina complexado com vetor.....	146
Figura 12.	Células transfectadas com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 e infectadas com HVT FC-126.....	148
Figura 13.	Isolamento dos vírus recombinantes rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2 em células FEG em meio MEM suplementado com 5% de SFB sem adição do antibiótico G418.....	149

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.	Lista de produtos de vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário..	23
Tabela 2.	Lista de produtos de vacinas subunidades licenciadas para uso veterinário.....	24
Tabela 3.	Lista de produtos de vacinas vectorizadas licenciadas para uso veterinário.....	25

DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE UM PLASMÍDEO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA INSERÇÃO DO GENE DE EXPRESSÃO VP2 MADURA NA REGIÃO DO US3 DO GENOMA DE HVT FC-126 USANDO O SOFTWARE SNAPGENE.

Tabela 1.	Cepas do vírus da doença de Marek agrupadas por sorotipo, tipos de cepa, a característica e o tamanho do genoma.....	29
Tabela 2.	Componentes da reação de síntese do cDNA por PCR.....	41
Tabela 3.	Ciclo do termociclador para sínteses de cDNA.....	42
Tabela 4.	Reagentes para síntese da fita dupla (dsDNA) por PCR.....	42
Tabela 5.	Ciclo do termociclador para amplificação da sequência VP2.....	44
Tabela 6.	Resultados de concentração e pureza do material genético extraído e purificado do vírus de Gumboro GBV-8.....	47
Tabela 7.	Resultados de concentração e pureza do material genético extraído e purificado do HVT FC-126.....	48

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA (IBDV) CEPA GBV-8

Tabela 1.	Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos da sequência da proteína VP2 madura (1323 pb) do IBDV GBV-8 com outras cepas.....	81
Tabela 2.	Sequências dos epítomos de células B da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8 gerados por BepiPred.....	85
Tabela 3.	Sequências dos epítomos de células B da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8 gerados por hidrofobicidade de Parker.....	86
Tabela 4.	Sequências dos epítomos de células B gerados por antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar.....	88
Tabela 5.	Sequências dos epítomos de células B gerados por Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz.....	89
Tabela 6.	Sequências dos epítomos de células B gerados por de acessibilidade da superfície de Emini.....	91

Tabela 7.	Sequências dos epítomos de células B gerados por previsão de giro beta de Chou e Fasman.....	92
Tabela 8.	Pontuações de qualidades por GalaxyRefine dos modelos gerados por Phyre2.....	98
Tabela 9.	Pontuações de qualidades por GalaxyRefine dos modelos gerados por SWISS-MODEL.....	98

CAPÍTULO 3: CONSTRUÇÃO DE DOIS VÍRUS DE MAREK RECOMBINANTES EXPRESSANDO O GENE VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA SOB O CONTROLE DOS PROMOTORES CMV E SV40.

Tabela 1.	Atividade para transfecção do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 em escala usando Lipofectamina em células FEG.....	147
Tabela 2.	Atividade para transfecção do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 em escala usando Lipofectamina em células FEG.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Covariância Cruzada Automática (<i>Auto Cross Covariance</i>)
ANOVA	Análise de Variância
BF	Bursa de Fabricius
CMV	Citomegalovírus
CNF	Campos Neurais Condicionais (<i>Conditional Neural Fields</i>)
DEPC	Dieil Pirocarbonato
MD	Doença de Marek
DMS	Dimetilsufóxido
FEG	Fibroblasto de Embrião de Galinha
G418	Antibiótico Genitacin
GMQE	Estimativa de Qualidade do Modelo Global (<i>Global Model Quality Estimation</i>)
GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathicity</i>
HBV	Vírus de Hepatite B
HVT	Herpesvirus de los Pavos
IBD	Doença da Bursa Infecciosa
IBDV	Vírus da Doença da Bursa Infecciosa
MMTV	Tumor Viral Mamário de Camundongo
ORF	Fase de Leitura Aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
ORI	Origem de Replicação
PFU	Unidades Formadoras de Placa – “ <i>Plaque Forming Units</i> ”
QMEAN	Qualidade Media
RHV	Hipervariável
RI	Repetições Internas
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RSV	Vírus do Sarcoma de Rous
RT	Repetições Terminais
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino

SOC	Caldo Súper Ótimo com repressão de Catabólitos
SPF	Livre de Patógenos Específicos (<i>Specific Pathogen Free</i>)
SV40	Virus Simian 40
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
U _c	Sequência Única Curta
U _L	Sequência Única Longa
VLPS	<i>Virus-Like Particles</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	Vacinas.....	21
1.2.	Vacinas recombinantes	22
1.2.1.	Vacinas de DNA ou RNA.....	22
1.2.2.	Vacinas de subunidades.....	23
1.2.3.	Vacinas vectorizadas.....	24
2.	REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO <i>IN SILICO</i> DE UM PLASMÍDEO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA INSERÇÃO DO GENE DE EXPRESSÃO VP2 MADURA NA REGIÃO DO US3 DO GENOMA DE HVT FC-126 USANDO O SOFTWARE SNAPGENE		
1.	INTRODUÇÃO.....	29
1.1.	Vírus da doença de Marek (MDV)	29
1.1.1.	Estrutura e biologia molecular do MDV.....	29
1.1.2.	Patogenicidade do vírus de Marek.....	30
1.2.	Vírus da doença infecciosa da Bursa (IBDV).....	31
1.2.1.	Estrutura e biologia molecular do IBDV.....	31
1.2.2.	Antigenicidade do IBDV.....	33
1.2.3.	Patogenicidade do IBDV.....	34
1.2.4.	Sinais clínicos.....	35
2.	JUSTIFICATIVA.....	36
3.	OBJETIVO.....	37
3.1.	Geral.....	37
3.2.	Específicos.....	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.	Células e vírus.....	38
4.2.	Extração e purificação do genoma do HVT FC-126.....	38
4.3.	Obtenção do gene VP2.....	39
4.3.1.	Replicação do IBDV GBV-8 em FEG.....	39
4.3.2.	Extração do genoma total RNA do vírus de Gumboro (GVB-8)	40
4.3.3.	Sínteses da primeira fita de cDNA.....	41
4.3.4.	Síntese da segunda fita do cDNA (dsDNA).....	42
4.3.5.	Digestão de RNA residual.....	42
4.3.6.	Purificação da fita dupla de DNA (dsDNA).....	43
4.3.7.	Amplificação do gene de VP2 por PCR.....	43

4.3.8.	Eletroforeses em gel de agarose do segmento de gene VP2....	44
4.2.	Construção <i>in silico</i> do plasmídeo de transfecção.....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSÕES.....	45
5.1.	Extração e purificação dos genomas dos IBDV GBV-8 e HVT FC-126.....	45
5.2.	Estudo <i>in silico</i>	50
5.2.1.	Clonagem do gene VP2 no vetor pBluescript SK (+) e inserção de códon de parada.....	50
5.2.2.	Amplificação das sequências flanqueadoras (UP e DOWN).....	52
5.2.3.	Inserção da sequência flanqueadora TOP no vetor pCMV.....	55
5.2.4.	Inserção dos fragmentos CMV-Poli(A) SV40-TOP e DOWN... ..	56
5.2.5.	Inserção da sequência codificadora da proteína VP2 madura..	57
5.3.	Ensaio de sensibilidade das células UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	61
	APÊNDICE 1.....	62
	APÊNDICE 2.....	63
	APÊNDICE 3.....	64
	APÊNDICE 4.....	67
7.	REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> E MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECIOSA DA BURSA (IBDV) CEPA GBV-8		
1.	INTRODUÇÃO.....	71
2.	OBJETIVO.....	73
2.1.	Geral.....	73
2.2.	Específicos.....	73
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
3.1.	Cepa viral.....	74
3.2.	Sequenciamento do segmento A IBDV GBV-8	74
3.3.	Análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do IBDV GBV-8.....	74
3.4.	Predição da estrutura secundária.....	75
3.5.	Predição de epítomos lineares para células B.....	75
3.5.1.	Método de BepiPred-1.0.....	75
3.5.2.	Método de hidrofobicidade de Parker.....	75
3.5.3.	Método de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar.....	76

3.5.4.	Método de Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz.....	76
3.5.5.	Método previsão de acessibilidade da superfície de Emini.....	76
3.4.6.	Método de previsão de giro beta de Chou e Fasman.....	76
3.6.	Predição de solubilidade e propriedades físico-químicas da VP2.....	77
3.7.	Predição de antigenicidade e alergenicidade da VP2.....	77
3.8.	Modelagem molecular da proteína VP2.....	78
3.8.1.	Predição da estrutura terciária.....	78
3.8.2.	Refinamento da estrutura terciária.....	78
3.8.3.	Validação da estrutura terciária.....	79
3.9.	Predição de epítomos descontínuos de células B.....	79
4.	RESULTADOS.....	80
4.1.	Análises de sequência de nucleotídeos e aminoácidos do segmento A da cepa IBDV GBV-8.....	80
4.2.	Predição de epítomos lineares.....	84
4.2.1.	Método de BepiPred-1.0.....	84
4.2.2.	Método hidrofobicidade de Parker.....	85
4.2.3.	Método de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar.....	87
4.2.4.	Método de Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz.....	88
4.2.5.	Método previsão de acessibilidade da superfície de Emini.....	90
4.2.6.	Método de Previsão de giro beta de Chou e Fasman.....	91
4.3.	Predição de solubilidade e propriedades físico-químicas.....	93
4.4.	Predição da estrutura secundária.....	93
4.5.	Predição de antigenicidade e alergenicidade da VP2.....	94
4.6.	Predição da estrutura terciária.....	94
4.7.	Refinamento da estrutura terciária.....	97
4.8.	Validação da estrutura terciária dos modelos da proteína VP2.....	99
4.9.	Predição de epítomos conformacionais de células B.....	102
4.10.	Epítomos consenso lineares e conformacionais da proteína VP2 madura.....	103
5.	DISCUSSÃO.....	105
6.	CONCLUSÕES.....	108
7.	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICE 1.....	112
	APÊNDICE 2.....	113
	APÊNDICE 3.....	115

CAPÍTULO 3: CONSTRUÇÃO DE DOIS VÍRUS DE MAREK RECOMBINANTES EXPRESSANDO O GENE VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA SOB O CONTROLE DOS PROMOTORES CMV E SV40

1.	INTRODUÇÃO.....	117
2.	OBJETIVOS.....	120
2.1.	Geral.....	120
2.2.	Específicos.....	120
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	121
3.1.	Vírus e células.....	121
3.2.	Construção e sínteses dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	121
3.3.	Resuspensão e armazenamento dos vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	122
3.4.	Clonagem dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	122
3.4.1	Transformação das células <i>Escherichia coli</i> DH5 α quimiocompetente com os vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	122
3.4.2.	Extração, purificação e quantificação dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	123
3.5.	Verificação da clonagem dos vetores.....	123
3.5.1.	Digestão dos plasmídeos sintéticos com enzimas de restrição KpnI e EcoRI.....	123
3.5.2.	Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos sintéticos.....	123
3.5.3.	Sequenciamento dos plasmídeos sintéticos.....	124
3.6.	Cultura de célula.....	124
3.6.1.	Células primarias de fibroblasto de embrião de galinha (FEG)..	124
3.6.2.	Titulação viral em FEG.....	124
3.6.3.	Sensibilidade das células de FEG ao antibiótico Geneticin (G418)	125
3.6.4.	Inibição da replicação de HVT FC-126 pelo antibiótico Geneticin (G418) em FEG.....	127
3.6.5.	Optimização da fórmula de transfecção em FEG.....	128
3.6.6.	Transfecção e isolamento de dos HVT recombinantes (rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2)	129
3.7.	Detecção da expressão do gene VP2.....	129

3.7.1. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	129
4. RESULTADOS.....	131
4.1. Construção dos vetores.....	131
4.2. Transformação das células <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	131
4.3. Extração e purificação dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.....	132
4.4. Eletroforese em gel de agarose dos vetores digeridos pelas enzimas de restrição KpnI e EcoRI.....	133
4.5. Titulação do HVT FC-126.....	134
4.6. Ensaio de sensibilidade das células FEG com o antibiótico Geneticin (G418)	136
4.7. Inibição da replicação viral pelo antibiótico Geneticin (G418).....	140
4.8. Optimização da fórmula de transfecção em FEG.....	143
5. DISCUSSÃO.....	149
6. CONCLUSÕES.....	156
7. REFERÊNCIAS.....	158
APÊNDICE 1.....	162
APÊNDICE 2.....	163
APÊNDICE 3.....	166

1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola tornou-se um dos setores mais modernos da agropecuária brasileira. O crescimento é o resultado de inúmeros avanços tecnológicos em áreas como a genética, a nutrição, o manejo e a higiene que permitiram que a indústria seja eficiente e competitiva.

O Brasil no ano de 2015 alcançou uma produção 13 milhões de toneladas de carne de frango, colocando-se no segundo lugar dentre os maiores produtores mundiais depois apenas dos Estados Unidos e superando a China (WAKER et al., 2018). O Brasil é o principal exportador de carne de frango no mundo, superando aos Estados Unidos e a União Europeia (MIGLIAVACCA et al., 2017). Espera-se para o ano de 2023 que a produção de carne de frango brasileira aumente em 46,4% (SOUZA et al., 2018). Portanto, novas vacinas são de vital importância e responsáveis para que a indústria avícola se torne e se mantenha competitiva a nível mundial.

A criação e manejo de sistemas intensivos na criação de aves permite a maximização da produção mas ao mesmo tempo favorece na incidência de doenças. Portanto, a vacinação é essencial para o controle de doenças virais, que representam as patologias dominantes na indústria avícola.

1.1. Vacinas

A maioria das vacinas amplamente utilizadas na atualidade são constituídas por patógenos integrais, podendo ser viral ou bacteriano. Para serem utilizados como vacinas, os patógenos devem ser tratados com produtos químicos ou com calor para serem inativados (PASTORET, 2007). A maioria das vacinas são formuladas com adjuvantes e outras substâncias que facilitam a sua aplicação. Vacinas inativadas quase sempre requerem adição de adjuvantes. Estas vacinas apresentam algumas desvantagens, tais como: duração da imunidade, muitas vezes menor que 1 ano, e reações adversas no lugar da administração podendo ser inchaço, vermelhidão e dor (MCVEY; SHI, 2010).

Para produzir vacinas vivas atenuadas a partir dos agentes patogênicos, os agentes infecciosos são submetidos a condições anormais de crescimento, com passagens múltiplas em células ou em meios de cultura para a seleção de determinadas características de virulência ou de patogenicidade reduzida. Uma das principais vantagens das vacinas vivas atenuadas é que geralmente conferem uma

forte imunidade. Tais vacinas também apresentam desvantagens devido a sua natureza viva e por isto podem apresentar reversão de patogenicidade, bem como não podem ser utilizadas em imunossuprimidos (HILLEMANN, 2000).

Portanto, uma vacina ideal deve ter qualidade, segurança e eficácia com geração de uma boa e prolongada resposta imune e livre de efeitos adversos.

1.2. Vacinas recombinantes

A falta de eficácia e segurança de algumas vacinas e as variações antigênicas de algumas doenças foram motivos para a procura de desenvolvimento de novas vacinas. A utilização de vacinas recombinantes tornou possível produzir vacinas com vírus vivos com melhorias significativas na segurança e eficácia. As vacinas recombinantes podem ser classificadas em três tipos: Vacinas de DNA ou RNA, vacinas de subunidades recombinantes e vacinas vectorizadas (NASCIMENTO; LEITE, 2012).

1.2.1. Vacinas de DNA ou RNA

As vacinas de DNA (ou RNA) são relativamente novas. Baseia-se em uso de plasmídeos de DNA que possuem: (I) gene proveniente de um parasita, uma bactéria ou um vírus capaz de codificar um antígeno e induzir uma resposta imune; (II) um promotor eucariótico para o controle transcricional; (III) uma sequência sinal de poliadenilação e (IV) uma sequência de origem de replicação bacteriana (ORI). Para obter uma resposta imune, o plasmídeo é transfectado na célula hospedeira e a própria estrutura genômica da célula permite transcrever, traduzir e expressar o gene codificador da proteína antigênica (DELLAGOSTIN; FELIX; JORGE, 2016).

As pesquisas realizadas para vacinas de DNA apresentam amplos estudos para uso em animais, motivo pelo qual há várias vacinas licenciadas e, portanto, já inseridas no mercado. A principal vantagem destas vacinas é que elas podem ser estudadas diretamente na espécie alvo, pois apresentam um baixo índice de reações adversas. Na Tabela 1 se apresentam algumas vacinas de DNA de uso veterinário comercializadas.

Tabela 1. Lista de produtos de vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário. (Modificado de DELLAGOSTIN; FELIX; JORGE, 2016; LIU, 2011)

Nome	Espécie animal	Indicação
<i>Apex-IHN</i>	Peixe	Vírus da necrose hematopoiética infecciosa
<i>West Nile-Innovator DNA Horses</i>	Cavalo	Vírus do Nilo Ocidental
<i>Oncept</i>	Cachorros	Melanoma
<i>LifeTide SW 5</i>	Suínos de reprodução	Aumentar a sobrevivência do ninho

Vacinas para uso em humanos estão em constante pesquisa e muitas delas estão em estudos clínicos. Os estudos são focados para prevenção de doenças infecciosas (Vírus da imunodeficiência humana, Influenza, Hepatites B, Malária, Ebola, Dengue, Vírus de herpes simples, Vírus de papiloma humano, dentre outros) e estudos para tratamento e prevenção de câncer (próstata, pulmão, colorretal, células renais, melanomas, ovário, entre outros) (WAHREN; LIU, 2014).

1.2.2. Vacinas de subunidades

As vacinas tradicionais usam microrganismos inteiros que foram atenuados ou inativados e também toxinas bacterianas destoxificadas. Embora as vacinas atenuadas produzam uma resposta imune prolongada, elas podem apresentar problemas a indivíduos imunocomprometidos devido a reversão de patogenicidade do microrganismo. Vacinas de subunidades recombinantes consistem em isolar um gene codificador de um antígeno e inserir em um hospedeiro atenuado ou não patogênico para ser expresso, isolado e purificado (DELLAGOSTIN; FELIX; JORGE, 2016). Os antígenos recombinantes podem ser uma proteína, um peptídeo ou carboidratos ligados a proteínas. Tais produtos permitem produzir antígenos vacinais com maior segurança devido a sua incapacidade em causar a doença, pois é administrado um único componente do microrganismo.

Uma das vantagens do uso de vacinas de subunidades recombinantes é o uso concomitante com outros antígenos vacinais com auxílio de um adjuvante. Os adjuvantes e a inclusão de outros componentes numa formulação são capazes de aumentar potência, estabilidade, eficácia e diminuir a doses (MOYLE; TOTH, 2013).

Entre as vacinas humanas mais conhecidas que utilizam a tecnologia de subunidades recombinantes é a vacina contra o vírus da Hepatites B (HBV- *Hepatitis B virus*). Esta vacina é produzida mediante a expressão da proteína de superfície da Hepatites B (HBsAg) em leveduras. A vacina é produzida pela união da HBsAg com posterior formação de antígeno semelhante a um *vírus-like particles* (VLPs) (NASCIMENTO; LEITE, 2012). Vacinas de subunidades recombinantes de uso veterinário licenciadas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de produtos de vacinas subunidades licenciadas para uso veterinário. (Modificado de DELLAGOSTIN; FELIX; JORGE, 2016)

Nome	Espécie animal	Patógeno
<i>Gavac</i>	Bovino	<i>Ripcephalus (Boophilus) microplus</i>
<i>TickGUARD</i>	Bovino	<i>R. (Boophilus) microplus</i>
<i>HIDATIL EG95</i>	Ovino e Caprino	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>P. Circumvent</i>	Suíno	<i>Porcine circovirus</i>
<i>PleuroStar APP</i>	Suíno	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>Porcilis APP</i>	Suíno	<i>A. pleuropneumoniae</i>
<i>PRO-VAC Circomaster</i>	Suíno	<i>Porcine circovirus</i>

1.2.3. Vacinas vetorizadas

Uma vacina recombinante vetorizada consiste em identificar o material genético do patógeno e segmentá-lo mediante a ação enzimática de DNase ou RNase. O segmento de RNA ou DNA resultante é identificado quanto a sua capacidade de expressar uma proteína capaz de ser reconhecida por anticorpos ou por células imunocompetentes, de modo a neutralizar a ação infectante do patógeno. Assim o material genético desejado é selecionado. Se o material genético é RNA, ele é convertido em cDNA pela transcriptase reversa. O DNA ou cDNA é então inserido em um hospedeiro receptor que é normalmente uma levedura, uma bactéria ou um vírus.

Um ou mais segmentos gênicos podem ser inseridos por recombinação no organismo receptor (VAN KAMPEN, 2001). Por tanto, através da tecnologia de DNA recombinante é possível gerar vacinas com vírus como vetores para a expressão de antígenos protetores de outros vírus. Esta classe de vacina é chamada de "vacina vectorizada" (HUANG et al., 2003). Na Tabela 3 são apresentados alguns exemplos de vacinas vectorizadas para uso veterinário.

Tabela 3. Lista de produtos de vacinas vectorizadas licenciadas para uso veterinário (Modificado de DELLAGOSTIN; FELIX; JORGE, 2016).

Nome	Espécie animal	Patógeno
EURIFEL FeLV	Felinos	Vírus da leucemia felina
PUREVAX Feline Rabies	Felinos	Vírus da raiva
RECOMBITEK rDistemper	Caninos	Vírus da cinomose canina
PUREVAX Ferret	Furões	Vírus da cinomose canina
ProteqFlu TE	Equídeos	Vírus da influenza e toxina do tétano vectorizado
PROTEQ-FLU/RECOMBITEK	Equídeos	Vírus da influenza
RECOMBITEK Equine	Equídeos	Vírus do Nilo Ocidental
Innovax ILT	Aves	Vírus da laringotraqueíte infecciosa
Trovac-AI-H5	Aves	Vírus da gripe aviária
Vaxxitek HVT + IBVD	Aves	Vírus da doença de Marek
Vectormune FP-ND	Aves	Vírus da doença de Newcastle
Raboral	Guaxinins e coiotes	Vírus da raiva
Bayovac CSF E2	Suínos	Vírus da Febre Suína Clássica
Porcilis Pesti	Suínos	Vírus da Febre Suína Clássica
Suvaxyn PCV2	Suínos	Circovírus suíno

2. REFERÊNCIAS

- DELLAGOSTIN, O. A.; FELIX, S. R.; JORGE, S. Recombinant Veterinary Vaccines. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 439–458.
- HILLEMANN, M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. **Vaccine**, v. 18, n. 15, p. 1436–47, 14 fev. 2000.
- HUANG, Z. et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. **Poultry science**, v. 82, n. 6, p. 899–906, jun. 2003.
- LIU, M. A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 62–84, jan. 2011.
- MCVEY, S.; SHI, J. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 40, n. 3, p. 381–92, maio 2010.
- MIGLIAVACCA, A. et al. Mass Balance Applied to Brazilian Conventional Broiler Houses during One Production Cycle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 19, n. 1, p. 75–86, mar. 2017.
- MOYLE, P. M.; TOTH, I. Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. **ChemMedChem**, v. 8, n. 3, p. 360–376, mar. 2013.
- NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 45, n. 12, p. 1102–11, dez. 2012.
- PASTORET, P.-P. Challenges and issues of early life vaccination in animals and humans. **Journal of comparative pathology**, v. 137 Suppl, p. S2-3, jul. 2007.
- SOUZA, A. et al. Broiler Chicken Meat Inspection Data in Brazil: A First Glimpse into an Animal Welfare Approach. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 3, p. 547–554, set. 2018.
- VAN KAMPEN, K. R. Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 31, n. 3, p. 535–8,

vii, maio 2001.

WAHREN, B.; LIU, M. DNA Vaccines: Recent Developments and the Future. **Vaccines**, v. 2, n. 4, p. 785–796, 27 out. 2014.

WAKER, R. et al. Structural Attributes Dynamics of the Brazilian Broiler Production Chain. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 3, p. 517–526, set. 2018.

CAPÍTULO 1

**DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE UM PLASMÍDEO
DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA
INSERÇÃO DO GENE DE EXPRESSÃO VP2
MADURO NA REGIÃO DO US3 DO GENOMA DE
HVT FC-126 *USANDO* O SOFTWARE SNAPGENE**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus da doença de Marek (MDV)

A doença de Marek (MD) é uma doença imunossupressora complexa caracterizada por paralisia, com perda crônica de movimentos, linfoma nas vísceras e na musculatura e, cegueira em frangos (MCPHERSON; DELANY, 2016).

O Vírus da Doença de Marek (MDV) ou chamado também herpevírus Gallid é um membro da família de *Herpesviridae*, subfamília de *Alphaherpevirus*, e do gênero *Mardivirus* (RONG; WHEELER; WEBER, 2014a). O vírus da doença de Marek pode ser dividido em três sorotipos. O sorotipo 1 está associado aos vírus oncogênicos, inclui todas as cepas patogênicas e as cepas atenuadas (GA, Md11, Md5). O sorotipo 2 inclui cepas naturalmente não patogênicas e não oncogênicas (SB- 1) assim como o sorotipo 3 que também não são oncogênicos, sendo este último representado pelo HVT (MCPHERSON; DELANY, 2016). Na Tabela 4 é apresentada as diferentes cepas virais da doença de Marek agrupadas por sorotipos.

Tabela 1. Cepas do vírus da doença de Marek agrupadas por sorotipo, tipos de cepa, a característica e o tamanho do genoma (Modificado de MCPHERSON; DELANY, 2016).

Sorotipo	Cepa	Característica	Tamanho do genoma (kb)
1	GA	Virulento	174,0
1	Md5	Muito virulento	177,8
1	Md11	Muito virulento	178,0
1	Rispens/CV1988	Atenuado	178,3
2	SB-1	Não oncogênico	165,9
3	HVT	Não oncogênico	160,0

1.1.1. Estrutura e biologia molecular do MDV

O genoma do MDV é um DNA de aproximadamente de 160-175 kb e pode estar na forma de DNA linear ou circular (estrutura episomal) dependendo da cepa viral. A estrutura do genoma de MDV contém várias secções, uma sequência única longa (UL) e uma sequência única curta (Uc), semelhantemente a outros *Alphaherpevirus*. Cada sequência está flanqueada por sequências de repetições terminais (RT) e sequências

de repetições internas (RI). Todos os sorotipos (1, 2 e 3) possuem sequências repetidas teloméricas (TTAGGG) (Figura 1) (COUTEAUDIER; DENESVRE, 2014). O genoma do MDV contém cerca de 100 fases de leitura aberta (*Open Reading Frame* ou ORF) e codifica mais de 70 genes, a maioria dos quais tem equivalentes ortólogos em outros vírus alfa.

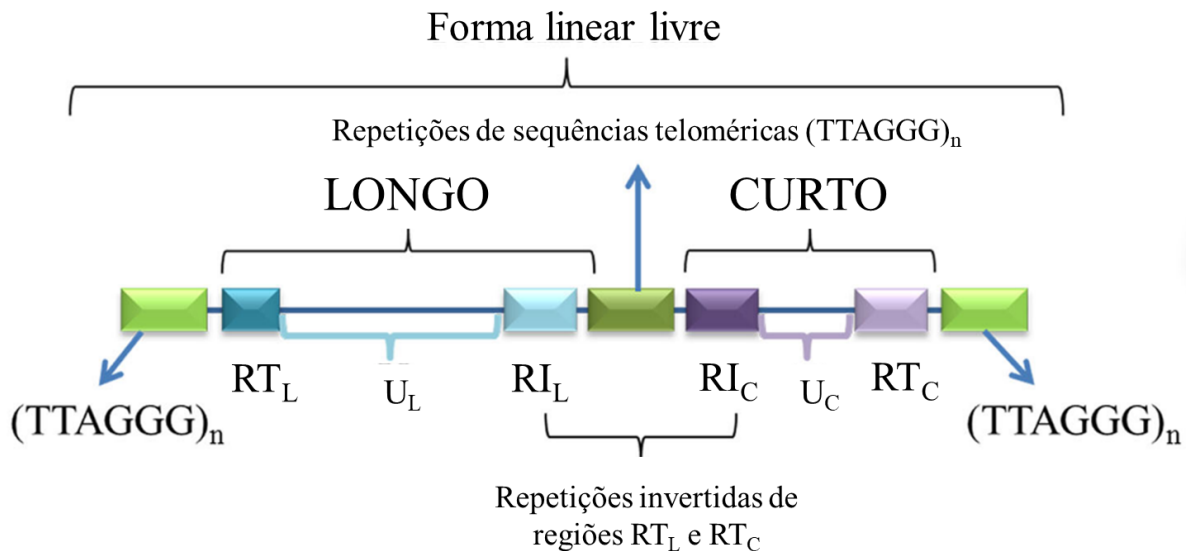


Figura 1. Esquema do genoma linear do vírus da doença de Marek. (Modificado de MCPHERSON; DELANY, 2016). O genoma é dividido em estruturas curtas (c) e longas (L). A estrutura tem regiões de sequência única (U), repetições invertidas terminal (RT) e interno (RI) e blocos de sequência de DNA telomérica ((TTAGGG)_n).

1.1.2. Patogenicidade do vírus de Marek

Infecções pelo vírus de Marek são através das vias respiratórias, por vírus presentes nas penas de aves contaminadas. O vírus infecta linfócitos B e macrófagos localizados nos pulmões e em aproximadamente 24 horas o vírus é transportado aos órgãos linfoides, como a Bursa de Fabricio, o timo e o baço. Os linfócitos B são infectados em órgãos linfoides por macrófagos e posteriormente infectam os linfócitos T.

A patogênese do MDV tem 4 fases de infecção. A citolítica precoce é a primeira fase e ocorre entre 2 e 7 dias após a infecção e é caracterizada pela replicação viral em linfócitos. A segunda fase, denominada de latente ocorre entre 7 e 10 dias após a infecção das células T CD4+ e resulta em disseminação viral sistêmica. Nesta fase pode ocorrer a infecção viral cutânea. A fase citolítica tardia ocorre 18 dias após a

infecção com a reativação do MDV nas células TCD4+, sendo esta, a fase imunossupressora. E por último a fase de transformação, denominada também de fase proliferativa, que ocorre aproximadamente 28 dias após a infecção e se caracteriza por formação de tumores viscerais originados dos linfomas de células TCD4+ (BOODHOO et al., 2016; MCPHERSON; DELANY, 2016; OSTERRIEDER et al., 2006).

1.2. Vírus da doença infecciosa da Bursa (IBDV)

1.2.1. Estrutura e biologia molecular do IBDV

O Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (IBDV), também chamado vírus da Doença de Gumboro é um membro da família *Birnaviridae*, gênero *Avibirnavirus* cujo genoma consiste em dois segmentos de RNA de cadeia dupla (A e B), que possuem cerca de 3200 e 2800 nucleotídeos de comprimento, respectivamente (LU et al., 2015).

O segmento A do genoma tem duas fases de leitura aberta (*Open Reading Frame* ou ORF) que se sobrepõem parcialmente. A primeira e menor ORF codifica a proteína VP5 não estrutural, que não é essencial para a replicação do vírus mas está envolvida na liberação do vírus. A segunda e a maior ORF codifica uma poli proteína precursora (preVP2-VP4-VP3) que pode ser auto clivada pela protease viral VP4 para formar as proteínas virais VP2, VP3 e VP4 (LI et al., 2015). O segmento B contém apenas a VP1 que exerce a função de RNA-polimerase do segmento e tem relação com a virulência (Figura 2).

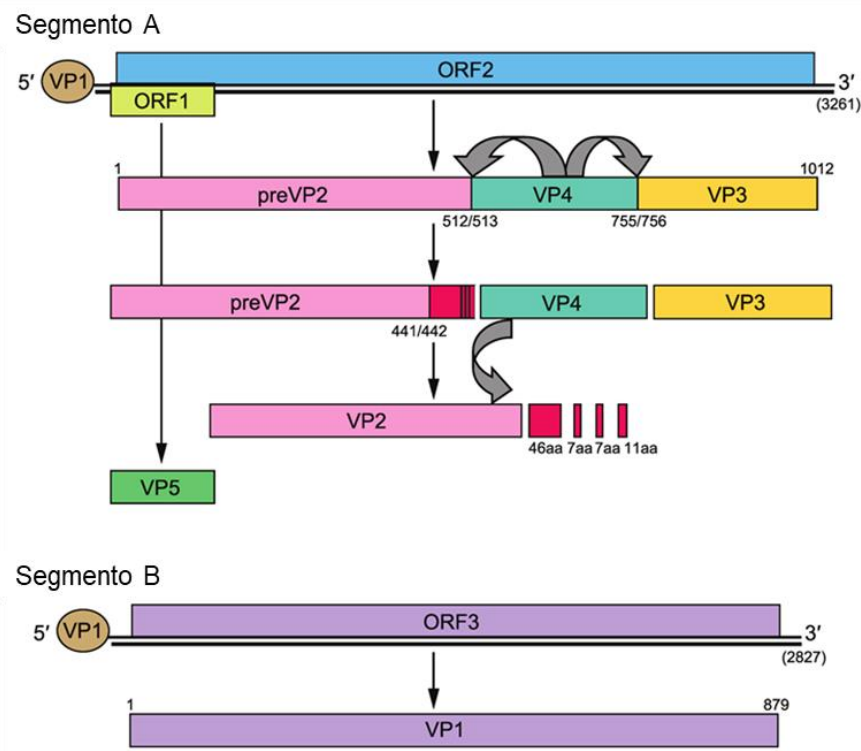


Figura 2. Representação esquemática do genoma do vírus de Gumboro. Segmento A contendo o gene da poliproteína (preVP2-VP4-VP3) e a proteína VP5. Segmento B contendo o gene da proteína RdRp VP1. A imagem mostra o processo de codificação das proteínas e os sítios de clivagem da poliproteína. (Fonte: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsrna-viruses/w/birnaviridae)

A proteína VP2, localizada no capsídeo externo é responsável pela expressão de epítomos que induzem resposta de anticorpos, ou seja, a antigenicidade e permite efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais (neutralização por anticorpos). A VP3 encontra-se no capsídeo interno e é a principal proteína responsável pela conformação estrutural do vírus. A VP3 é também relacionada com antígenos de grupos específicos (Figura 3).

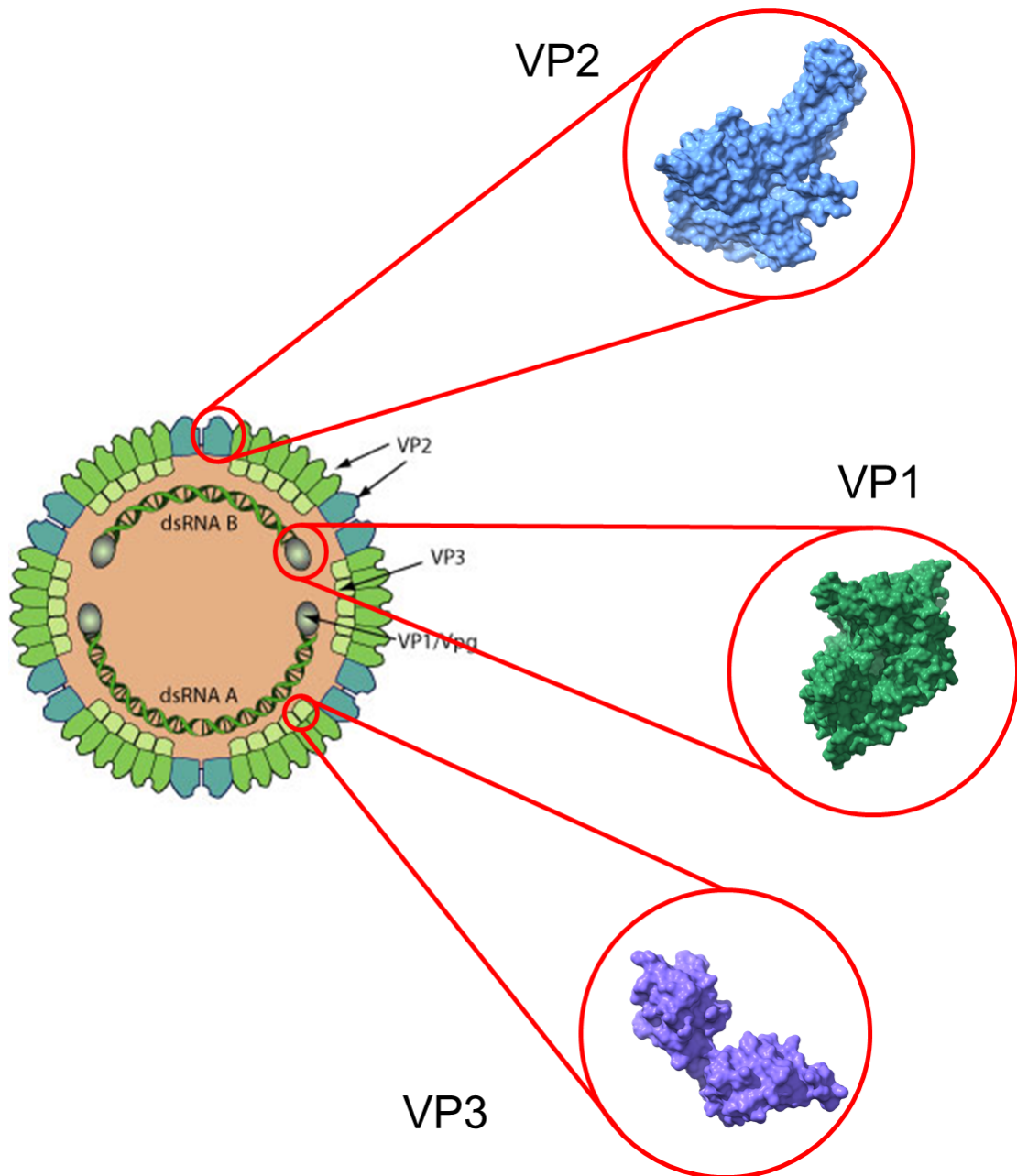


Figura 3. Modelo de estrutura do vírus da Bursa Infecciosa (IBDV) (Modificado do https://viralzone.expasy.org/162?outline=all_by_species). Na imagem são indicadas as os modelos das proteínas estruturais do vírus (VP1, VP2 e VP3). No interior do vírus está localizado da dupla fita de RNA, sendo observado o segmento A e o segmento B.

1.2.2. Antigenicidade do IBDV

Existem dois sorotipos do IBDV, o 1 e o 2. O sorotipo 2 não é virulento em perus e galinhas. O sorotipo 1 é patogênico em galinhas e pode ser classificado em quatro subtipos: muito virulento, clássico, variante antigênica, e cepas atenuadas artificialmente (MÜLLER; ISLAM; RAUE, 2003).

A fração antigênica (epítomos) responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes está localizada na proteína VP2 e é dependente da conformação proteica. Quando as sequências de nucleotídeos de vários sorotipos 1 foram comparadas, descobriu-se que a região que codifica a proteína VP2 tem uma alta tendência para o intercâmbio de nucleotídeos e foi, portanto, designada como região hipervariável VP2 (MÜLLER; ISLAM; RAUE, 2003). O vírus também possui epítomos sorotipo-específicos não neutralizantes localizados principalmente na VP3 (OPPLING; MÜLLER; BECHT, 1991).

1.2.3. Patogenicidade do IBDV

As principais portas de entrada do vírus da doença de Gumboro são a mucosa oral, mucosa ocular e vias respiratórias. Após a entrada do vírus no organismo das aves, estes podem ser detectados em macrófagos e células linfoides do ceco, duodeno e jejuno (SHARMA, 2000). Uma vez na corrente sanguínea, o vírus infecta principalmente a Bursa de Fabrício. Em seguida pode atingir outros órgãos como: glândula de Harder, baço e timo. Acredita-se que o período de susceptibilidade das aves está entre 3 e 6 semanas de idade. Os efeitos imunodepressivos causados pela doença clínica induzem a morbidade e mortalidade das aves.

Experimentos em galinhas que sobreviveram a infecções do IBDV e posteriormente foram bursectomizadas demonstraram que o vírus destrói órgãos linfoides e também que a Bursa de Fabricius (BF) é o órgão-alvo da infecção, local onde ocorre a formação e diferenciação dos linfócitos B em aves. Elevadas concentrações de antígenos virais e títulos virais foram detectados na Bursa de Fabricius após a infecção, enquanto apenas traços de antígenos virais e títulos virais foram detectados no timo e no baço (MÜLLER; ISLAM; RAUE, 2003).

A capacidade de infectividade pelo IBDV depende do tipo de cepa e da quantidade de partículas virais infectantes, da idade e da raça da ave, da via de inoculação, e da presença ou ausência de anticorpos neutralizantes (MÜLLER; ISLAM; RAUE, 2003). Os sorotipos do IBDV mostram que o segmento A do genoma determina o tropismo pela Bursa de Fabricius e o segmento B está relacionado com a eficiência de replicação do vírus (ZIERENBERG et al., 2004).

1.2.4. Sinais clínicos

O tempo de incubação do vírus varia de dois a três dias. Na fase aguda da doença as aves estão debilitadas, deprimidas e desidratadas, com diarreias aquosas, além da cloaca manchada de sangue. As aves infectadas com cepas menos virulentas podem apresentar a BF fibrosa, atrofiada e com cistos. Estas alterações podem causar mortalidade devido a infecções secundárias.

A mortalidade começa a partir do terceiro dia de infecção, atinge um pico no quarto dia, e em seguida, cai rapidamente. As galinhas sobreviventes recuperam um estado de saúde aparente após 5 a 7 dias. Em uma infecção inicial em uma granja os sintomas são geralmente muito agudos e com taxa de mortalidade muito elevada, principalmente se está envolvida uma cepa muito virulenta. Se o vírus persiste na granja, ele será transmitido as gerações sucessivas e as manifestações clínicas da doença aparecem mais cedo e são gradualmente substituídas por formas subclínicas. No entanto os episódios agudos ainda podem ocorrer (VAN DEN BERG et al., 2000). Os efeitos de imunossupressão aparecem na 2ª e 3ª semana de exposição ao vírus. O número de frangos prontos para o abate permanece reduzido, com manifestações de infecções secundárias, resposta imune reduzida as vacinas e déficit na conversão alimentar (SHARMA, 2000).

A necropsia das aves que sucumbiram à doença apresenta aumento do tamanho da BF, assim como hiperemia e edema. Em casos graves, a Bursa de Fabricius mostra uma inflamação e presença de transudado seroso dando uma aparência amarelada à superfície.

IBDV é estável no ambiente e pode persistir em aviários mesmo após a limpeza e desinfecção. A doença é altamente contagiosa e de fácil transmissão através de várias rotas e mediadores. Portanto, o controle adequado da Doença Infecciosa da Bursa só é possível através da vacinação (WANG et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

O vírus de Gumboro se disseminou por quase toda a produção avícola no mundo em função do vírus possuir uma alta resistência ao ambiente, ocasionando impacto negativo na produção de frango. Várias vacinas foram desenvolvidas para o controle da doença de Gumboro; muitas delas quando corretamente aplicadas demonstraram ser eficientes na proteção das aves e no controle das possíveis consequências da infecção. Ainda assim, é importante prevenir a contaminação e o surgimento de novas cepas virais, evitando o acúmulo de subtipos resistentes por mutação nos lugares de produção. Isto ocorre, pois, ao surgir um vírus resistente, as granjas permaneceram contaminadas mesmo após limpeza e desinfecção, apresentando um risco maior para o próximo lote de aves. Maiores impactos sofrem as aves jovens devido ao desenvolvimento de imunodepressão em 2 a 3 semanas após a eclosão dos ovos, tornado a resposta imune ainda mais limitada. Desta maneira, uma solução é desenvolver vacinas que permitam a imunidade passiva de neonatos mediante a esquemas de vacinação em aves de postura, garantindo a proteção contínua.

Vacinas vivas convencionais sofrem dificuldade de superar os níveis de imunidade passiva apenas com a geração de anticorpos maternos, conseqüentemente é muito importante determinar a melhor data de vacinação para uma proteção adequada do plantel. É muito importante obter uma vacina que não seja afetada pela imunidade passiva adquirida, deste modo, seria possível a vacinação de ovos embrionados via saco vitelino ou neonatos com 1 (um) dia de nascido por via subcutânea. Assim, pode-se programar a imunização de todo o plantel em uma única data de vacinação para a nivelção das variações dos anticorpos maternos entre os neonatos. Desta forma se obteria um controle total da doença (proteção e prevenção).

A vacina recombinante vetorizada aqui proposta permitirá que se consiga proteger da Doença Infecciosa da Bursa (IBD) e da Doença de Marek (MD) com uma única aplicação, portanto, permitirá diminuir o número de vacinas produzidas (uma única vacina para duas doenças) com uma única administração (uma única dose) e com efetiva geração de imunidade. Nesta vacina, o vector viral HVT irá infectar e se replicará nas células do hospedeiro. Durante a replicação, a proteína VP2 do vírus de Gumboro (IBDV) será expressa no citoplasma das células infectadas, secretadas e

apresentadas via MHC de classe I. Os anticorpos maternos não terão nenhum efeito na replicação do HVT, nem da expressão da proteína VP2.

3. OBJETIVO

3.1. Geral

O presente trabalho tem como principal objetivo construir um vetor plasmidial contendo o gene de expressão da proteína VP2 madura do vírus de Gumboro cepa GBV-8 para recombinação homóloga na região US3 do genoma do Herpesvírus de peru (HVT) cepa FC-126 usando o software Snapgene.

3.2. Específicos

- a) Sintetizar a fita dupla de DNA (dsDNA) a partir da fita complementar de cDNA do segmento A de RNA do vírus de Gumboro cepa GBV-8.
- b) Clonar por PCR o gene de expressão da proteína VP2 madura no plasmídeo pBlueScript SK (+) com inserção do códon de parada por mutagêneses.
- c) Clonar as regiões flanqueadoras homólogas ao genoma do HVT FC-126 no plasmídeo pBR322 para recombinação na região US3.
- d) Amplificar por PCR as regiões flanqueadoras (TOP e DOWN)
- e) Montar o plasmídeo final para transfecção em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células e vírus.

Utilizou-se Herpesvírus de peru (*Herpes vírus of Turkeys-HVT*) cepa FC-126 e Vírus da doença de Gumboro (*Infectious Bursal Disease Virus-IBDV*) cepa GVB-8 propagados e células de Fibroblasto de Embrião de Galinha (UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-12203™) (FEG).

4.2. Extração e purificação do genoma do HVT FC-126

Foram realizados dois tipos de purificação do DNA do HVT a partir de amostras replicadas em FEG. A primeira purificação foi realizada com o método de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O sobrenadante de meio de cultura de FEG foi coletado e centrifugado a 15.000 x g durante 5 minutos. Uma amostra de 120 µL do sobrenadante foi adicionado 20 µL de SDS 10% e 20 µL de solução de proteinase K a 10 mg/mL. Esta amostra foi logo agitada em vortex durante 20 segundos e incubado 42°C durante 10 minutos. Foi adicionado o reagente de fenol:cloroformo:álcool isoamílico (25:25:1), e centrifugado a temperatura ambiente a 1.400 x g durante 5 minutos para separação de fases. Foi removida cuidadosamente a fase aquosa, e transferida para um novo tubo de micro centrífuga. Para precipitação, foi adicionado acetato de amônia seguido por etanol absoluto e centrifugado a 1.400 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e coletado o precipitado. Este foi lavado com etanol 70% em gelo e em seguida foi centrifugado a 1400 x g durante 2 minutos e descartado o sobrenadante. O precipitado foi seco a 37°C durante 10 minutos para evaporação do etanol residual e em seguida dissolvido em água tratada com Dieil Pirocarbonato (DEPC).

Outro método utilizado foi a extração e purificação com o kit de *DNeasy® Blood & Tissue*. O sobrenadante da cultura de FEG infecta com o vírus HVT foi centrifugado a 15000 x g durante 5 minutos. A uma alíquota de 100 µL foi adicionado 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL. Esta alíquota foi misturada em vortex e incubada a 56°C durante 10 minutos. Após a incubação foi adicionado 200 µL de etanol (96-100%) e gentilmente misturado. A solução foi colocada numa coluna spin DNeasy e centrifugado a 6000 x g durante 1 minuto. A coluna foi colocada num novo tubo coletor. Foi adicionado 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 6000 x g durante 1 minuto, e o filtrado foi descartado. Novamente a coluna foi colocado num novo tudo coletor,

adicionado 500 µL de tampão AW2 e centrifugada a 20000 x g durante 3 minutos até a membrana da coluna secar. Para finalizar, a coluna foi colocada num tubo de 2 mL, adicionado o tampão TAE e incubada a temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugado 6000 x g durante 1 minuto.

4.3. Obtenção do gene VP2

4.3.1. Replicação do IBDV GBV-8 em FEG

A amostra de vírus de Gumboro cepa GBV-8 foi fornecida pelo laboratório Biovet S.A. (Brasil). O vírus foi submetido a uma replicação em células de fibroblasto de galinha (FEG) em solução de meio Biovet suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) para obtenção de um banco de trabalho. As células de fibroblastos foram obtidas de embriões de galinha a partir de ovos embrionados com 10 dias de incubação. Foram isoladas e eliminadas as extremidades superiores e inferiores, cabeça e vísceras de modo a obter um extrato puro celular de fibroblastos.

Em um frasco, partes coletadas do embrião foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS, pH=7.2) repetidas vezes até eliminar restos de sangue ou até a obtenção de um sobrenadante límpido. A solução de lavagem foi descartada e adicionada 3 mL da solução de tripsina em solução de citrato para cada embrião coletado. Em seguida a solução de tripsina e embrião foram incubadas a 8 °C por 5 horas. Esta etapa permitiu desagregar as células entre si através da ação proteolítica sobre as proteínas intercelulares. Depois das 5 horas de incubação o frasco foi agitado vigorosamente para desagregar as células. A suspensão resultante foi passada por malha para eliminar os debris de tecidos celulares.

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer pelo método de coloração com azul de Tripán para identificar a células viáveis e não viáveis. Foi então preparada uma suspensão celular com uma concentração de 10^5 células/mL. Em garrafas de cultura de célula com superfície de 75 cm² foi adicionado 25 mL da suspensão celular. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa com concentração de 5% de CO₂ durante 1 dia até que a maioria das células permanecesse aderidas ao fundo da garrafa. Em seguida, o meio de cultura sobrenadante da garrafa foi descartado e preparado um novo meio contendo uma diluição apropriada do vírus. A amostra congelada de Gumboro GBV-8 foi aquecida em banho-maria a 37°C e

adicionada no volume de 2mL por 2 horas. Em seguida, foi removido o sobrenadante e adicionado 25 mL de meio Biovet com 5% de soro fetal bovino.

Após 24 horas, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram colocadas em criotubos de 1,5 mL e estes 25 tubos foram considerados o banco mestre do GVB-8. Uma amostra de criotubo foi utilizada para criação de banco de trabalho. Um mililitro do criotubo foi diluído em 3,0 mL de meio Biovet e cada 1 mL foi adicionado em 3 garrafas contendo FEG. As três garrafas permitiram a preparação de 50mL q.s.p. de uma suspensão de vírus. A suspensão foi dividida em duas partes e foi adicionada em duas garrafas previamente preparadas. Foi monitorado o efeito citopático na cultura celular. Quando foi observado o efeito, o sobrenadante foi coletado em tubos de centrifugação e depois centrifugado a 5000 x g para eliminar qualquer resto de célula suspensa. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi alíquotado em criotubos de 1,5 mL com 1 mL da suspensão para logo ser armazenado a -20 °C.

4.3.2. Extração do genoma total RNA do vírus de Gumboro (GVB-8)

A extração e purificação do ácido ribonucleico do IBDV GBV-8 foram realizadas utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Roche). Uma amostra de 1,0 mL foi centrifugada a 1500 x g durante 10 minutos e o sobrenadante separado em outro microtubo. Uma segunda centrifugação foi realizada a 12000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante separado em outro microtubo. Em microtubo de centrifugação de 1,5 mL foi adicionado 560 µl do tampão AVL-carrier RNA com 140 µl da amostra. A solução resultante foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos e incubada em temperatura ambiente (22 °C) por 10 minutos. Finalizada a incubação a solução foi centrifugada rapidamente para remover as prováveis gotas presentes na tampa.

Foi adicionado 560 µL de etanol (96 - 100%) à mistura e esta foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos. Em seguida foi centrifugada para remover as prováveis gotas presentes na tampa. Cuidadosamente foi aplicado 630 µl da solução resultante para a coluna de *spin* do kit QIAamp (em tubo coletor de 2 mL), e centrifugada a 6000 x g (8000rpm) durante 1 minuto. A coluna de *spin* do QIAamp foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL, o qual foi descartado com a solução filtrada.

Cuidadosamente foi aberta a coluna de spin do QIAamp, e adicionado 500 µl de tampão AW1. O tubo foi fechado e centrifugado a 6000 x g por 1 minuto. Foi

colocado a coluna de spin do QIAamp em um novo tubo coletor de 2 mL, e o tubo descartado com o filtrado. Na coluna de spin do QIAamp foi adicionado 500µl de tampão AW2 e centrifugado a 20.000 x g durante 3 minutos. A coluna de spin do QIAamp foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL, e foi centrifugada em velocidade máxima durante 1 minuto. A coluna de *spin* do QIAamp foi colocada em um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 60 µl de tampão AVE e a coluna foi incubada durante 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugada a 6000 x g durante 1 minuto. O RNA viral purificado foi quantificado e armazenado na temperatura -80°C.

4.3.3. Sínteses da primeira fita de cDNA

A síntese do DNA complementar foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, lote 00577105)*. Foi preparado o *master mix* de RT para um número de reações de 4 amostras, portanto foram elaborados os seguintes volumes conforme indicados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Componentes da reação de síntese do cDNA por PCR.

Componentes	Volume (µL)
Tampão RT 10x	4,0
Mix dNTP 25x	3,2
Random Primers 10x	8,0
MultiScribe™ <i>Reverse Transcriptase</i>	4,0
Água livre de nucleasse	16,8
Total	40,0

Em 4 microtubos foram adicionados 10 µL do *master mix*, cada tubo contendo diluições diferentes de RNA (dois microtubos sem diluição da amostra e os outros dois microtubos com diluição de 1:10). Em todos os microtubos foram adicionados 10 µL de amostra de RNA purificado do vírus de GBV-8 e homogeneizados. Brevemente, foram centrifugados os 4 microtubos para obtenção de corpo de fundo e para eliminar as bolhas de ar. Os tubos foram colocados em gelo até serem utilizados no termociclador. As condições do termociclador são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Ciclo do termociclador para sínteses de cDNA.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo (minutos)	10	120	5	Indefinido

4.3.4. Síntese da segunda fita do cDNA (dsDNA)

Para a sínteses da segunda fita foi utilizado o kit *cDNA Synthesis System*. A mistura foi colocada na seguinte ordem segundo a **Tabela 4p**:

Tabela 4. Reagentes para síntese da fita dupla (dsDNA) por PCR.

Reagente	Volume (µL)
Sínteses da primeira fita de cDNA	40
Tampão X5	30
dNTP 10 mM	1,5
Mistura de enzimas	6,5
Água	72
Total	150

A mistura foi incubada a 16°C durante 2 horas. Logo após terminada a reação foi adicionado 20 µL de T4 DNA polimerase e o material foi incubado a 16°C durante 5 minutos. Para finalizar a reação foram adicionados 17 µL de EDTA 0,2 M a pH 8.0.

4.3.5. Digestão de RNA residual

Para a digestão do RNA residual, adicionou-se 1,5 µl (15 U) de RNase I ao tubo de reação e este foi mantido 30 minutos a 37°C. Para degradação da enzima foi adicionado 5 µl (0,25 U) de Proteinase K à reação e incubado por mais 30 minutos a 37°C.

4.3.6. Purificação da fita dupla de DNA (dsDNA)

O produto foi homogeneizado com o reagente de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:25:1) e centrifugado a temperatura ambiente a 1400 x g durante 5 minutos para separação de fases. Foi removida cuidadosamente a fase aquosa e transferida para um novo tubo de micro centrífuga. Para precipitação foi adicionado acetato de amônio seguido por etanol absoluto e centrifugado a 1400 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado com etanol 70% em gelo. Foi centrifugado a 1400 x g durante 2 minutos e descartado o sobrenadante. O pellet, basicamente de cDNA, foi seco a 37°C durante 10 minutos para evaporar o etanol residual e logo foi dissolvido em água tratada com Dieil Pirocarbonato (DEPC).

Para finalizar, a mostra de dsDNA foi quantificada em eletroforese com um gel de concentração de 1%. Foi utilizado um *ladder* de 1 kb como marcador.

4.3.7. Amplificação do gene de VP2 por PCR

A amplificação do gene de expressão VP2 foi realizada por PCR utilizando os primers RSG01 (*forward*) e o primer RSG02 (*reverse*) que foram diluídos em água ultrapura livre de DNase a partir de estoque a 100 µM. O ciclo utilizado está descrito na Tabela 5.

Foi preparada a seguinte composição:

- 10 µL tampão 10x
- 3 µL MgCl₂ 50 mM
- 8 µL dNTP 2,5 mM
- 10 µL primer RSG01 (5pmol/µL)
- 10 µL primer RSG02 (5pmol/µL)
- 47 µL de água livre de DNase
- 2 µL de Taq DNA Polimerase

Tabela 5. Ciclo do termociclador para amplificação da sequência VP2.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	95	37	85	4
Tempo (minutos)	10	120	5	Indefinido

4.3.8. Eletroforeses em gel de agarose do segmento de gene VP2

Foi preparado um gel de agarose ultrapura (Termo Fisher) em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), na porcentagem de 1%. A mistura foi aquecida em micro-ondas até a solução ficar homogênea e transparente. Depois, a solução foi esfriada a aproximadamente 50°C e logo foi adicionado 5 µL de brometo de etídio. A solução foi vertida na cuba de eletroforeses até solidificar a temperatura ambiente. À solução ainda morna foi colocado um pente para produzir os poços no gel. Des microlitros (10 µL) de amostra de cDNA foi misturado com 2 µL de tampão TBE 10x contendo azul de bromofenol e xileno cianol. Dez microlitros (10 µL) da mistura de amostra foi colocado nos poços do gel e 10 µL do marcador de massa molecular (*ladder*). A voltagem aplicada foi de 130V durante 60 minutos. Depois o gel foi visualizado em câmara de luz Ultravioleta.

4.2. Construção *in silico* do plasmídeo de transfecção

Para a construção do plasmídeo, o fragmento pre-VP2 XbaI-KpnI foi amplificado por PCR e logo inserido no vector pBluescript(SK⁺) (pBS(SK⁺)) para ser clonado. Pelo método de mutagêneses direta foi inserido um códon (TAG) de parada para criar a fase de leitura aberta (ORF) para a proteína VP2 (DARTEIL et al., 1995).

Para as sequências flanqueadoras, regiões adjacentes à região US3 do genoma de HVT foram selecionadas (1000 pb). Para a estratégia da clonagem foi escolhido o vetor pBR322. O vetor pCMV foi selecionado como sequência promotora para o gene de expressão VP2. Todo o processo foi realizado usando o software Snapgene.

5. RESULTADOS E DISCUSÕES

5.1. Extração e purificação dos genomas dos IBDV GBV-8 e HVT FC-126

Foram realizadas extrações e purificações do material genético dos vírus HVT FC-126 e IBDV GBV-8 a partir das amostras vacinais doadas pelo laboratório Biovet-Vaxxinova. Além disso, extrações e purificações foram realizadas após replicação em cultura de células de fibroblasto de embrião de galinha (DF-1) sem adição de soro fetal bovino (Figura 4).

As monocamadas de células apresentaram efeito citopático após 3 dias da infecção. As células MOCK apresentaram a estrutura característica das células de fibroblasto. As células apresentaram uma estrutura alongada com citoplasma ramificado e uma confluência celular aproximadamente de 100% (Figura 4A e 4C). As células que foram infectadas com cada vírus apresentaram efeito citopático com características diferentes.

Células infectadas com o HVT FC-126 não apresentaram lise celular. As células FEG mostraram estruturas redondas por formação de policariócitos aderidas em toda na superfície do poço da microplaca. Os policariócitos são gerados pela fusão entre várias células e condensação de núcleolos (Figura 4B). As células infectadas aderidas foram tripsinizadas, centrifugadas e resuspendidas em PBS para extração e purificação do genoma.

As células infectadas com o IBDV GBV-8 mostraram efeito citopático por lise celular com desprendimento de células no meio de cultura (Figura 4D). A suspensão da cultura de células infectadas foi coletada para extração e purificação do genoma.

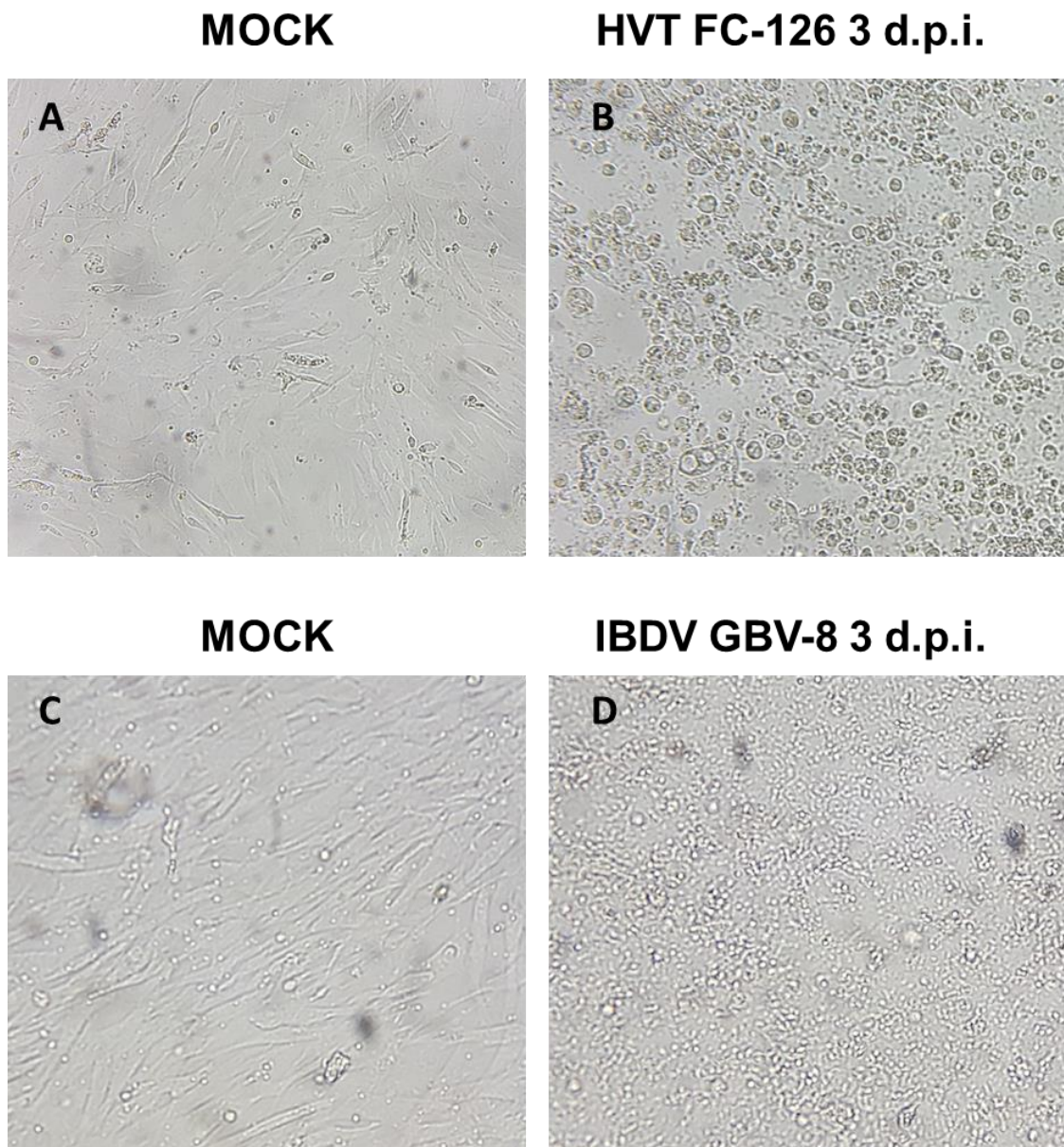


Figura 4. Células DF-1 infectadas com HVT FC-126 e IBDV GBV-8. **(A)** e **(C)** representam células normais (MOCK) primárias de embrião de galinha após de 3 dias de crescimento em meio MEM sem suplementação de soro fetal bovino. **(B)** Representa a infecção pelo vírus de HVT FC-12 depois de 3 dias de replicação. **(D)** Representa a infecção pelo vírus de IBDV GBV-8 depois de 3 dias de replicação.

Para a extração do genoma de RNA do vírus de Gumboro (GBV-8) foram realizadas duas centrifugações da amostra. A primeira centrifugação foi realizada com objetivo de remover células de fibroblasto de galinha (FEG) que ficaram na suspensão viral. A centrifugação foi realizada a 1500 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido a outro microtubo. Essa força gravitacional foi adequada para evitar a lises das células FEG que ficaram no sobrenadante e assim evitar o aumento de contaminação pelo material genético celular. Uma segunda centrifugação foi realizada

a 12000 x g durante 10 minutos para eliminar as debris celulares devido ao efeito citopático do IBDV GBV-8 nas células.

O material genético extraído e purificado de cada vírus, RNA (Gumboro GBV-8) e DNA (HVT FC-126), foi avaliado para determinar a concentração, assim como a pureza. Duas extrações com o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Roche) foram realizadas do IBDV GBV-8 a partir de duas amostras diferentes, uma extração de uma amostra vacinal e outra extração da amostra obtida da replicação viral em microplaca de FEG DF-1 (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da concentração e pureza do material genético extraído e purificado do IBDV GBV-8.

RNA Gumboro GBV-8	ng/μL	260/280	260/230
Amostra vacinal	1040,20	2,77	1,90
Amostra FEG	620,94	3,19	1,35

Nos resultados apresentados, era esperado que o material genético coletado pela amostra vacinal fosse maior que da amostra do IBDV replicada em FEG DF-1, conforme observado. Adicionalmente é importante avaliar a pureza do material. Os valores aceitos da razão de 260/280 são entre 2,0 – 2,1. Os maiores valores de absorbância obtidos podem ter sido originados da co-purificação com DNA celular, resultando num maior valor na absorbância no comprimento de onda de 260 nm. O valor aceitável da razão de 260/230 é de aproximadamente 2,0. Os resultados apresentados mostram que a amostra vacinal possui maior pureza. Este melhor valor de pureza pode estar relacionado ao baixo conteúdo de carboidratos.

A extração e purificação do material genético do HVT FC-126 foi realizada (cultura de células em FEG DF-1) por dois diferentes métodos (Tabela 7). Valores da concentração do material genético de 29,15 ng/ μ L e um alto valor de grau de pureza (260/280 = 2,047) foram obtidos com o kit de *DNeasy® Blood & Tissue*. Contrariamente, com a extração e purificação realizada com fenol:clorofórmio:álcool foi obtido uma concentração de 251 ng/ μ L (concentração aproximadamente 9 vezes

maior comparada com o do kit). Ademais, a pureza do material teve como resultado um valor inferior ao aceitável ($260/280 = 1,6$), isto pode ser devido a possível contaminação com fenol. A vantagem do método de extração e purificação com fenol:clorofórmio:álcool é a possibilidade obter maior quantidade de material genético.

Tabela 7. Resultados de concentração e pureza do material genético extraído e purificado do HVT FC-126.

DNA HVT FC-126	ng/ μ L	260/280
kit de <i>DNeasy® Blood & Tissue</i>	29,15	2,04
fenol:clorofórmio:alcohol	250,96	1,57

Depois da síntese do dsDNA a partir do RNA do IBDV, foi realizado um gel de eletroforeses. No gel esperava-se observar duas bandas de 3,2 kb e 2,8 kb, correspondentes ao segmento A e B, respectivamente. Entretanto não foi possível observar as bandas correspondentes ao genoma do IBDV GBV-8. Isto pode estar relacionado às impurezas (DNA e RNA celular contidos na suspensão viral) que foram co-purificadas junto com o RNA viral e produziram uma baixa transcrição do RNA viral.

Para verificar se o processo de extração e purificação de material de RNA foi adequado seria necessária uma eletroforese em condições desnaturantes. Nesse sentido, a qualidade das moléculas de RNA pode ser analisada em gel de agarose com tampão (TBE, TAE) com água DEPC em gel desnaturante. Isto ocorre devido a interações intramoleculares onde as moléculas de RNA podem dobrar-se, alterando sua estrutura secundária e afetando a migração das moléculas no gel. O gel desnaturante poderia solucionar este problema pois sob condições desnaturantes as pontes de hidrogênio são rompidas e o RNA migra como molécula de fita simples. Isto permitiria avaliar com acuracidade a qualidade e o peso molecular do RNA. Sugere-se a adição de um controle de extração de RNA para realizar a análise de eletroforese.

As eletroforeses em gel de agarose (dsDNA) para avaliar a extração e purificação do RNA do IBDV assim como o processo de síntese da fita dupla de DNA (dsDNA) foram realizados com sucesso. Para isso, a amostra de dsDNA foi quantificada, obtendo-se uma concentração de DNA de 2690 ng/ μ L e pureza de 1,8

(260/280). Estes valores, entretanto, não representam a concentração e pureza da amostra, uma vez que há a possibilidade de que o dNTP restante após o PCR invalide a quantificação. Isto ocorre porque estes contaminantes (dNTP) superestimam os valores de quantificação e o grau de pureza, já que as enzimas que foram adicionadas à reação aumentam a absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Por isso foi requerida uma análise de eletroforese em gel de agarose adicional que revelou a ausência de bandas.

Com o intuito de elucidar as possíveis causas da não visualização do material sintetizado, foi realizada a eletroforese da amostra após da síntese da fita dupla de cDNA com o kit *cDNA Synthesis System*. Na imagem do gel (Figura 5) foi observado em cada poço um arraste de material sintetizado. Este fato sugere que não foi purificado unicamente os segmentos A e B do genoma de Gumboro mas provavelmente também foi co-purificado contaminantes de DNA celular contidos na amostra.

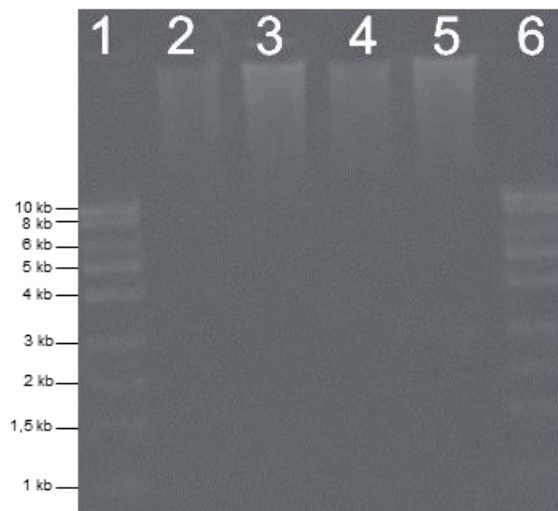


Figura 5. Gel de eletroforese do material após da síntese da fita dupla de DNA da amostra de IBDV GBV-8 (4 amostras, coluna 2, 3, 4 e 5). Foi usado um *ladder* de 1 kb (coluna 1 e 6).

Para aumentar a qualidade da extração de RNA, assim como também da síntese do dsDNA, deve ser realizada a digestão da amostra com DNase e RNase previamente à lise viral. Esta digestão deve eliminar as impurezas de ácidos nucleicos liberados durante a replicação viral devido ao efeito citopático do vírus de Gumboro. Recomenda-se a purificação do material sintetizado de modo diferente ao utilizado

(purificação de dsDNA com fenol:cloroformo:alcohol de isoamil) possivelmente utilizando o kit *High Pure PCR Product Purification* para melhores resultados.

5.2. Estudo *in silico*

Para o estudo foi utilizado o software *Snapgene* para (I) a montagem da estratégia de clonagem do gene de expressão da proteína VP2, (II) a clonagem dos flaqueadores homólogos ao genoma do HVT FC-126, (III) a clonagem da sequência promotora e da sequência de terminação possibilitando a obtenção do vetor final para transfecção em células FEG.

5.2.1. Clonagem do gene VP2 no vetor pBluescript SK (+) e inserção de códon de parada

Para amplificação por PCR de sobreposição do gene da proteína pre-VP2 do IBDV (1359 pb), foram desenhados os seguintes primers: Primer-*foward* (GCTCTAGAATGACAAACCTGCAAGATCAAACCC) e o primer-*reverse* (GGGGTACCCCTCCTTATGGCCCGGATTATGTC). Os primers usados no PCR foram desenhados com o objetivo de inserir sequências com sítios de restrição para as enzimas XbaI e KpnI, respectivamente. O fragmento de nucleotídeos XbaI-KpnI contendo a proteína pre-VP2 foi inserido no vetor pBluescript SK (+) para clonagem (Figura 6).

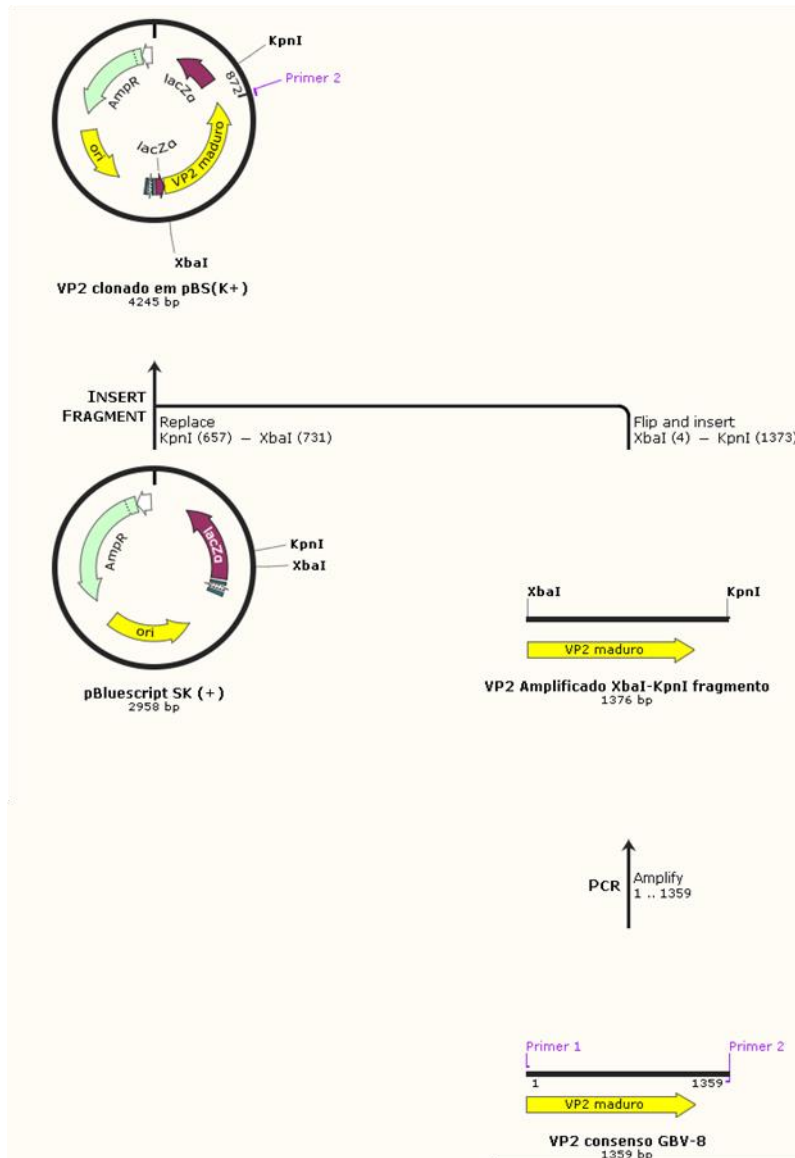


Figura 6. Estratégia de clonagem do segmento contendo o gene da proteína VP2 no vetor pBluescript SK (+) com inserção de sítios de restrição usando PCR por sobreposição.

Dentro do segmento *XbaI-KpnI* clonado no vetor pBluescript SK (+) se encontra a sequência da proteína pre-VP2. Com objetivo de obter a proteína estrutural viral VP2 madura a partir do gene da proteína pre-VP2, foi realizada uma mutagênese direta *QuickChange* (Figura 7B) para substituição dos nucleotídeos G e T nas posições 872 e 874, respectivamente. Para isso foram usados os seguintes primers: GGCCGTATTCTGTGACCAGTTACTTTGCTAGTTCAGGATTT e AAATCCTGAACTAGCAAAGTAACTGGTCACAGAATACGGCC

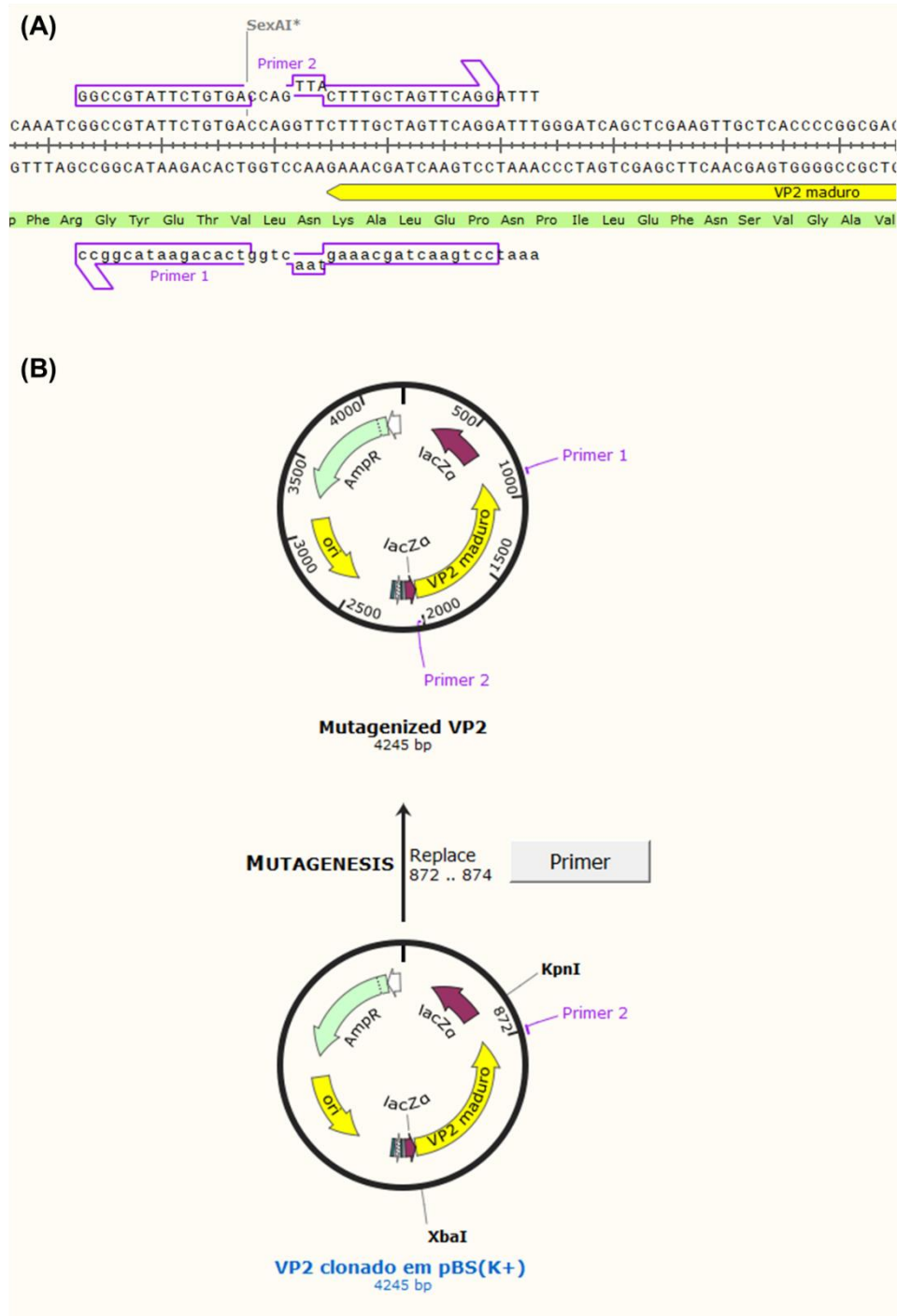


Figura 7. Mutagênese para inserção de códon de parada para criar o ORF de expressão para a proteína VP2 madura. **(A)** PCR por sobreposição para mutagênese direta para inserção do conteúdo do códon de parada TAG. **(B)** Plasmídeo com o ORF construído para gerar a sequência da proteína VP2 madura.

5.2.2. Amplificação das sequências flanqueadoras (UP e DOWN)

O genoma do HVT FC-126 possui 159.160 bp (aceso NCBI NC_002641). Diferentes estudos avaliaram regiões codificadoras de proteínas que não tenham

influencia na replicação viral em cultura de célula quando os genes são deletados. Foi demonstrado que é possível inserir genes endógenos nas regiões US2, US3, US6, US7 e UL40 no genoma do vírus de Marek (DARTEIL et al., 1995; SAKAGUCHI et al., 1993) sem alterar a replicação viral em cultura de célula.

Neste estudo foi selecionada a região codificadora da proteína quinase serina/treonina localizada na região US3 do genoma do HVT FC-126 (Nº de acesso NCBI NP_073375) para inserir o gene de expressão da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8. Para a análise *in silico*, a amostra de DNA purificada do genoma do HVT FC-126 é digerida com a enzima de restrição HindIII (Figura 8A). Diferentes fragmentos HindIII com diversos tamanhos foram obtidos. O fragmento HindIII com 52.925 pb é o maior tamanho apresentado na simulação da eletroforese em gel de agarose (Figura 8B).

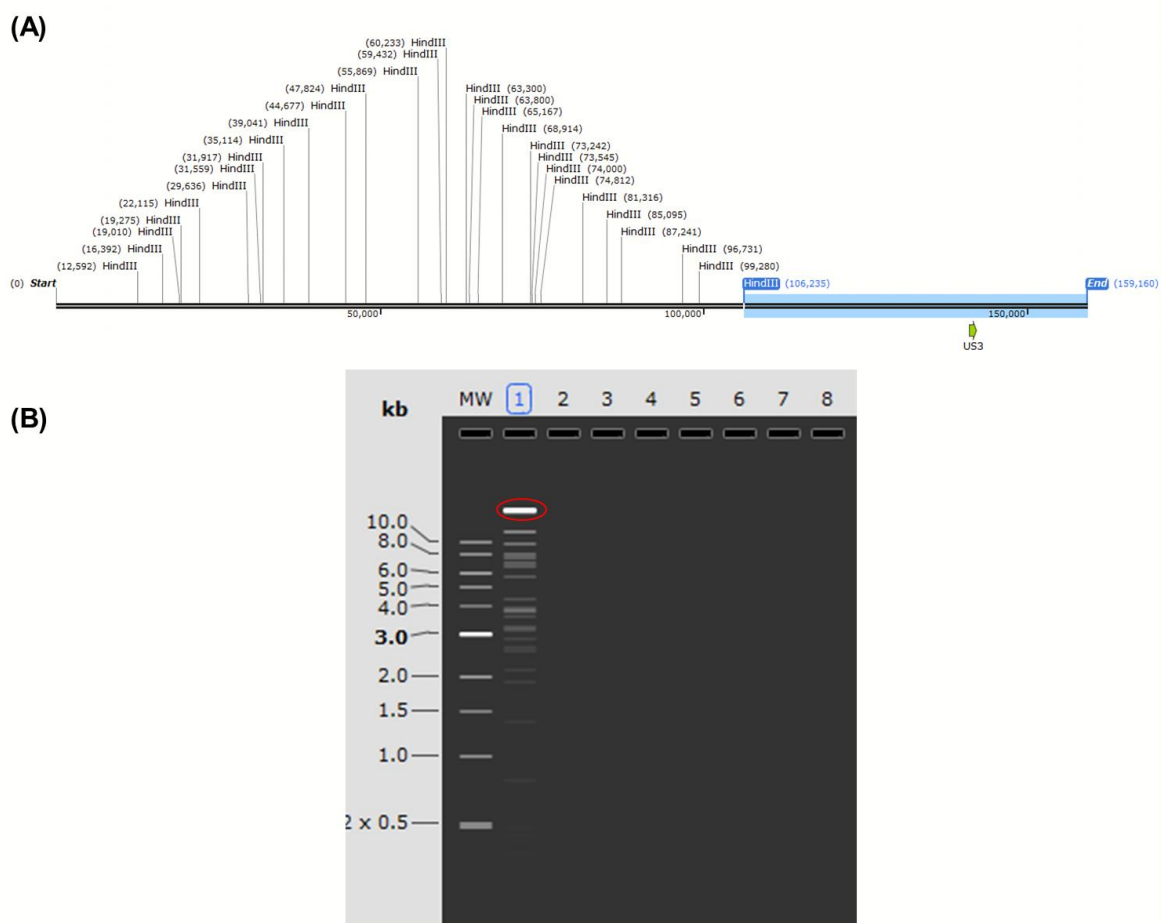


Figura 8. Resultados *in silico* do Genoma do HVT FC-126 com a enzima de restrição HindIII. **(A)** Mapa de restrição do genoma do HVT FC-126 com a enzima HindIII. **(B)** Gel de agarose 1% mostrando o maior fragmento contendo a região US3 (52 925 pb) em círculo vermelho.

Uma segunda digestão com a enzima BamHI é realizada a partir do maior fragmento HindIII do DNA do HVT com o objetivo de gerar um fragmento BamHI de 28.897 pb (Figura 9A). Na simulação da eletroforese de gel de agarose é possível identificar seis bandas com diferentes tamanhos. A banda com o maior tamanho identificado contém a região US3 (Figura 9B).

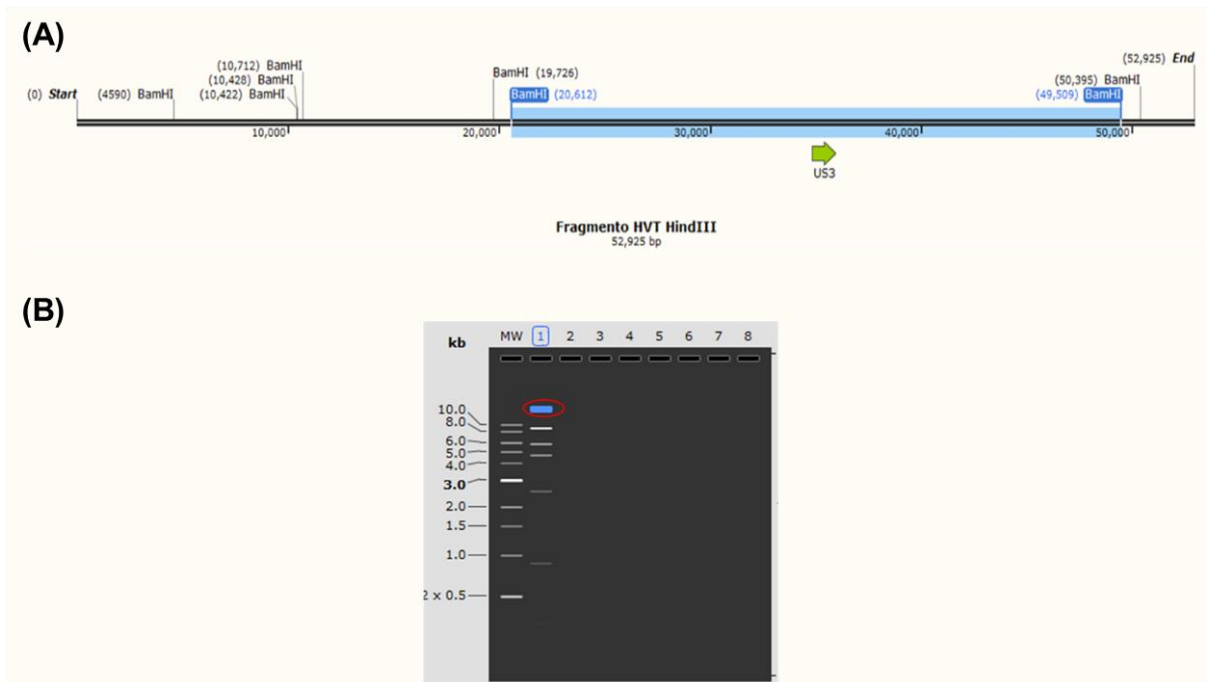


Figura 9. Resultados *in silico* do do fragmento HindIII com a enzima de restrição BamHI **(A)** Mapa de restrição do fragmento HindIII (52 925 pb) do DNA do HVT com a enzima BamHI. **(B)** Gel de agarose 1% mostrando o maior fragmento (28 897 pb) contendo a região US3.

O fragmento BamHI (28.897 pb) do DNA do HVT contendo a região US3 foi inserido e clonado no vetor pBR322 (Figura 10). As sequências flanqueadoras escolhidas são formadas por 1000 pb. Posteriormente, foram desenhados primers para amplificação por PCR por sobreposição das regiões flanqueadoras (UP e DOWN) à região US3 a partir do vetor pBR322-fragmento BamHI. Para amplificação do segmento flanqueador DOWN foram usados os primers CGGAATTCCGCCGCCACGTATGTAATTTTC e CGAGCTCGTTTATCTACTATTGAATTTTCCCCTATCTGTGATACAC para a inserção de sequências com os sítios de restrição para as enzimas SacI e EcoRI (Figura 10A), respectivamente. Da mesma forma, para amplificação do segmento flanqueador TOP foram usados os primers

CCGCTCGAGCGGTATACAGGCGGGAGC e
 CCCAAGCTTATTGTGCAATGTTGCATTGGC para inserir sequências com os sítios
 de restrição para as enzimas XhoI e HindIII (Figura 10B), respectivamente.

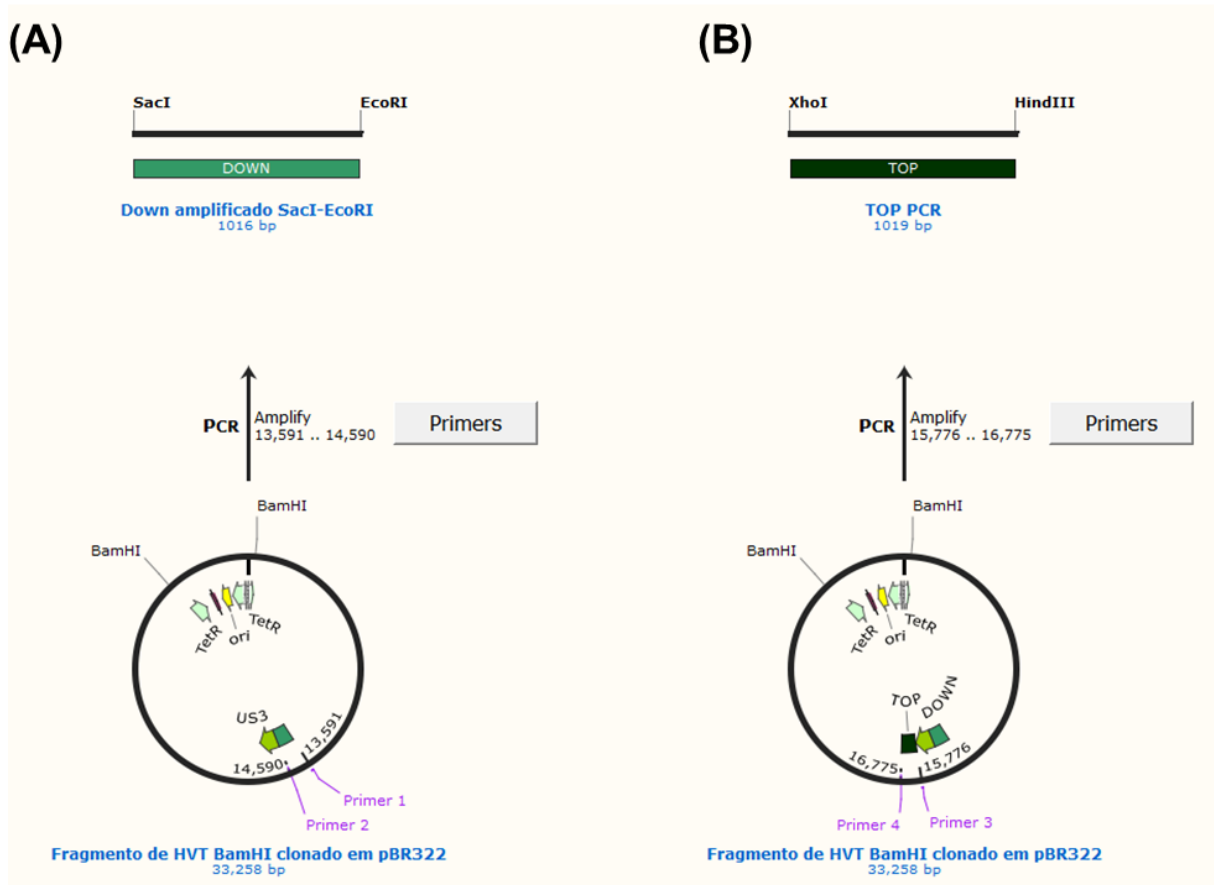


Figura 10. Amplificação por PCR das regiões flangeadoras (DOWN e TOP) do segmento US3 com inserção de sequências de restrição. **(A)** Amplificação do segmento DOWN por PCR por sobreposição para inserção dos sítios de restrição SacI e EcoRI. **(B)** Amplificação do Segmento TOP por PCR por Sobreposição para inserção dos sítios de restrição XhoI e HindIII.

5.2.3. Inserção da sequência flangeadora TOP no vetor pCMV.

Foi selecionado o vetor pCMV-beta (APÊNDICE 1) com o objetivo de criar um fragmento maior contendo o promotor de citomegalovírus (CMV) para a expressão do gene da proteína VP2. O vetor pCMV-beta foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII e o fragmento correspondente ao flangeador TOP foi inserido no vetor. O vetor resultante foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII para obter o fragmento com as sequências do promotor CMV-LacZ-SV40 poli(A) sinal e o flangeador TOP (Figura 11).

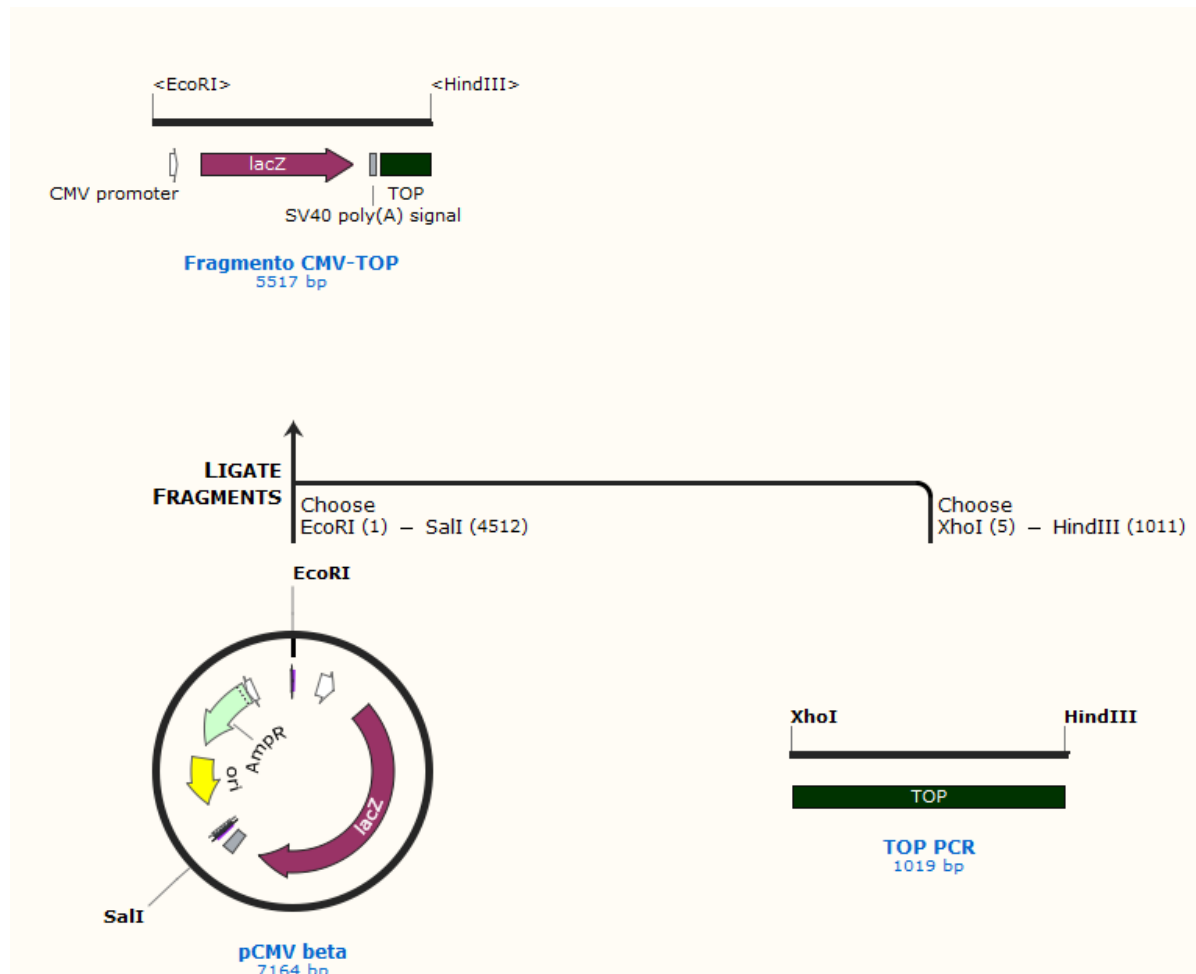


Figura 11. Inserção do fragmento flaqueador TOP no sítio XhoI-HindIII do vetor pCMV-beta para formação do fragmento CMV-LacZ-Poli(A) SV40-DOWN.

5.2.4. Inserção dos fragmentos CMV-Poli(A) SV40-TOP e DOWN.

O fragmento SacI-EcoRI DOWN amplificado por PCR por sobreposição foi inserido e clonado no vetor pBlueScript SK(+). O vetor resultante foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII para a inserção e clonagem do segmento CMV-LacZ-Poli(A) SV40-DOWN no vetor (Figura 12).

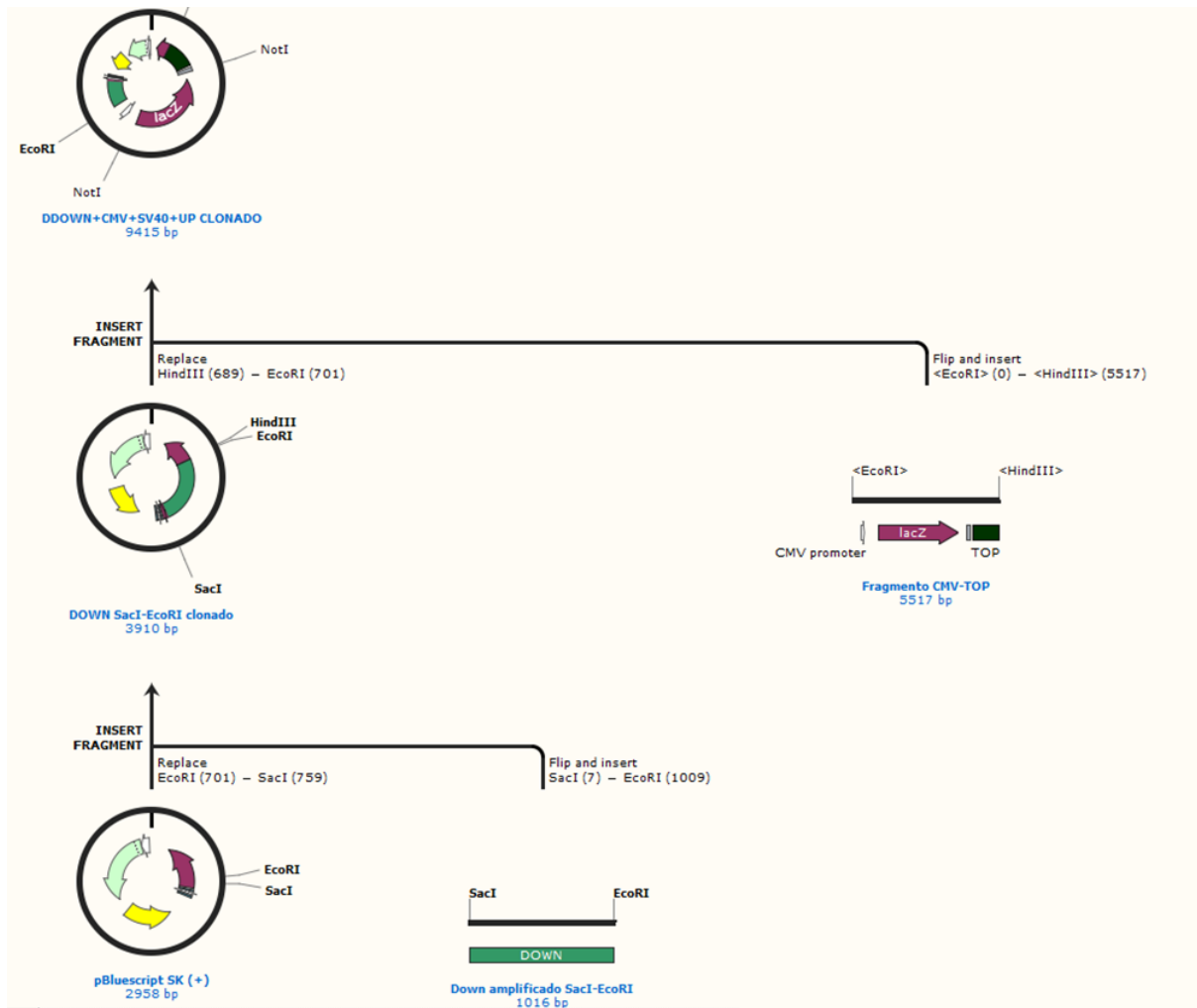


Figura 12. Estratégia para construção do vetor com os flaqueadores da região US3 (DOWN e TOP) do genoma do HVT DC-126, junto com o promotor CMV e a sequência poli (A) sinal SV40. O fragmento CMV-Poli(A) SV40-DOWN amplificado por PCR de sobreposição foi inserido no sítio HindIII-EcoRI do vetor contendo o flaqueador pBlueScript-DOWN.

5.2.5. Inserção da sequência codificadora da proteína VP2 madura

A sequência codificadora da proteína VP2 foi amplificada por PCR por sobreposição. Os primers utilizados foram os seguintes: CGTACGGCCGTATTCTGTGACCAGTTACTTTG e CCCGGGTGGCGGCCG'CTCTAGAAT, utilizados para inserção de nucleotídeos para os sítios de restrição das enzimas BsiWI e XmaI, respectivamente. A inserção da sequência codificadora da proteína VP2 madura no vetor TOP-LacZ-SV40 poli(A)-DOWN foi realizada mediante a digestão com as enzimas de restrição BsiWI e XmaI. A estratégia foi eliminar a sequencias codificadora LacZ e em seu lugar inserir o gene codificador da proteína VP2 madura BsiWI-XmaI.

O vetor final (Figura 13) contém as sequências flanqueadoras 5' e 3' US3 HVT entorno ao gene codificador da proteína VP2 do IBDV GBV-8 sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV) (APÊNDICE 2). A região do promotor CMV usado na construção contém uma região finalizadora da transcrição poli (A) sinal SV40. O plasmídeo final construído possui 7119 pb (APÊNDICE 3).

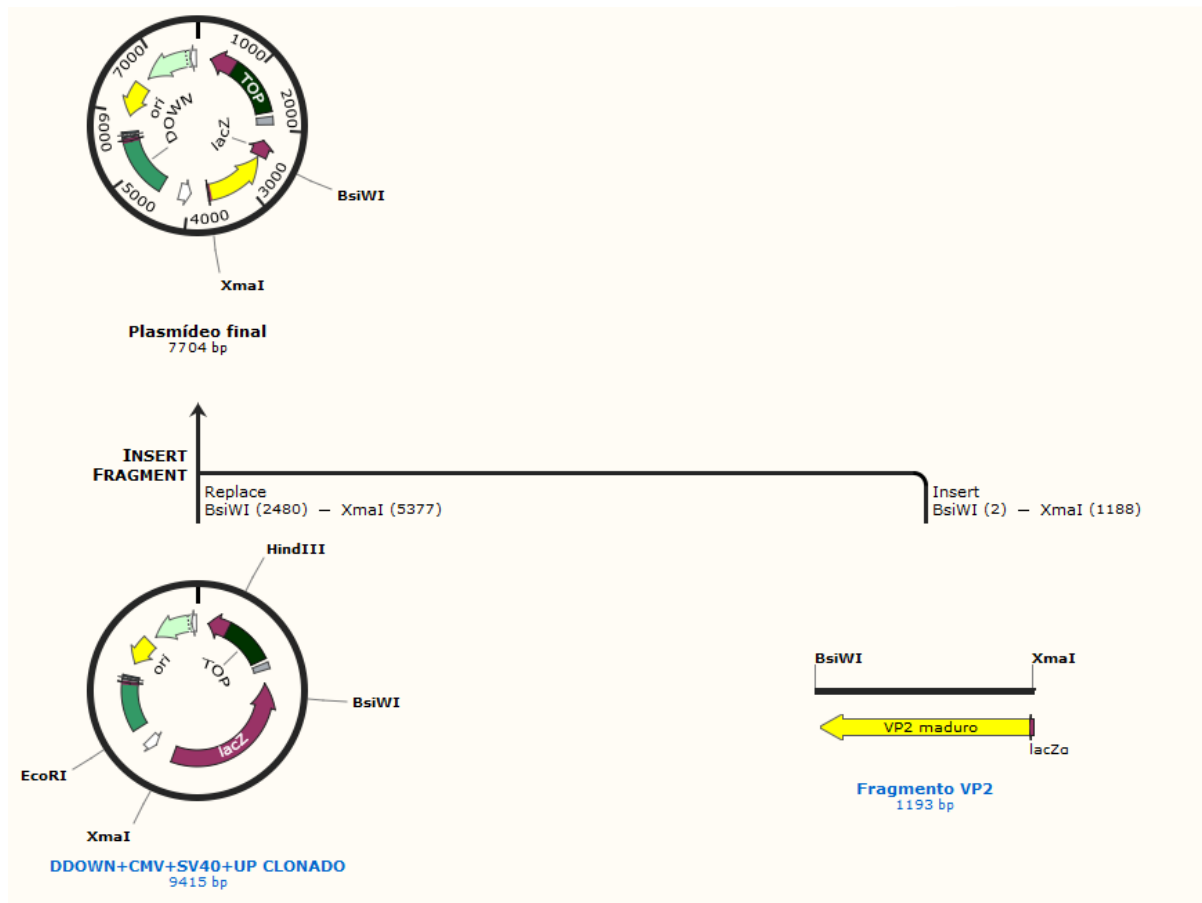


Figura 13. Estratégia a construção do vetor final (DOWN-CMV-VP2-Poli(A) SV40-UP) para usar na transfeção do HVT em células fibroblasto de embrião de galinha (FEG).

5.3. Ensaio de sensibilidade das células UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220

O objetivo do ensaio foi identificar possíveis antibióticos e a que concentração estes produzem efeito citotóxico nas células UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220. Isto foi feito com o intuito de escolher genes de resistência que possam ser inseridos no vetor final como marcador de seleção na transfeção. Com isso será possível selecionar aquelas células que foram infectadas com o HVT recombinante para posterior isolamento do vírus. As concentrações de antibiótico foram selecionadas quando foram observados efeitos citotóxicos próximo a 100%.

Os antibióticos utilizados foram blasticidina, G418 e a higromicina. As células com blasticidina mostraram início de efeito citotóxico entre as concentrações de 10-25 µg/mL quando incubadas por 2 dias. Nas mesmas concentrações, foi observado efeito citopático quando as células foram incubadas por 7 dias (Figura 14A).

Nas concentrações superiores a 750 µg/mL de G418 se observou efeito citotóxico quando as células foram incubadas durante 2 dias. E nas concentrações superiores de 200 µg/mL de G418, o efeito citotóxico foi notável quando a incubação foi realizada durante 7 dias (Figura 14B).

Com o antibiótico higromicina as células apresentaram efeito citotóxico às concentrações superiores a 750 µg/mL incubadas por 2 dias. Na concentração de 100 µg/ml de higromicina foi observado um evidente efeito citopático após 7 dias de crescimento celular (Figura 14C). Portanto, é possível usar os 3 antibióticos para selecionar as células infetadas com HVT recombinante contendo o gene resistência de interesse.

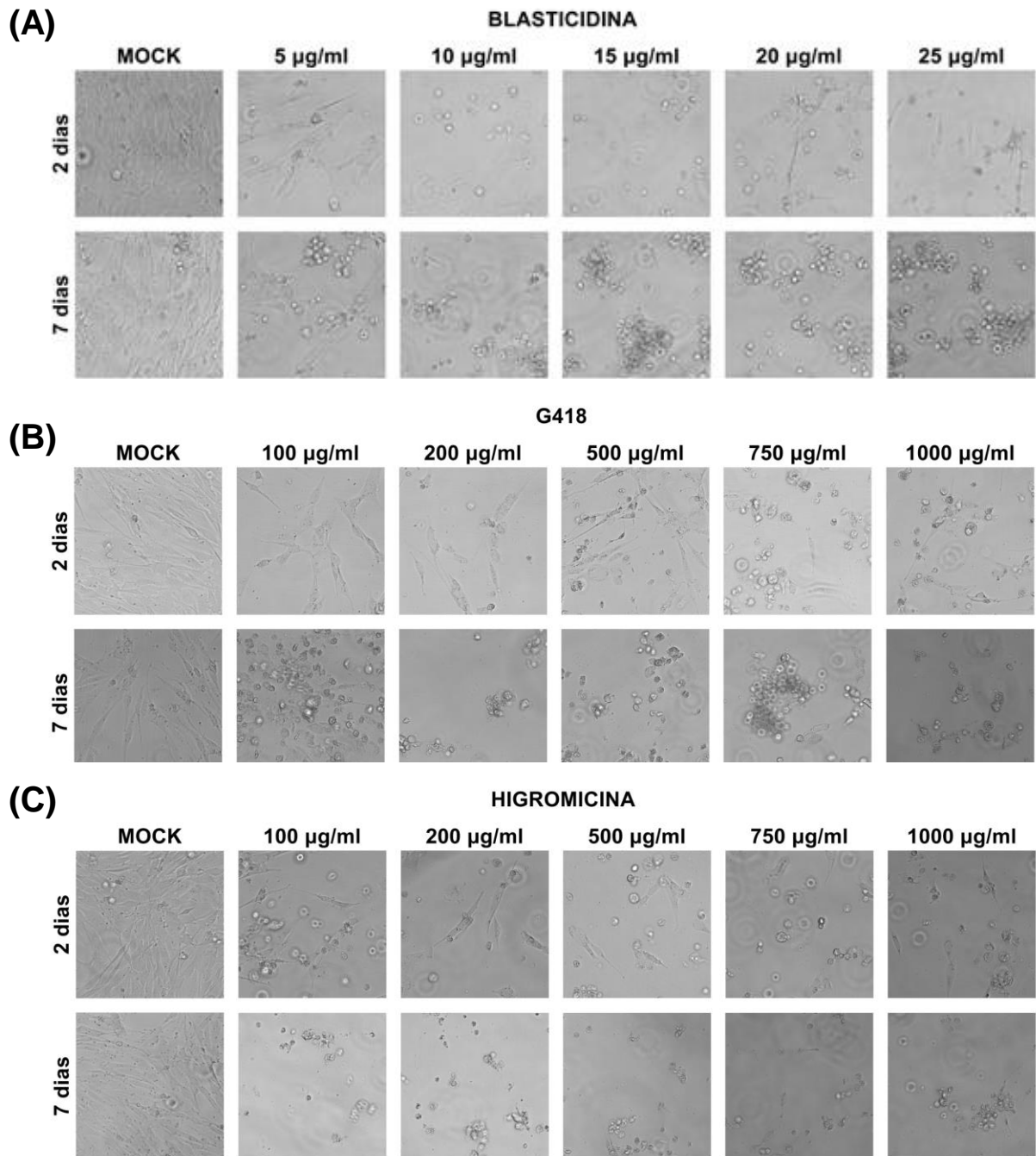


Figura 14. Estudo de sensibilidade a antibióticos com diferentes concentrações e tempos de incubação em células UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220. **(A)** Células FEG com diferentes concentrações blastidina (5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL) com tempos de incubação de 2 e 7 dias. **(B)** Células FEG com diferentes concentrações G418 (100, 200, 500, 750 e 1000 µg/mL) com tempos de incubação de 2 e 7 dias **(C)** Células com diferentes concentrações hidromicina (100, 200, 500, 750 e 1000 µg/mL) com tempos de incubação de 2 e 7 dias.

6. CONCLUSÕES

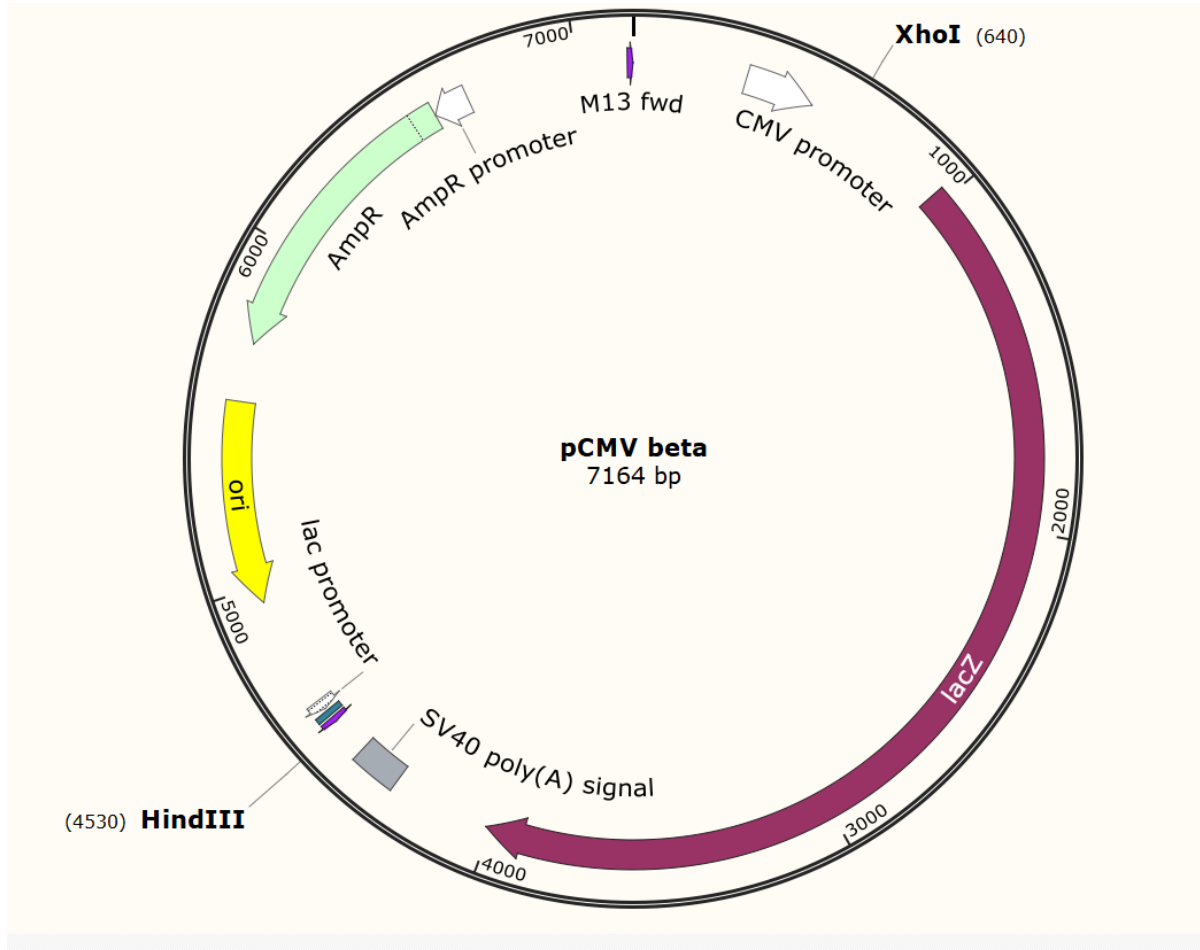
O processo da síntese do dsDNA do genoma do vírus de Gumboro GBV-8 foi realizado a partir do genoma total. Alternativamente, sugere-se realizar a síntese do dsDNA a partir de uma extração de mRNA em cultura de células de fibroblasto de galinha (FEG). Para a sínteses de dsDNA a partir de mRNA, há a possibilidade do uso do kit *cDNA Synthesis System*, já que este possui os primers oligo(dT) para se anelar na cauda poli (A) do mRNA. Com o mesmo kit é possível a síntese da fita dupla de DNA (dsDNA).

Foi possível realizar, pelo método *in silico*, a construção do vetor final (sem a inserção do gene de resistência para seleção da células) usando sequências flanqueadoras (sequências adjacentes) de 1000 pb da região US3 do genoma de HVT FC-126. Também, na construção do vetor final, foi usado o promotor de citomegalovírus (CMV) para o controle da expressão do gene da proteína VP2 e foi adicionada a sequência de terminação da transcrição poli(A) SV40.

O com o teste de sensibilidade a antibióticos (blastomicina, G418 e higromicina) para as células FEG imortalizadas (UMNSAH/DF-1 ATCC® CRL-1220) foi possível observar o efeito citopático com diferentes concentrações dos antibióticos. Um possível gene de resistência para ser utilizado na construção do plasmídeo de transfeção em células FEG, pode ser o vetor pcDNA3.1D V5-His-TOPO (APÊNDICE 4), uma vez que este possui o gene de resistência a neomicina e a canamicina (gene NeoR/KanR). Este gene pode ajudar a sobrevivência de células tratadas com o antibiótico G418. Se a introdução do gene NeoR/KanR for bem-sucedida, as células FEG transfectadas com o vetor poderão sobreviver em meio tratado com G418. Portanto, as células infectadas com o vírus recombinante podem tornar-se células resistentes a G418. Além disso, o vetor pcDNA3.1D V5-His-TOPO também pode ser utilizado para obtenção do gene promotor de citomegalovírus (CMV) possuindo também, em região próxima, um potencializador de CMV que pode ajudar a uma maior expressão do gene da proteína VP2 do vírus de Gumboro GBV-8.

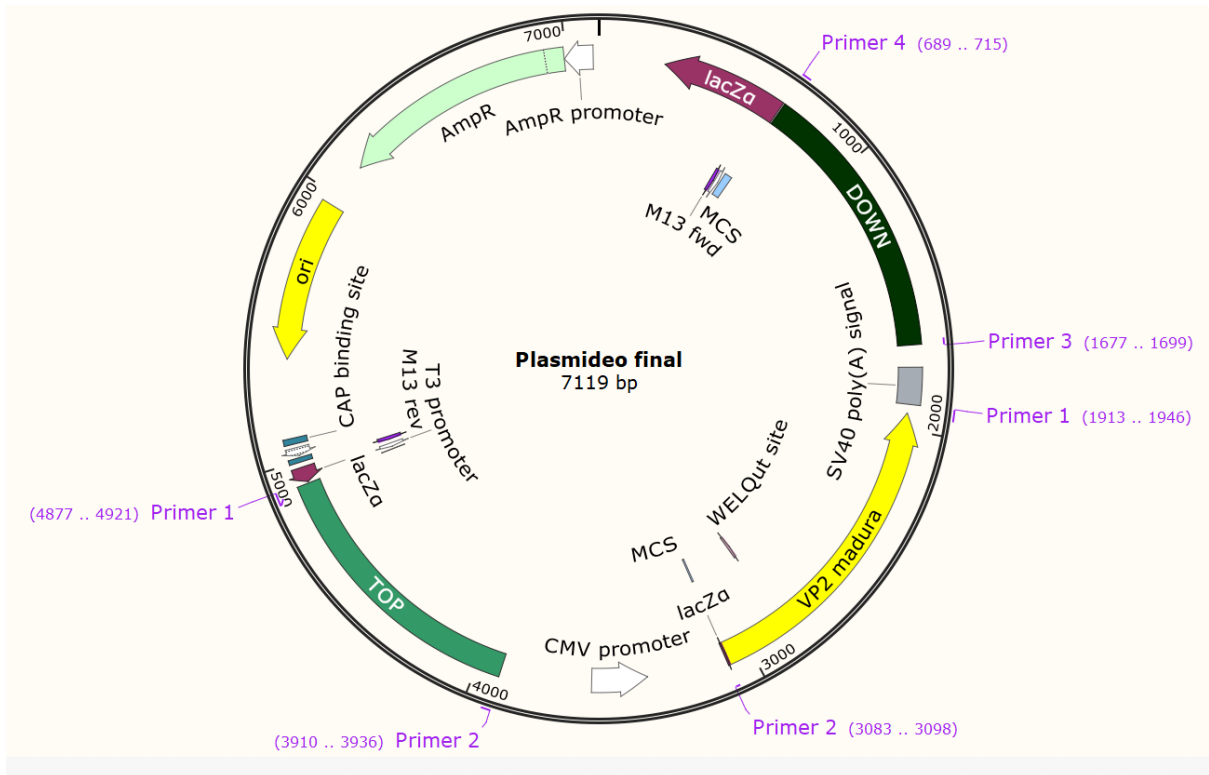
APÊNDICE 1

Vetor pCMV-beta usado para inserir e clonar o gene de expressão a proteína VP2



APÊNDICE 2

Plasmídeo final para transfeção em células FEG



APÊNDICE 3

>Sequência de nucleotídeos do Plasmídeo final (7119 bp)

SEQUÊNCIA DOWN

PROMOTOR CMV

SEQUÊNCIA VP2 MADURA

POLI (A) SINAL SV40

SEQUÊNCIA TOP

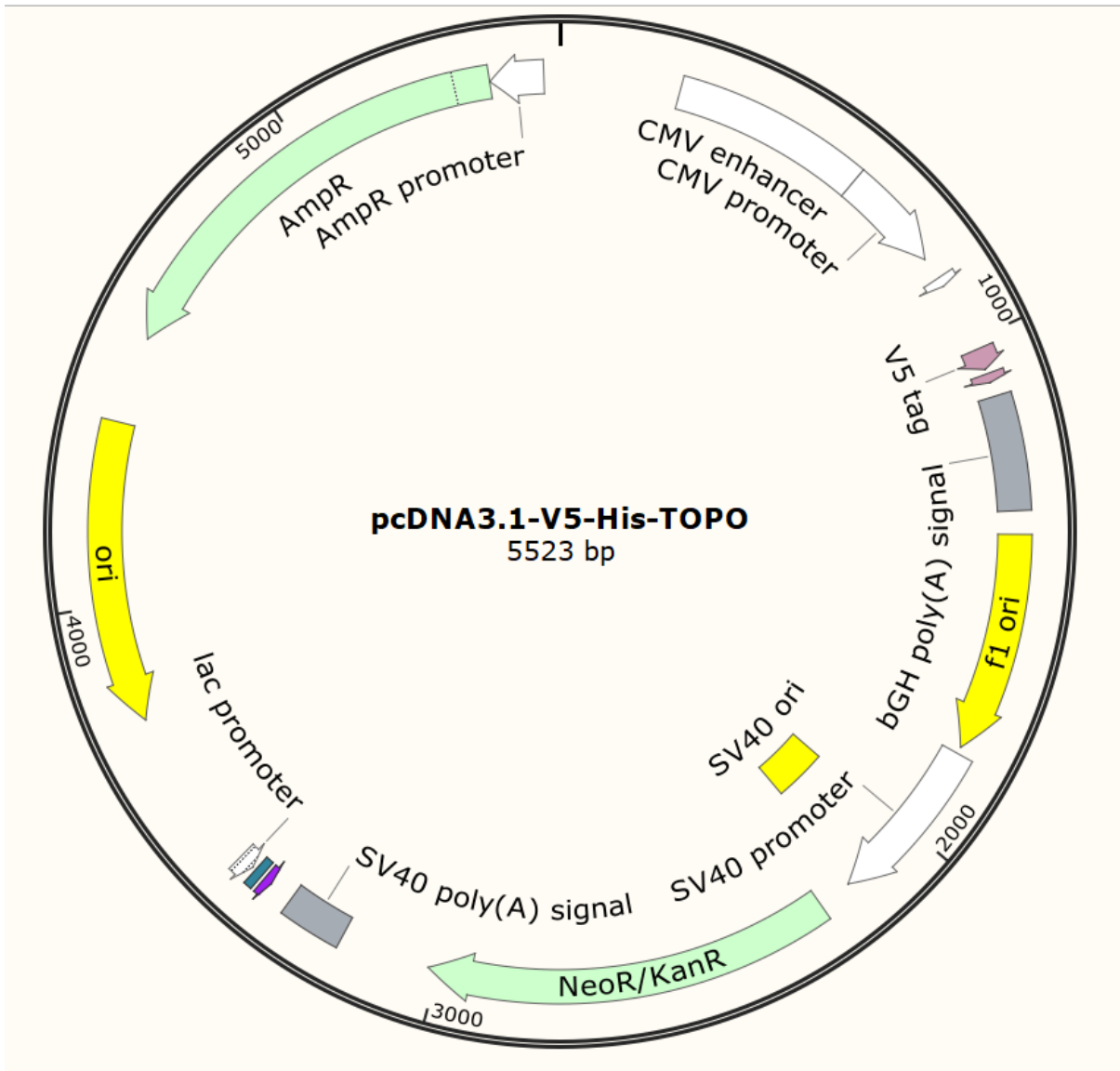
CACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAA
 TAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTT
 GGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATG
 GCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCT
 AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAAG
 CGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCG
 CTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGC
 GGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG
 GGTTTTCCAGTCACGACGTTGAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG
 TACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTATTGTGCAATGTTGCATTGGCAAAGAAATGAAA
 GGGTTTGATAATGTATCATCTTCTATTCCAGTCTTTGAAAAGGCACATGCCACTTAAACATTAAACATTATATC
 GGCCGTAGTAAAGTCCCCGTTGACAACACTACGCGCGTATATAAACCATCTAATTCTCGGGACGGCGCTGCA
 AAAACCAGCTGTAATTCGTGCGGAGAAATGAAACTGGTTGAGACGTAGCGCCTGTCCCACCATCCAGGAGAGC
 TCATAGAACATGTGCCAAAAGGCTCATTTGTCGAGCAGTTATAAAATTCGCGCAAATATATTAATCTGGCACAC
 ATTTTACCGAGAACAACCACGCGACCGTCGCATCATATTTGCGCCTTCCCATTAGAAGCTGGCTCAAAGGAC
 ATATTTGGGGTCACTTATAGGATTGAGTACAGCGAAGCCACAGTTTTTCATCGTAGATTACATGTTTTGTGGGAT
 AAGAGTTTTCCGTTGATACAAATAATGGCGTGGGTATTCTAATATTGGTTGACTTATCCGTGATATAATCTTCA
 GATTTTCTTTGTTGTCAGACTTGGACGAAACAAGCGCTATTACGATTCCAAACAACACCAGAACATCATGAAT
 GTCGAAGCCATCTTCAAGTGGTGACAATAATCATCACACAAGAGTGCACAGATTTAGCATTTTCAAGTTCA
 ACTCAGTATTTGGTACTCACGCGAGAAGACGCCCCGCGGACTATTCGGATTCTGGGTATTCTAAACACGTTAT
 GTACTTTATATTCGTAACCTTCGACATGAGTCGCCCGTCTCTTACAACCTATCAAATGTTACTCGCAGTAGAACA
 TAGCAATTTAACTAATTGTTGTAGACATATCCAAGAAACCAATATGGCGTTTCAGTTCTCAATGAATCAGTTA
 ATTTATCAATCAACAATTCAAAATATAAATTCTCAAGTGGTGATGATGACGCCACGACCCGCTCCCGCCTGTAT
 ACCGCTCGActctagaggatccgaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaacataaaatgaatgcaattgttgttgaactgttta
 ttgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagtgtggtttgtccaaactc
 atcaatgtatcttatcatgtctggatccccgcGGCCGCGCCGTATTCTGTGACCAGTTACTTTGCTAGTTTCAGGATTTGGGA
 TCAGCTCGAAGTTGCTACCCCGGCGACCGTAACGACAGATCCTGTTGCCACTCTTTCGTAGGCTACTAGTGTG
 ACGGGACGGAGGGCCCCTGGATAGTTGCCACCGTGGATCGTCACTGCTAGGCTCCCATTGCTGACCATGACA
 TCTGATCCCCCGCTGACCACCACTTTTGGAGGTCACTATCTCCAGTTTGTGATGGATGTGATTGGCTGGGTTATCT
 CGTTGGTTGGAATACAATATTGAATGGCATAAGGTTGTCAGTGCCGGCCGTAGCCCATTGTCTGCGGCCAC
 AGCTCTGGTGATTACCGCAGTCCCATCAAAGCCTATAAGGTAGATGGTAGCGCCAGTATAAGGCCTTGACG
 CTTGTTTGAACACGAGTTCTCCCCGATGCTGAGGCTTGTGATGGCATCGATGTTGGCTGAGAACAGTGTGA
 TTGTTACCCACCTGCTTGGTACTGTGATGAGAATTGGTAATCATCGGCTGCAGTTATGGTGTAGACTCTGGGC
 CTGTCACTGCTGCACATGTTGCTACCATTTTTGGGTCGAGCCCTATAGCGGGTATGGGGTCACCGAGTCTCAC
 ATACCAAGATCATATGATGTGGTAAGCTGAGGACAGTTACCCCTTCCCCTACTAGGACGTTCCCATTGTTGT
 CGTTGATGTTGGCTGTTGCAGACATCAACCCATTGTAGCTAACATCTGTCAGTTCACTCAGGCTTCTTGGAA
 GTCACGGCGTTTATGGTGCCATTTAGTGCATAAACGCCACCAGGGAGTGTGCTTGACCTCACTGTGAGACTCC

GACTCACTAGCCTGCAGTAGTTGTAGCTGGCCGGTAGGTTCTGGGCAGTCAGGAGCATCTGATCGAACTTGTA
 GTTCCCATTGCTCTGCAGTGTGTAGTGAGCACCCACAATTGAGCCAGGGAAACCAGGGAAAAAGACAATTAGC
 CCTGACCCTGTGTCCCCACAGTCAAATTGTAGGTCGAGGTTCTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTCTAGGGTGTG
 GTCCGGAATGGACGCCGGTCCGGTTGTTGGCATCAGAAGGCTCCGTATGAACGGAACAATCTGTTGGGTTTGA
 TCTTGACAGTTTGTCACTTAGAGCggccgagggtacaattccgcagcttttagagcagaagtaacacttccgtacaggcctagaagt
 aaaggcaacatccactgaggagcagttccttgattgaccaccaccggatccgggacgtgaaataaaagacaaaaagactaaacttaccagtt
 aactttctggtttttagttcctcgagtaccggatccttagagtcggaggctggatcgggtccgggtgtcttctatggaggtcaaacagcgtgga
 tggcgtctccaggcgtctgacggttcactaaacgagctctgcttatatagacctcccaccgtacacgcctaccgccatttgcgtcaatggggcg
 gaggttgttacgacatttggaaagtcctgtgatttgggcaaaaactcccattgacgtcaatgggggtggagacttggaaatccccgtgag
 tcaaacgctatccacgcccattgatgtactgcaaaaaccgcatcacatggttaatagcgatgactaatacgtagatgactgccaagtaggaaa
 gtcccataaggtcatgtactgggcataatgccaggcgggcccattaccgtcattgacgtcaatagggggcgtacttggcatatgatacacttgatg
 tactgccaagtgggcagtttaccgtaatactccaccattgacgtcaatggaaagtcctattggcgttactatgggaacatacgtcattattgac
 gtcaatggggcgggggtcgttgggcggtcagccaggcgggcccattaccgtaagttatgtaacgacctgcaggcatgcaagctcgAATTC CGC
 CGCCACGTATGTAATTCGGGACGTTGGATGATATAAAATATATAGTACGCGTCCGGGTATACACCTGTGCGA
 AAGTAGTACGAGACCGGCAGTCAAAAAGACGTTTCCGATCTTCCACAGCTCCAGTTATTCGGAAGGCGTGGGC
 ATGGGTGTGTGCATGATAACTCTCGTCACTTTACTAGACGAATGCGATCGATTGCCTGGGCGATCTCGTGACGC
 TGCTCCACCCTATGGATCTTCTCATAGAACAATGCATGGAGCATCTGAAGAATGATGTGGGTGTGCCATAT
 TAGTCCGTACAGCAGACCTGTGTGCGTTTGCCAAATCCACATTCGTTTTGCCCGCCGGCATCGCCCAATTGTG
 AGAATTAATCGGCAGGCGGGAGTGGTATGCCCGTTCCGGATTGGCAGGAACGAGAGATGCATTTATTGTG
 AGACTGTTTGAAGATGTAGCCGTTGCGTACCGAATGGCAGGATCTACTGACCGGCTATGTAATGCTAGAAT
 CGGAGGCCTCCGATAACGTATCGTATAGCCTGTGGATACTCGGGGCTGCAGATATCTGCAGAACTGCAATAGA
 ATCAATACCTCTACAAAACGTTTGTGTTGCCATTAAAGTACCAGGCACCTGGGCTGGAATGCCTTGGGCCATTC
 CATGTGAGATACAAACACTTCTCACGTCCACTTGGGAACCTAAATTTGAAAACATAGAAGATAAGGCGTACTTC
 AACGACAGTAATATGGCGTGCGTATATCAAATTATCGGCTCTCCACCAGACGTTCCCAGCTGCAGGGGCTTG
 GTATCGAGTCCACATGCACCCACCTAAACGCAATTTGTGTTGCTGCCTATGTTGCCGTCCAATACATGACGAC
 GACGCCTCCGTTCCCATGGGCGTTAAGACAGTAGATAAAAACGTACATGATGGCAATATGCTTGTAGAGGCTC
 CCAAGTGATCACAGATAGGGGAAAATTCAATAGTAGATAAAACGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTATGAGG
 GTTAATTTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA
 CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
 TTGCGTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG
 GGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTG
 CGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
 AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGG
 CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGT
 CCGCCTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC
 GTTTCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGTAATCATCG
 TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
 AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTG
 GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAC
 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
 TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
 AAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGT
 TGCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA
 AGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC
 AGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTT

CATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAA
TTCTTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTA
AAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC
GATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC

APÊNDICE 4

Vetor pcDNA 3.1D V5-His-TOPO com o gene de resistência NeoR/KanR.



7. REFERÊNCIAS

- BOODHOO, N. et al. Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 119, 28 dez. 2016.
- COUTEAUDIER, M.; DENESVRE, C. Marek's disease virus and skin interactions. **Veterinary research**, v. 45, n. 1, p. 36, 3 abr. 2014.
- DARTEIL, R. et al. **Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 Immunogen Induce Protection against an IBDV Virulent Challenge in Chickens***Virology*, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285714304>>
- LI, K. et al. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 30, p. 120–7, mar. 2015.
- LU, Z. et al. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. **Virus research**, v. 203, p. 92–5, 4 maio 2015.
- LUQUE, D. et al. Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 3, p. 891–901, 27 fev. 2009.
- MCPHERSON, M. C.; DELANY, M. E. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. **Poultry science**, n. Mdv, p. pev369, 2016.
- MÜLLER, H.; ISLAM, M. R.; RAUE, R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1–2, p. 153–165, dez. 2003.
- OPPLING, V.; MÜLLER, H.; BECHT, H. The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes. **The Journal of general virology**, v. 72 (Pt 9), p. 2275–8, set. 1991.
- OSTERRIEDER, N. et al. Marek's disease virus: from miasma to model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 283–294, 1 abr. 2006.
- RONG, S.; WHEELER, D.; WEBER, F. Efficient Marek's disease virus (MDV) and

herpesvirus of turkey infection of the QM7 cell line that does not contain latent MDV genome. **Avian Pathology**, v. 43, n. 5, p. 414–419, 3 set. 2014.

SAKAGUCHI, M. et al. Marek's Disease Virus Protein Kinase Gene Identified within the Short Unique Region of the Viral Genome Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture and Vaccine-Induced Immunity in Chickens. **Virology**, v. 195, n. 1, p. 140–148, 1 jul. 1993.

SHARMA, J. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 2–3, p. 223–235, 1 mar. 2000.

VAN DEN BERG, T. P. et al. Infectious bursal disease (Gumboro disease). **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 509–543, 2000.

ZIERENBERG, K. et al. Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo. **Virus Research**, v. 105, n. 1, p. 23–34, set. 2004.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E MODELAGEM
ESTRUTURAL DA PROTEÍNA VP2 DO VÍRUS
DA DOENÇA INFECIOSA DA BURSA (IBDV)
CEPA GBV-8**

1. INTRODUÇÃO

O vírus da doença infecciosa da Bursa provoca imunossupressão em aves, sendo uma das principais doenças responsáveis por altas perdas econômicas na indústria avícola (VAN DEN BERG et al., 2000). A vacinação é um dos métodos utilizados para o controle da doença. A estratégia de vacinação consiste no uso de vacinas vivas atenuadas ou vacinas inativadas usando cepas virulentas clássicas de IBDV, mas tem se mostrado ineficazes para cepas variantes e/ou muito virulentas. Novas estratégias são necessárias para uma maior eficácia das vacinas que visam a proteção de aves. Uma das metodologias utilizadas atualmente é a produção de vacinas vetoriais, onde um microrganismo é geneticamente modificado mediante a inserção de um gene exógeno capaz de produzir antígenos específicos e gerar imunidade.

O vírus de Gumboro (IBDV) é um vírus não envelopado que consiste em um capsídeo icosaédrico com diâmetro de 50-60 nm. O IBDV possui um RNA de dupla fita, composto por um segmento A e B de 3,2 kb e 2,8 kb respectivamente. O segmento A contém dois quadros de leitura abertos (ORF) parcialmente sobrepostos um ao outro. O maior ORF codifica uma poliproteína composta por pre-VP2, VP3 e VP4. A primeira proteína, precursora da proteína VP2, é clivada em diversas regiões do C-terminal gerando a VP2 madura.

A proteína VP2 é uma proteína estrutural do capsídeo e é considerada o principal antígeno responsável pela indução de anticorpos neutralizantes devido a presença de antígenos conformacionais (determinantes antigênicos). A sequência de aminoácidos da proteína VP2 revelou regiões hipervariáveis (RHV) localizadas entre os resíduos de aminoácidos 206-350, apresentando uma variabilidade de até 2,7% na sequência de aminoácidos entre cepas diferentes (BAYLISS et al., 1990). Dentro deste região hipervariável foram identificadas duas regiões maiores hidrofílicas denominadas pico A (212-224) e pico B (314-324) (AZAD et al., 1987b; VAN DEN BERG; GONZE; MEULEMANS, 1991). Acredita-se que deleções ou mutações dentro das regiões A e B influenciam na capacidade de neutralização do vírus por anticorpos, assim como a evolução de variantes antigênicas (AZAD et al., 1987a; HEINE et al., 1991). Outras três regiões menores hidrofílicas foram identificadas nas posições de resíduos de aminoácidos 248-252, 279-290, e 299-305 que influenciam a

antigenicidade do vírus (VAN DEN BERG; MEULEMANS, 1991). Um marcador que foi identificado consiste em um heptapeptídeo rico em serina (SWSASGS) nas posições 326-332 relacionado a virulência dos vírus de IBDV (HEINE et al., 1991). Além disso, resíduos de aminoácidos nas posições 253 (glicina), 279 (aspartato) e 284 (alanina) estão relacionados a virulência, tropismo celular, e o fenótipo patogênico de cepas virulentas de IBDV (BRANDT et al., 2001).

A bioinformática é uma disciplina de aplicação da ciência da computação e da tecnologia da informação aos campos da biologia, encarregada do desenvolvimento de ferramentas de software e algoritmos para o processamento e análise de dados genômicos e proteômicos (ZHANG; LIU, 2013). Ferramentas bioinformáticas permitem a predição de estruturas tridimensionais com precisão para anotação da função de proteínas, bem como de regiões de união com seus ligantes (DEWEESE-SCOTT; MOULT, 2004).

Com a proposta de usar uma nova cepa de IBDV GBV-8 junto com as novas estratégias de desenho de vacinas vetoriais, é de suma importância a correta caracterização da sequência da proteína para determinação da classificação, da função biológica, e das características físico-químicas da proteína de interesse (PAXMAN; HERAS, 2017). Métodos tradicionais de produção de vacinas utilizam técnicas imunológicas experimentais para determinar se uma proteína tem a capacidade de gerar uma forte resposta imunológica, e portanto se tornar uma candidata a vacina. Com tais processos a determinação da eficácia de uma vacina pode ser extremamente demorada. Os avanços nas ferramentas bioinformáticas, a tecnologia de DNA recombinante, o conhecimento da resposta imune do hospedeiro, e o sequenciamento do genoma do patógeno permitem que o desenvolvimento de novas vacinas contra diversas doenças seja realizado em menor tempo por meio de predições computadorizados *in silico* (SORIA-GUERRA et al., 2015).

Vírus recombinantes consistem em vírus como vetores de genes exógenos, capazes de produzir respostas imunológicas múltiplas específicas. Na atualidade, ferramentas bioinformáticas têm sido utilizadas para predição de epítopos de proteínas, além da avaliação do potencial de antígenos como candidatos a vacina. As ferramentas existentes permitem a identificação de regiões altamente antigênicas acelerando o processo de caracterização (JAISWAL; ZAHRA; KUMAR, 2020).

2. OBJETIVO

2.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi sequenciar e caracterizar o gene de expressão da proteína VP2 madura do segmento A do vírus da doença da Bursa infecciosa GBV-8 e compará-lo com as principais cepas vacinais e virulentas por alinhamento múltiplo. Além disso, foi utilizada a abordagem *in silico* para determinação das características físico-químicas e estruturais da proteína VP2 madura do IBDV, bem como a predição de epítomos lineares e conformacionais.

2.2. Específicos

- a) Sequenciar o segmento A do IBDV GBV-8 para obtenção da sequência do gene de expressão da proteína VP2;
- b) Caracterizar pelo método *in silico* as propriedades físico-químicas da proteína VP2 madura;
- c) Construir por modelagem molecular a proteína VP2 madura do IBDV GBV-8;
- d) Analisar por predição de epítomos lineares e estruturais de células B da proteína VP2 madura contra o vírus da doença da Bursa infecciosa (IBDV).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepa viral

A cepa GBV-8 do IBDV empregada neste trabalho foi obtida do Laboratório Biovet-Vaxxinova. A cepa é de propriedade da empresa e é utilizada na produção da vacina Gumbort-Vet.

3.2. Sequenciamento do segmento A IBDV GBV-8

As amostras do IBDV foram coletadas e preparadas para extração do RNA viral usando *QIAamp Viral RNA Mini Kit*. A quantificação do RNA foi realizada usando o aparelho *Qubit Life*. A síntese da fita simples e dupla de cDNA foi feito usando *cDNA Synthesis Kit*. Assim, o preparo da biblioteca genômica foi realizada utilizando *Nextera XT kit*. Para a purificação da biblioteca foi usado o sistema *AMPure XP* e a quantificação da biblioteca e *pool* foi feito através do *KAPA-Library Quantification Kit*. Por último, o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq. O sequenciamento do genoma viral e a análise de bioinformática para montagem dos *contigs* foram realizados pela empresa BPI Biotecnologia EPP.

3.3. Análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do IBDV GBV-8

A região contendo 1323 pares da base de nucleotídeos da proteína VP2 madura localizada na poliproteína do segmento A do genoma do IBDV GBV-8 contendo a região hipervariável foi submetida a análises de sequência. Os dados de sequência de nucleotídeos foram submetidos a análises BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinhamentos dos nucleotídeos e dos aminoácidos e foi identificada a região codificadora da poliproteína (preVP2-VP4-VP3). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos da sequência completa da proteína madura VP2 foram realizados pelo método ClustalW, bem como a construção da árvore filogenética, usando o programa MegaX versão 10.2.2. Para a análise filogenética foi utilizado o método *Maximum likelihood* com 1000 replicação de *bootstrap*. Para a construção da árvore filogenética, as seguintes sequências de IBDV foram selecionadas do banco de dados GenBank (número de acesso): vvUPM94/273 (AF527039), UK661 (NC-004178), OKYM (D49706), NIE 009T (AY099456), IBDVks (L42284), HK46 (AF092943), D 6948 (AF240686), Variant E (AF133904), PBG-98

(D00868), OH (U30818), D78 (AF499929), Cu1-WT (AF362747), CEF 94 (AF194428), BD 3/99 (AF362776), 52/70 (D00869), 002-73 (X03993).

3.4. Predição da estrutura secundária

A predição da estrutura secundária da VP2 foi realizada usando os servidores Raptor X Property (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/>) e PRISPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Raptor X Property foi usado para caracterizar a estrutura secundária usando *Conditional Neural Fields* (CNF), bem como para determinação de regiões desordenadas e acessibilidade a solventes (WANG et al., 2015). Análises complementares com o servidor PRISPRED permitem determinar a topologia transmembrana, hélice transmembrana, reconhecimento de domínios, etc. (MCGUFFIN; BRYSON; JONES, 2000).

3.5. Predição de epítomos lineares para células B

Os epítomos de células B são essenciais para estimulação de uma resposta imunológica humoral, que ativa os linfócitos B para a produção de anticorpos e desempenha um papel dinâmico na produção de vacinas. Para determinação de epítomos lineares, a sequência da VP2 GBV-8 foi submetida ao servidor IEDB *Analysis Resource* (<http://tools.iedb.org/bcell/>)

3.5.1. Método de BepiPred-1.0

A predição de epítomos lineares é realizada pela combinação de dois métodos. BepiPred usa um modelo oculto de Markov e um método de escala de propensão (ERIK et al., 2006). Para processar a sequência aminoácidos da VP2, um *threshold value* de 0.40 foi usado. Os principais epítomos previstos com pontuação maior que 0.40 foram escolhidos como possíveis epítomos lineares.

3.5.2. Método de hidrofiliidade de Parker

O método de hidrofiliidade de Parker usa uma escala hidrofílica baseada no tempo de retenção de peptídeos numa cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em uma coluna de fase reversa (PARKER; GUO; HODGES, 1986). Para processar a sequência da VP2, o *window size* foi de 20 com um *threshold value* de 1.277. Os principais epítomos previstos com pontuação maior que 3.5 foram escolhidos como possíveis epítomos lineares.

3.5.3. Método de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar

O método de Kolaskar & Tongaonkar é semiempírico e permite a predição de determinantes antigênicos de proteínas. O método usa as propriedades físico-químicas de resíduos de aminoácidos e suas frequências de ocorrência em epítomos segmentais experimentalmente conhecidos. Este método é capaz de prever determinantes antigênicos com uma precisão de 75% (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). Para processar a sequência da VP2, o *window size* foi 20 com um *threshold value* de 1.034.

3.5.4. Método de Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz

O método de Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz se baseia na mobilidade de segmentos de proteínas com base nos fatores B de temperatura com 31 proteínas de estrutura conhecida. O cálculo é baseado em uma escala de flexibilidade, semelhante ao cálculo clássico, exceto que o centro é o primeiro aminoácido do comprimento de seis aminoácidos e há três escalas para descrever a flexibilidade em uma única vez. (KARPLUS; SCHULZ, 1985). Para processar a sequência da VP2, o *window size* foi de 7 com um *threshold value* de 1.

3.5.5. Método de previsão de acessibilidade de superfície de Emini

O método de acessibilidade de superfície de Emini se baseia em uma escala de acessibilidade da superfície de um produto. O perfil de acessibilidade é obtido usando as fórmulas $S_n = [(n+4+i)(0,37)]-6$, onde “ S_n ” é a probabilidade de superfície, “ n ” é o valor de probabilidade de superfície fracionada e “ i ” varia de 1 a 6. Por exemplo, uma sequência de seis aminoácidos com S_n maior que 1,0 indica uma probabilidade aumentada de tais aminoácidos estarem localizados na superfície. (EMINI et al., 1985). Para processar a sequência da VP2, o *window size* foi de 4 com um *threshold value* de 1.

3.4.6. Método de previsão de giro beta de Chou e Fasman

O método de previsão de giro beta de Chou e Fasman se baseia na predição de estrutura primárias de proteínas a partir da sequência de aminoácidos (PELLEQUER; WESTHOF; VAN REGENMORTEL, 1993). O método utiliza uma escala de Chou e Fasman para prever giros beta, ao invés de uma escala padrão

(CHOU; FASMAN, 2006). Para processamento da sequência de aminoácidos da VP2 foi usado um *windows size* de 20 e um *threshold* de 1.

3.6. Predição de solubilidade e propriedades físico-químicas da VP2

Expasy Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi usado para estimar as propriedades físico-químicas tais como composição de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico teórico, vida média *in vitro* e *in vivo*, instabilidade, índice alifático e hidropaticidade média (*Grand average of hydropathicity-GRAPY*). A solubilidade da proteína foi estimada usando o servidor *Protein-Sol* (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>). O valor de solubilidade escalado (*QuerySol*) é a solubilidade prevista. A média da população para o conjunto de dados experimentais (*PopAvrSol*) é 0,45 e, portanto, qualquer valor de solubilidade escalado maior que 0,45 é previsto para ter uma solubilidade mais alta do que a proteína solúvel média de *E. coli* a partir da solubilidade experimental (HEBDITCH et al., 2017). Prevê-se que a proteína com um valor de solubilidade em escala inferior seja menos solúvel.

3.7. Predição de antigenicidade e alergenicidade da VP2

A VP2 pode ser avaliada para determinação das propriedades antigênicas. ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) e VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) são servidores que permitem medir as propriedades de antigenicidade de candidatos a vacinas. ANTIGENpro é um preditor de antigenicidade de proteínas baseado em sequências usando *microarray* de proteínas para cinco patógenos (MAGNAN et al., 2010). O servidor VaxiJen V2.0 que ajuda na predição de antigenicidade além das propriedades físico-químicas das proteínas sem a necessidade de alinhamentos com outras proteínas. VaxiJen v2.0 baseia-se na transformação de covariância cruzada automática de sequências de proteínas em vetores uniformes de propriedades de aminoácidos principais (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007). O *threshold value* utilizado foi de 0,4.

AllerTOP v2.0 e AllergenFP foram usados para estimar a alergenicidade da VP2. O método usado pelo servidor AllerTOP V2.0 se baseia na transformação de covariância cruzada automática (ACC) de sequências de proteínas em vetores uniformes de comprimento igual. As proteínas são classificadas pelo algoritmo k-vizinho mais próximo (kNN, k = 1) com base no conjunto de treinamento contendo 2 427 alérgenos conhecidos de diferentes espécies e 2 427 não alérgenos (DIMITROV

et al., 2014b). O método AllergenFP se baseia na descrição dos aminoácidos nas sequências de proteínas em conjuntos de dados por cinco E-descriptores e as cadeias são transformadas em vetores uniformes por transformação de covariância auto-cruzada (ACC). Os subconjuntos de antígenos e não antígenos são transformados em matrizes com 25 x 15 variáveis cada, e dessa forma cada proteína tem uma impressão digital binária única composta de 25 x 15 unidades em termo de coeficiente de Tanimoto que são comparados posteriormente (DIMITROV et al., 2014a).

3.8. Modelagem molecular da proteína VP2

3.8.1. Predição da estrutura terciária

A estrutura terciária da VP2 foi analisada pela metodologia de modelagem por homologia usando os servidores SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) e Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). SWISS-Model é um serviço integrado baseado na web dedicado à modelagem de homologia de estrutura de proteínas. Para selecionar os modelos mais adequados foram avaliada os valores de Estimativa de Qualidade do Modelo Global (GMQE) e Qualidade Média (QMEAN). Phyre2 usa o alinhamento de modelos Markov ocultos via HHsearch1 para melhorar significativamente a precisão do alinhamento e a taxa de detecção, e simulação de dobramento ab initio chamada Poing2 para modelar regiões de proteínas sem homologia detectável com estruturas conhecidas.

3.8.2. Refinamento da estrutura terciária

As estruturas terciárias da VP2 geradas por SWISS-MODEL e Phyre2 foram refinadas. O refinamento das estruturas terciárias da proteína foi realizado para obter um maior relaxamento estrutural, para assim melhorar a qualidade da estrutura global e local, dando posições de cadeia lateral mais precisas, melhores redes de ligações de hidrogênio, e menos sobreposições atômicas. GalaxyRefine realiza perturbações nas estruturas repetidas e um relaxamento estrutural geral por simulação de dinâmica molecular. Cinco modelos são gerados. No modelo 1 são realizadas perturbações apenas na estrutura dos grupos laterais das cadeias, e para os modelos 2-5, perturbações mais agressivas aos elementos da estrutura secundária e *loops* também são aplicados. O método de fechamento de *loop* triaxial é empregado para evitar quebras nas estruturas do modelo causadas por perturbações (HEO; PARK; SEOK, 2013; LEE; HEO; SEOK, 2016).

3.8.3. Validação da estrutura terciária

As estruturas terciárias refinadas da VP2 foram validadas pelo servidor ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) para identificar possíveis erros na construção do modelo. ProSA consiste em calcular um *Z-score* geral da estrutura específica. Se os *Z-scores* estiverem fora do intervalo de valores de proteínas nativas, pode significar que a estrutura terciária contém erros (SIPPL, 1993). O servidor ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) foi utilizado para analisar as interações átomos-átomos não ligadas, para posterior comparação com as estruturas cristalográficas de alta resolução (COLOVOS; YEATES, 1993). O servidor VADAR (<http://vadar.wishartlab.com/>) foi utilizado para gerar um gráfico de Ramachandran para determinar a porcentagem de resíduos em regiões permitidas e de resíduos em regiões não permitidas que descrevem a qualidade da estrutura modelada.

3.9. Predição de epítomos descontínuos de células B

O processo de refinamento da estrutura terciária da VP2 pode produzir novos epítomos descontínuos (conformacionais), portanto é necessário realizar previsões adicionais de epítomos descontínuos. O servidor ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) foi usado para prever os epítomos conformacionais para as estruturas terciárias refinadas geradas por Phyre2 e SWISS-MODEL. ElliPro se baseia nas propriedades geométricas da estrutura terciária de uma proteína (PONOMARENKO et al., 2008). ElliPro é o servidor com o melhor valor AUC (área abaixo da curva) de 0.732, sendo uma ótima ferramenta para predição de epítomos descontínuos.

4. RESULTADOS

4.1. Análises de sequência de nucleotídeos e aminoácidos do segmento A da cepa IBDV GBV-8

O sequenciamento do segmento A da cepa IBDV GBV-8 revelou 3154 pb (APÊNDICE 1). As sequências de nucleotídeos foram processadas por BlastN e foi possível identificar a sequência codificadora da poliproteína (preVP2-VP4-VP3). A sequência foi localizada entre as posições 100-3129, com tamanho de 3036 pb. As sequências de nucleotídeos das proteínas preVP2, VP4 e VP3 foram definidas.

A protease VP4 (729 pb) foi localizada entre os nucleotídeos 1636-2364, a proteína de capsídeo VP3 (771 pb) foi localizada entre os nucleotídeos 2365-3135 e o precursor da proteína VP2 (1536 pb) na posição 100-1635. Os pares de códons GCA-TTC localizados na posição 1420-1425 que expressam os aminoácidos alanina e fenilalanina são reconhecidos como sítios de clivagem pela protease VP4 para obtenção da proteína VP2 madura (Figura 1).

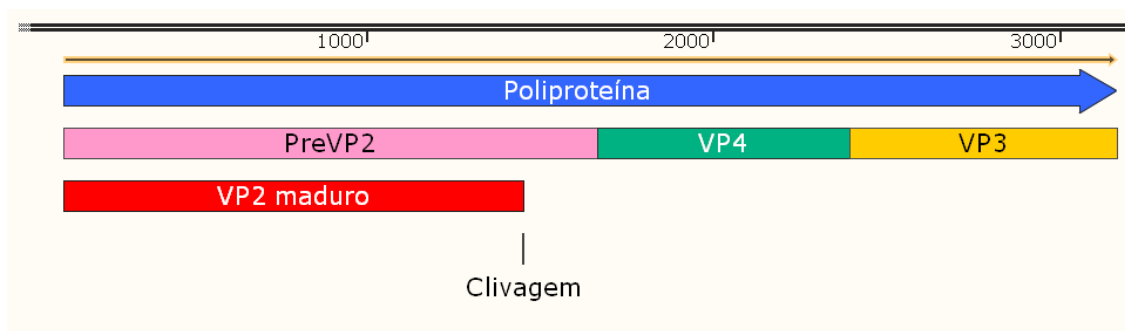


Figura 1. Representação esquemática da fita de nucleotídeos do segmento A do genoma do IBDV GBV-8. O local de clivagem pela protease VP4 é indicado no esquema. ORFs relacionados por cores com rosa indicando os nucleotídeos preVP2; verde e amarelo indicam os pequenos ORFs adicionais.

A análise de sequência e comparação dos nucleotídeos da proteína VP2 madura (1323 pb) com outras cepas revelou que a sequência de nucleotídeos do IBDV GBV-8 mostrou uma maior porcentagem de identidade (aproximadamente 99,73 - 99,90%; altamente homólogo) com as cepas atenuadas clássicas (D78, PBG-98 e CEF 94) (Tabela 1). Por outro lado, comparando as cepas virulenta, clássicas e variante E, a porcentagem de identidade esteve na faixa de 92,47 – 97,78% e um valor inferior foi observado com a cepa não virulenta IBDV OH (84,11%). De forma similar

foram avaliadas as sequências de aminoácidos dos IBDV. A porcentagem de identidade da sequência de aminoácidos do IBDV GBV-8 foi maior quando comparada com as cepas atenuadas clássicas (98,82 – 100%) e quando comparada com as cepas clássicas ou variante E, os valores de identidade estiveram entre 96,73 – 98,64%. Os maiores valores de porcentagem de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos foram de 99,90% e 100% respectivamente, quando comparados entre IBDV D78 e IBDV GBV-8.

Tabela 1. Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos da sequência da proteína VP2 madura (1323 pb) do IBDV GBV-8 com outras cepas.

	Identidade (%)	
	Nucleotídeos	Aminoácidos
VVUPM941273	96,15	97,28
UK661	95,78	97,73
OKYM	95,73	97,73
NIE 009T	95,69	97,73
KS	96,02	97,73
HK46	95,53	97,73
D6948	96,08	97,73
Variante E	97,06	97,28
PBG-98	99,73	98,82
OH	84,11	86,88
D78	99,90	100,00
Cu- 1wt	97,78	98,64
CEF 94	99,87	100,00
BD 3/99	95,34	97,51
52/70	97,53	98,64
002-73	92,47	96,73

Uma árvore filogenética foi elaborada com as cepas atenuadas clássicas, cepas clássicas, cepa variante E, e cepa virulenta. A árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos das 17 cepas utilizadas neste estudo, foi agrupada em dois ramos distintos. As cepas virulentas (exceto IBDV NIE 009T) se agruparam no ramo I, enquanto as cepas clássicas, atenuadas clássicas, não virulenta e a variante antigênica se agruparam no ramo II. No Ramo I, a cepa IBDV GBV-8 esteve

intimamente relacionada com as cepas atenuadas clássicas (IBDV D78, IBDV CEF 94 e IBDV PBG 98) (Figura 2).

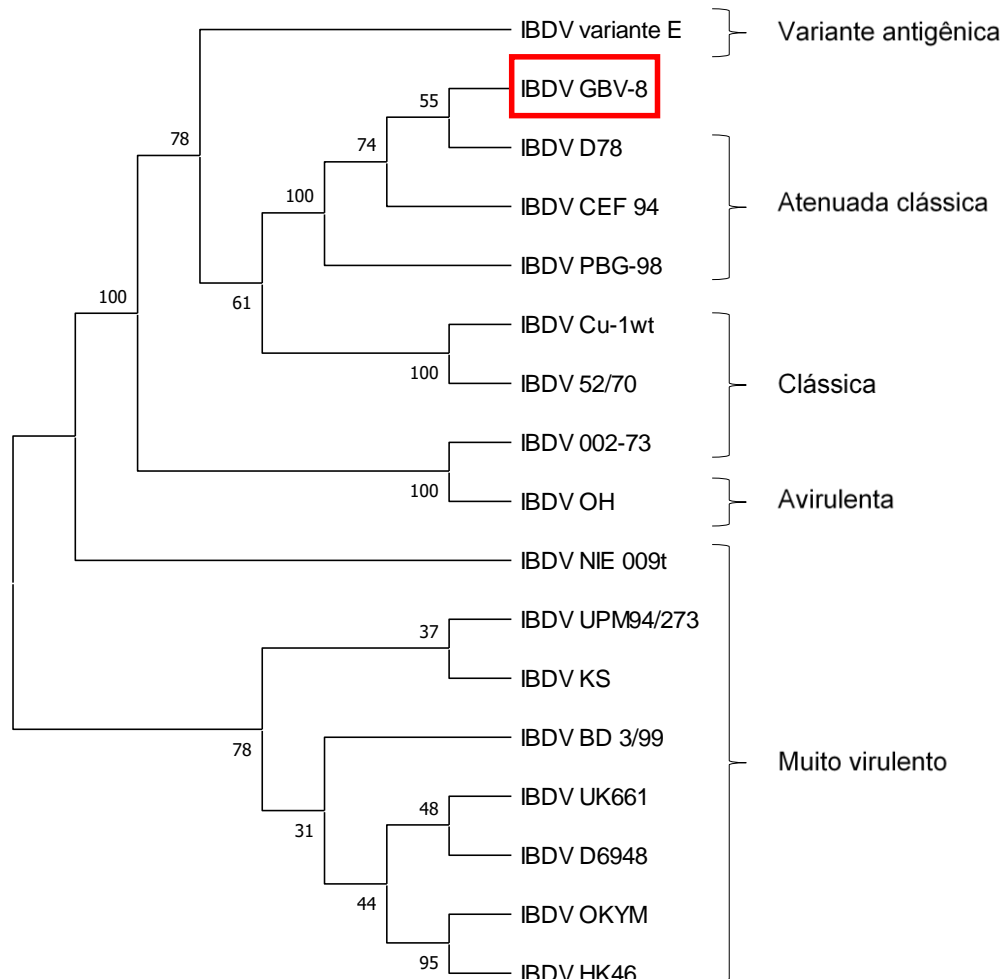


Figura 2. Árvore filogenética deduzida da sequência da proteína VP2 madura do genoma de comprimento total de 17 cepas de IBDV usando o método *neighbor-joining*. Os resultados são baseados em 1000 replicações *bootstrap*.

Múltiplos alinhamentos de sequência de nucleotídeos e de aminoácidos foram realizados usando o programa Mega X (APÊNDICE 2). Os resíduos de aminoácidos 222A, 242I, 253Q, 256I, 279D, 284A, 299S e 330S são encontrados na sequência da proteína VP2 de cepas virulentas, os quais são altamente conservados, mas não foram encontrados na IBDV GBV-8 (242P, 253D, 256B, 279N, 284A, 299N, 330Y), exceto a alanina no resíduo 284.

Na região hipervariável da proteína VP2 da sequência de resíduos de aminoácidos, no pico A (212-224) são observadas variações entre cepas clássicas e cepas muito virulentas. No pico A das cepas clássicas e cepas atenuadas clássicas

acontece uma substituição A222P, em comparação com as cepas virulentas (Figura 3). Esta característica de substituição em cepas atenuadas pode ser observada na cepa IBV GBV-8, bem como uma substituição A22T, quando comparada com a variante E.

No pico B (314-324) não foram observadas variações na sequência de resíduos de aminoácidos, quando comparado com as cepas clássicas/atenuadas e as cepas muito virulentas, mas foi observada substituição quando comparada com as variantes antigênicas. Esta mutação acontece com o aminoácido ácido aspártico (D) na posição 318, característica de cepas como a variante E. A sequência SWSASGS de heptapeptídeo rico em serina localizada na posição 326-332 é característica de cepas virulentas. Foi possível observar que a cepa IBV GBV-8 apresentou uma substituição S330R (característica de cepas atenuadas).

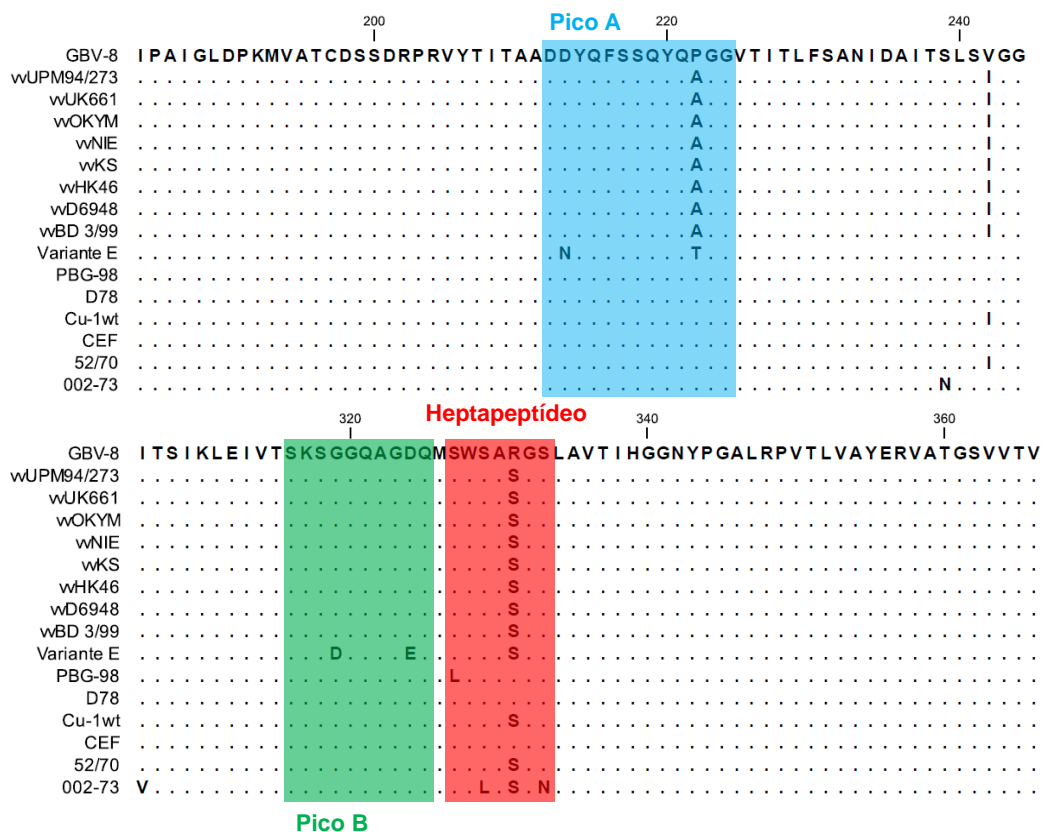


Figura 3. Alinhamentos múltiplas das sequências de resíduos de aminoácidos das cepas muito virulentas, clássicas, atenuadas clássicas e uma variante antigênica.

4.2. Predição de epítomos lineares

4.2.1. Método de BepiPred-1.0

Pelo método de BepiPred foi usado um *theshold* igual a 0.40 como ponto de corte para escolha dos epítomos (Figura 4). Foram gerados 23 possíveis epítomos de diferentes comprimentos. Dos 23 epítomos, foram selecionados epítomos com comprimentos iguais ou maiores a 7 aminoácidos para análise posterior (Tabela 2). Foram identificados 13 epítomos (NLQDQTQ, TTGPASIPDDTLE, LRSETSTY, LTVGDTG, LQSNGNY, DPIPAIGL, TCDSSDRPRV, TAADDYQFSSQYQPGG, NNGLTTGTD, SKSGGQAGDQMSWS, GGNYPGAL, GRFDPGAM e WPTREYT).

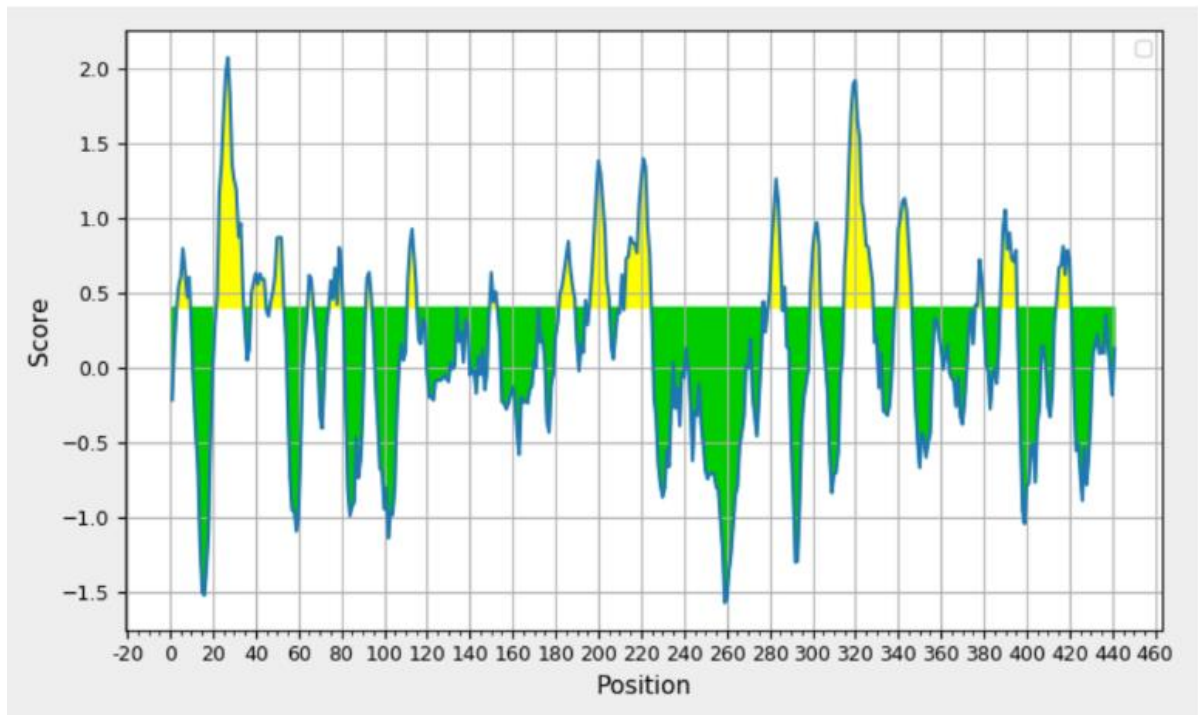


Figura 4. Gráfico de predição de epítomos de células B por BepiPred. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação respectivamente. O valor limite é 0.4. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 2. Sequências dos epítomos de células B da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8 geradas por BepiPred.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Comprimento
3	9	NLQDQTQ	7
22	34	TTGPASIPDDTLE	13
38	45	LRSETSTY	8
47	53	LTVGDTG	7
74	80	LQSNGNY	7
182	189	DPIPAIGL	8
196	205	TCDSSTRPRV	10
209	224	TAADDYQFSSQYQPGG	16
279	287	NNGLTTGTD	9
315	328	SKSGGQAGDQMSWS	14
339	346	GGNYPGAL	8
388	395	GRFDPGAM	8
414	420	WPTREYT	7

4.2.2. Método hidrofiliidade de Parker

A predição de epítomos de hidrofiliidade de Parker com uma pontuação mínima de -1.540 e uma pontuação máxima de 3.935 foi realizada (Gráfico 5). Foi escolhida a pontuação de 1.277 como ponto de corte para seleção dos possíveis epítomos lineares. Foi possível identificar 193 epítomos de células B com pontuação superior a 1.277 (Tabela 3), dos quais foram selecionados epítomos que apresentaram uma pontuação superior a 3.00.

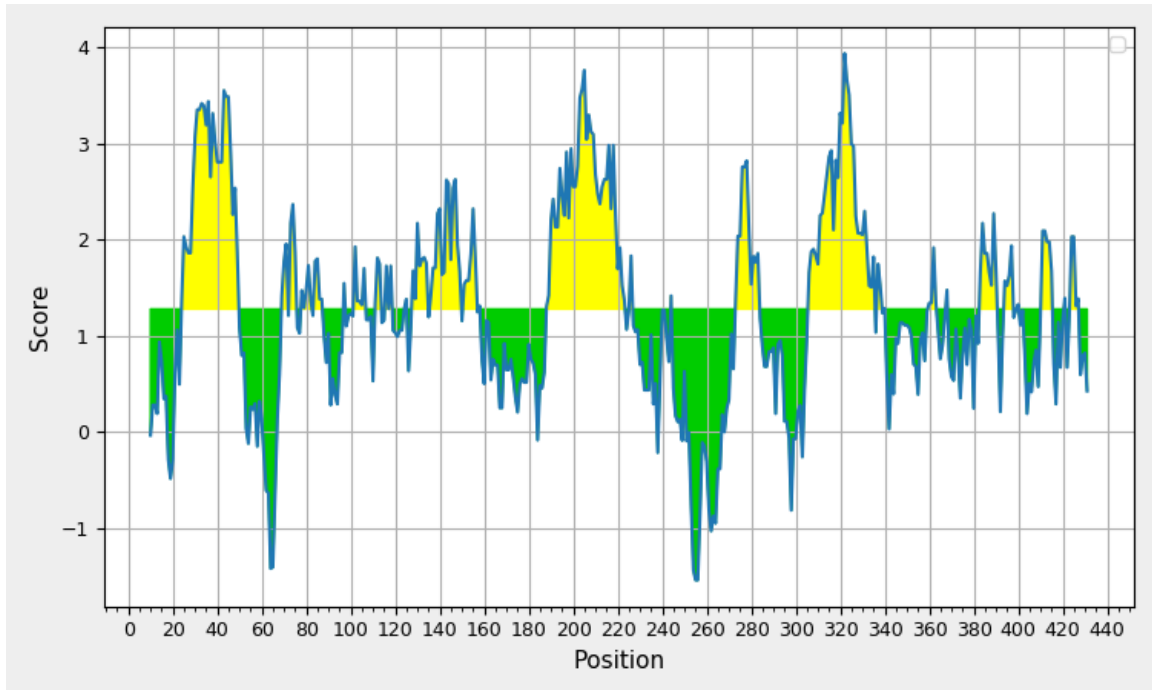


Figura 5. Gráfico de dados plotados da predição de células B por hidrofiliicidade de Parker. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação de propensão antigênica, respectivamente. O valor limite é 1.277. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 3. Sequências dos epítomos de células B da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8 geradas por hidrofiliicidade de Parker.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Comprimento
313	332	VTSKSGGQAGDQMSWSARGS	3935
196	215	TCDSSDRPRVYTITAADDYQ	3.76
314	333	TSKSGGQAGDQMSWSARGSL	3.66
195	214	ATCDSSDRPRVYTITAADDY	3565
34	53	EKHTLRSETSTYNLTVGDTG	3.55
315	334	SKSGGQAGDQMSWSARGSLA	3505
35	54	KHTLRSETSTYNLTVGDTGS	3485
36	55	HTLRSETSTYNLTVGDTGSG	3485
194	213	VATCDSSDRPRVYTITAADD	3475
27	46	SIPDDTLEKHTLRSETSTYN	3435
24	43	GPASIPDDTLEKHTLRSETS	3415
25	44	PASIPDDTLEKHTLRSETST	3.39
22	41	TTGPASIPDDTLEKHTLRSE	3.35
23	42	TGPASIPDDTLEKHTLRSET	3.35
311	330	EIVTSKSGGQAGDQMSWSAR	3315
29	48	PDDTLEKHTLRSETSTYNLT	3.31

198	217	DSSDRPRVYTITAADDYQFS	3295
312	331	IVTSKSGGQAGDQMSWSARG	3.21
26	45	ASIPDDTLEKHTLRSETSTY	3.19
199	218	SSDRPRVYTITAADDYQFSS	3.12
200	219	SDRPRVYTITAADDYQFSSQ	3095
21	40	PTTGPASIPDDTLEKHTLRS	3065
197	216	CDSSDRPRVYTITAADDYQF	3.04
30	49	DDTLEKHTLRSETSTYNLTV	3.02

4.2.3. Método de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar

Os resultados de predição de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar mostraram valores de pontuação mínima de 0.963 e valor máximo de 1.125 (Gráfico 6). Foi possível identificar 14 diferentes peptídeos (Tabela) com diferentes números de aminoácidos (QQIVPFIRSL, GLIVFFP, GSIVGAHYT, SYNYCRLVSRSLTVRSS, PGGVYAL, NVLVGEGVTVLSLPTS, LGYVRLG, TITLFS, ITSLSVGELVFQTSVHGLVLGATIYLIG, PFNLVIPT, SIKLEIVTS, SLAVTI, ALRPVTLVAYER e TGSVTVAGV).

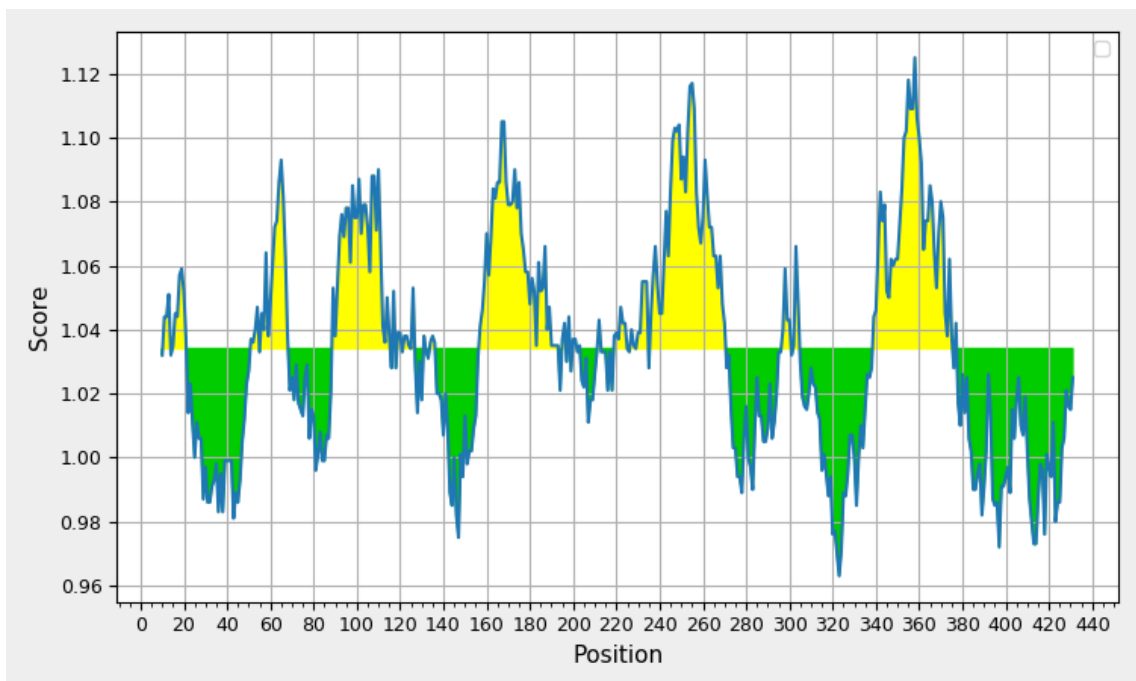


Figura 6. Gráfico de predição de epítomos de células B por antigenicidade por Kolaskar & Tongaonkar. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação respectivamente. O valor limite é 1.125. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 4. Sequências dos epítomos de células B geradas por antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Comprimento
9	18	QQIVPFIRSL	10
55	61	GLIVFFP	7
65	73	GSIVGAHYT	9
95	111	SYNYCRLVSRSLTVRSS	17
114	120	PGGVYAL	7
157	172	NVLVGEGVTVLSLPTS	16
175	181	LGYVRLG	7
226	231	TITLFS	6
237	265	ITSLSVGGELVFQTSVHGLVLGATIYLIG	29
291	298	PFNLVIPT	8
307	315	SIKLEIVTS	9
332	337	SLAVTI	6
345	356	ALRPVTLVAYER	12
359	368	TGSVVTVAGV	10

4.2.4. Método de Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz

Pelo método de Karplis e Schulz foi selecionado um *window size* de 7 (máximo valor, segundo o método) e um *threshold* de 1.0. Uma pontuação de propensão mínima de 0.998 e um máximo de 1.130 foram plotados (Figura 7). O gráfico apresenta todos os possíveis epítomos, sendo 434 possíveis epítomos, entretanto 200 epítomos apresentaram uma pontuação superior a 1. Dos 200 epítomos, foram selecionados aqueles que apresentam similaridade com os epítomos gerados pelo método de BepiPred (Tabela 5) (MPTTGPA, TTGPASI, TGPASIP, GPASIPD, PASIPDD, IPDDTLE, PDDTLEK, CDSSDRP, DSSDRPR, FSSQYQP, QFSSQYQ, TSKSGGQ, SKSGGQA, KSGGQAG, QAGDQMS, AGDQMSW e GDQMSWS).

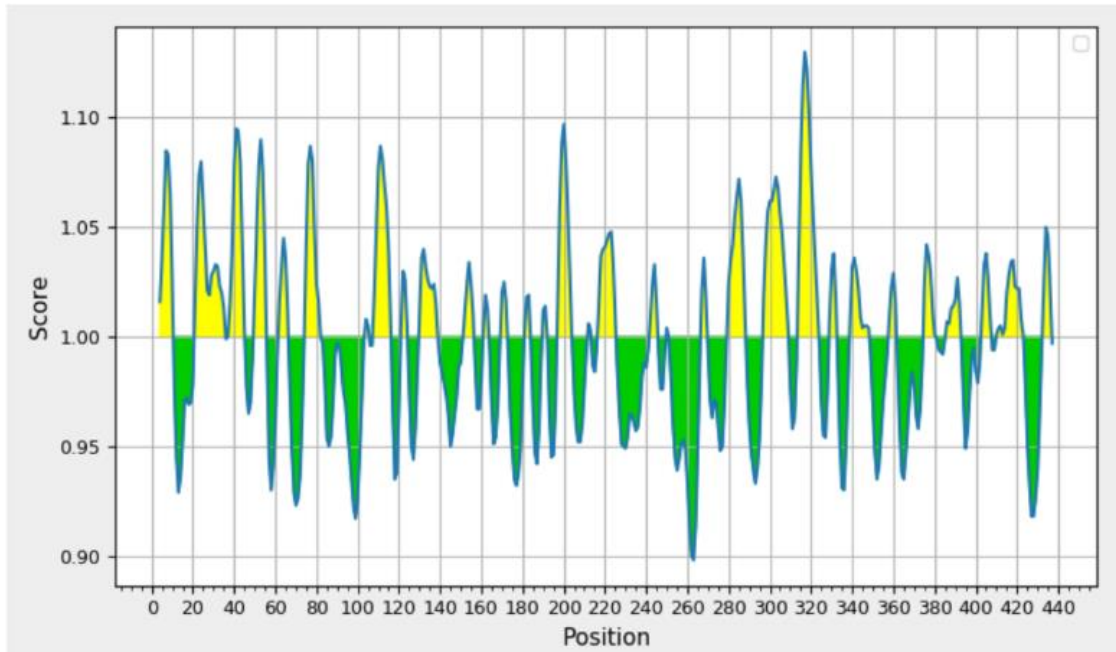


Figura 7. Gráfico de previsão de epítomos de células B por Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação respectivamente. O valor limite é 1.130. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 5. Sequências dos epítomos de células B geradas por Escala de flexibilidade de Karplus e Schulz.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Pontuação
20	26	MPTTGPA	1.074
22	28	TTGPASI	1.06
23	29	TGPASIP	1.04
24	30	GPASIPD	1.021
25	31	PASIPDD	1.019
28	34	IPDDTLE	1.033
29	35	PDDTLEK	1.032
197	203	CDSSDRP	1.097
98	204	DSSDRPR	1.082
216	222	FSSQYQP	1.04
215	221	QFSSQYQ	1.037
314	320	TSKSGGQ	1,13
315	321	SKSGGQA	1.122
316	322	KSGGQAG	1.102
320	326	QAGDQMS	1.017

321	327	AGDQMSW	0.997
322	328	GDQMSWS	0.97

4.2.5. Método previsão de acessibilidade da superfície de Emini

Pelo método de acessibilidade de superfície foi selecionado um *windows size* de 4 e um *threshold* de 1.0. Uma pontuação de propensão mínima de 0.158 e um máximo de 4.703 foi plotado (Figura 8). Foram obtidos oito possíveis peptídeos de células B consensos com diferentes comprimentos, gerados a partir de peptídeos com um *windows size* de 4 (NLQDQTQ, IPDDTLEKHTLRSETSTYN, HYTLQSNGNYKFDQ, SDRPRV, AADDYQFSSQYQP, PTNEITQP, TEYGRF e PTREYTDFRE).

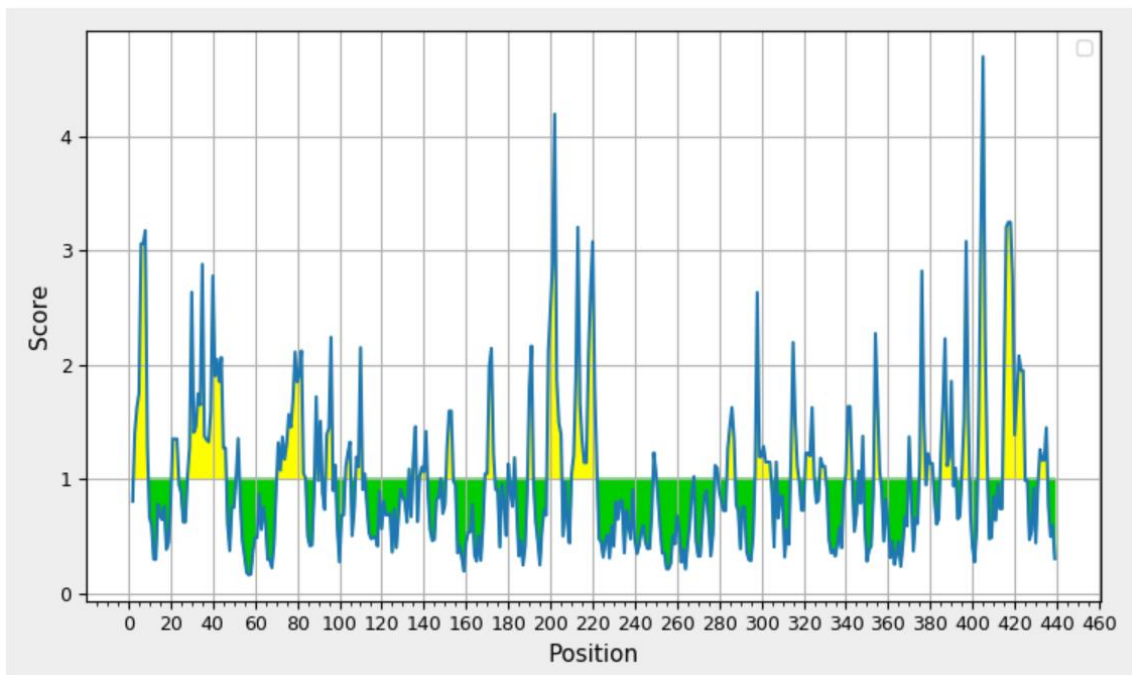


Figura 8. Gráfico de previsão de epítomos de células B por acessibilidade da superfície de Emini. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação respectivamente. O valor limite é 1.0. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 6. Sequências dos epítomos de células B geradas por de acessibilidade da superfície de Emini.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Comprimento
3	9	NLQDQTQ	7
28	46	IPDDTLEKHTLRSETSTYN	19
71	84	HYTLQSNGNYKFDQ	14
199	205	SSDRPRV	7
210	222	AADDYQFSSQYQP	13
297	304	PTNEITQP	8
385	390	TEYGRF	6
415	424	PTREYTDFRE	10

4.2.6. Método de Previsão de giro beta de Chou e Fasman.

Com o método de previsão de giro beta de Chou e Fasman foi possível obter 435 possíveis epítomos, sendo que o valor mínimo de pontuação foi de 0.816 e a pontuação máxima foi de 1.162. Dos 423 possíveis epítomos, 242 sequências superaram o valor de *threshold* (1.00). Para análise foram selecionados os primeiros 15 epítomos com as maiores pontuações (Tabela 7).

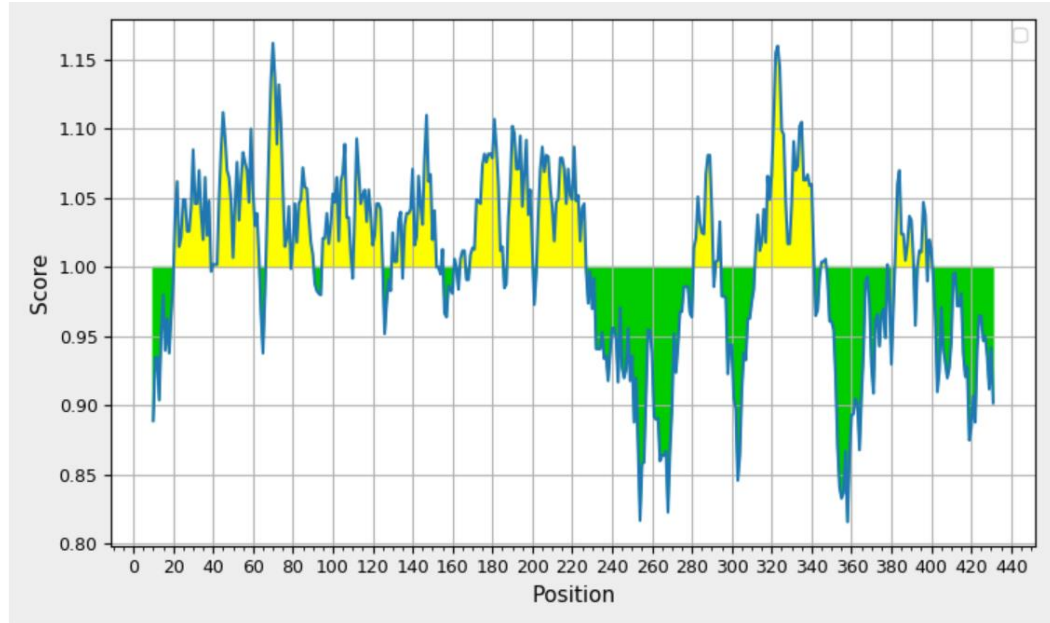


Figura 9. Gráfico de previsão de epítomos de células B por previsão de giro beta de Chou e Fasman. Os eixos X e Y representam a posição da sequência e a pontuação respectivamente. O valor limite é 1.162. As regiões acima do limite são antigênicas, mostradas em amarelo.

Tabela 7. Sequências dos epítomos de células B geradas por previsão de giro beta de Chou e Fasman.

Início	Final	Sequência do peptídeo	Pontuação
61	80	PGFPGSIVGAHYTLQSNGNY	1.162
314	333	TSKSGGQAGDQMSWSARGSL	1.16
313	332	VTSKSGGQAGDQMSWSARGS	1.155
315	334	SKSGGQAGDQMSWSARGSLA	1.145
62	81	GFPGSIVGAHYTLQSNGNYK	1.137
60	79	FPGFPGSIVGAHYTLQSNGN	1.135
64	83	PGSIVGAHYTLQSNGNYKFD	1.132
36	55	HTLRSETSTYNLTVGDTGSG	1.112
138	157	DVSYNGLMSATANINDKIGN	1.11
312	331	IVTSKSGGQAGDQMSWSARG	1.108
172	191	SYDLGYVRLGDPIPAIGLDP	1.107
65	84	GSIVGAHYTLQSNGNYKFDQ	1.105
326	345	SWSARGSLAVTIHGGNYPGA	1.105
181	200	GDPIPAIGLDPKMOVATCDSS	1.102
325	344	MSWSARGSLAVTIHGGNYPG	1.102

4.3. Predição de solubilidade e propriedades físico-químicas

A massa molecular da proteína VP2 madura estimada foi de 47,1 kDa com um ponto isoelétrico teórico (pI) de 4,93. Um ponto isoelétrico abaixo de 7 indica uma proteína carregada positivamente. Foi determinada que a vida média estimada foi de 30 horas em reticulócitos de mamíferos em ensaios *in vitro*, mais de 20 horas em leveduras e mais de 10 horas em *Escherichia coli* em ensaios *in vivo*. O valor de índice de instabilidade (II) foi de 27,86, evidenciando que a proteína é estável (com um índice de instabilidade menor que 40 uma proteína pode ser considerada estável; ao passo que um valor acima de 40 indica que a proteína pode ser instável). Um alto índice alifático de 95,26 indicou termoestabilidade. Uma hidropaticidade média de 0.065 indicou a natureza hidrofílica da VP2 madura. Adicionalmente, um valor de solubilidade de 0,333, indicou uma menor solubilidade comparada as proteínas de expressão em *E. coli* (Figura 10).

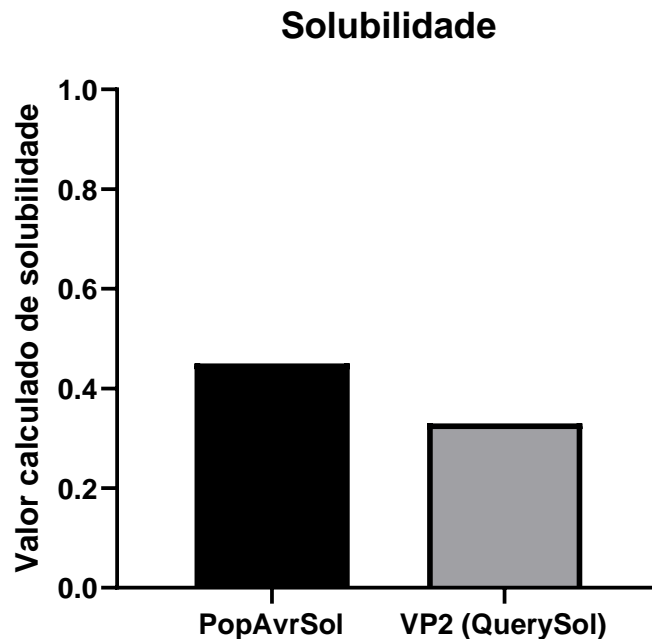


Figura 10. Gráfico de comparação de solubilidade de VP2 com a solubilidade média da população de proteínas de *E. coli*.

4.4. Predição da estrutura secundária

Estimou-se que a sequência de aminoácidos da VP2 possui em sua estrutura 9% de α -hélice, 38% de folha- β e 51% de alça (*coil*) (Figura 11). Além disso, 38% dos resíduos de aminoácidos são expostos, 27% são de exposição média, e 33% são enterrados (não expostos) em relação à acessibilidade a solventes. Identificou-se que 37 resíduos de aminoácidos estariam desordenados, o que representaria 8% da proteína. Com relação a topologia de transmembrana da proteína VP2, estimou-se que os resíduos de aminoácidos de 1-255 apresentam uma estrutura extracelular (N-terminal), enquanto os resíduos 246-271 estão localizados dentro da região transmembrana, e os resíduos 271-441 estão relacionados a interação dentro do núcleo da região C-terminal da proteína.

4.5. Predição de antigenicidade e alergenicidade da VP2

A antigenicidade da proteína VP2 foi avaliada por ANTIGENpro e VaxiJen V2.0, e foi evidenciado que a proteína pode consistir em um bom antígeno. Dos resultados mostrados com o servidor VaxiJen v2.0, um *threshold value* de 4.0 foi escolhido como critério para determinação da propriedade antigênica da proteína VP2. Os resultados mostraram um valor superior (0.525), demonstrando portanto um provável antígeno. Com ANTIGENpro mostrou-se que a proteína VP2 tem uma probabilidade de antigenicidade prevista de 0.734316. Os resultados da avaliação *in silico* de antigenicidade da proteína VP2 evidenciaram que a proteína é altamente antigênica. A sequência da proteína VP2 analisada nos servidores AllerTOP v.2 e AllergenFP foi estimada como não alergênica.

4.6. Predição da estrutura terciária

O modelo 3D da proteína VP2 foi construído usando servidores de modelagem por homologia (SWISS-MODEL e Phyre2). Com o servidor de SWISS-MODEL foram gerados 3 modelos da estrutura terciária da VP2 (2gsy.1.A, 3fbm.1.A e 1wcd.1.A). O modelo 2gsy.1.A (estrutura 2.6Å das partículas T=1 derivadas do vírus da Bursa infecciosa) foi escolhido como modelo para geração da estrutura terciária da VP2 já que apresentou as melhores características (porcentagem de identidade de 98,87%, GMQE de 0,91 e QMEAN de -1,50). Com o servidor Phyre2 foram gerados 3 modelos da estrutura terciária da proteína VP2 com valores de confiança de 100% (d2df7a1, c2df7H e c6m3wA). A estrutura da proteína VP2 foi gerada com o modelo

d2df7a1(semelhante a Nucleoplasmina/VP, revestimento viral e proteínas do capsídeo) apresentando uma cobertura de 95% da sequência (419 resíduos).

Os resultados de modelagem molecular pelo servidor SWISS-MODEL revelaram que a proteína VP2 madura pode se ligar por meio de íons cálcio (Ca^{+2}) gerando uma estrutura de VLP (*Virus Like-Particle*) de 60 monômeros da proteína (APÊNDICE 3). Esta estrutura VLP pode ser formada espontaneamente durante a expressão em cultura de células.

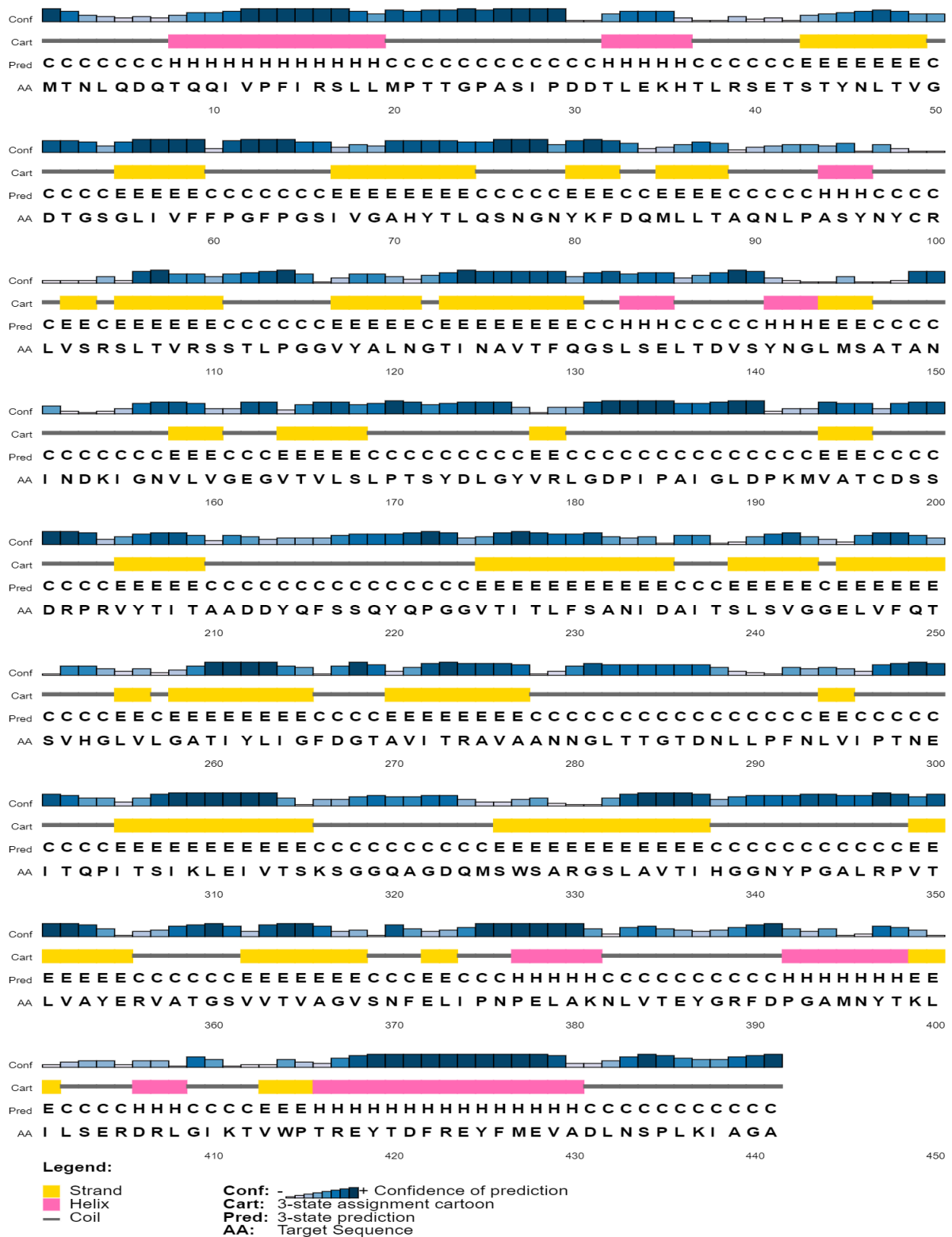


Figura 11. Predição da estrutura secundária da proteína VP2 usando o servidor PSIPRED. Os retângulos em amarelo representam a estrutura secundária de folha-β, os retângulos em rosa representam a estrutura secundária de α-hélice e as linhas em cinza representam a estrutura secundária em alça.

4.7. Refinamento da estrutura terciária

O servidor GalaxyRefine foi utilizado para melhorar a distribuição molecular, e desta forma minimizar a energia do modelo protéico gerado pelos servidores SWISS-MODEL e Phyre2. Usando o servidor GalaxyRefine foi possível gerar cinco modelos protéicos com características diferentes. *Global Distance Test-High Accuracy* (GDT-HA) mede a similaridade entre duas estruturas de proteínas. A distância entre os átomos é medida pela pontuação do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e um valor RMSD baixo sugere melhor estabilidade das proteínas.

A pontuação de Molprobity reflete a resolução cristalográfica do modelo, sendo que valores inferiores aos valores do modelo inicial mostram uma diminuição dos erros críticos. O *Clash Score* mostra o número de sobreposições estéricas desfavoráveis de todos os átomos. A *Rama favored* representa o tamanho das regiões energeticamente favorecidas e geralmente um valor superior a 85% é considerado aceitável.

Com base nas pontuações de qualidade para todos os modelos refinados, foi escolhido o modelo 5 e modelo 4 para as proteínas geradas pelos servidores Phyre2 e SWISS-MODEL (Tabela 8, 9) respectivamente. Entre os modelos gerados por Phyre2, o modelo 5 foi o mais significativo com base em vários parâmetros, incluindo GDT-HA de 0.9916, RMSD de 0,293, and MolProbity de 1,525. O *Clash score* foi de 10,0. O valor de *Poor rotamers* foi 0,6 e o valor *Rama favored* foi 99,00. Dentre os modelos gerados por SWISS-MODEL, o modelo 4 foi escolhido, tendo um GDT-HA de 0.9850, RMSD de 0,306, e MolProbity de 1,610. O *Clash score* foi de 9,5. O valor de *Poor rotamers* foi de 0,8 e o valor *Rama favored* foi de 97,4. As pontuações dos modelos refinados Phyre2 e SWISS-MODEL mostram uma boa qualidade de forma geral (Figura 12).

Tabela 8. Pontuações de qualidades por GalaxyRefine dos modelos gerados por Phyre2.

Modelo	GDT-HA	RMSD	MolProbity	Clash score	Poor rotamers	Rama favored
Modelo inicial	1,0000	0,000	2,589	19,4	4,0	95,0
Modelo 1	0,9785	0,324	1,548	10,7	0,3	99,0
Modelo 2	0,9845	0,313	1,570	11,3	0,0	99,0
Modelo 3	0,9839	0,321	1,569	10,1	1,1	99,0
Modelo 4	0,9809	0,327	1,591	12,0	0,3	98,8
Modelo 5	0,9916	0,293	1,525	10,1	0,6	99,0

Tabela 9. Pontuações de qualidades por GalaxyRefine dos modelos gerados por SWISS-MODEL.

Modelo	GDT-HA	RMSD	MolProbity	Clash score	Poor rotamers	Rama favored
Modelo inicial	1,0000	0,000	2,252	4,6	5,8	93,3
Modelo 1	0,9815	0,318	1,570	9,5	0,6	97,7
Modelo 2	0,9758	0,341	1,598	9,2	0,0	97,4
Modelo 3	0,9752	0,350	1,610	9,5	0,3	97,4
Modelo 4	0,9850	0,306	1,610	9,5	0,8	97,4
Modelo 5	0,9792	0,347	1,727	10,8	0,0	97,0

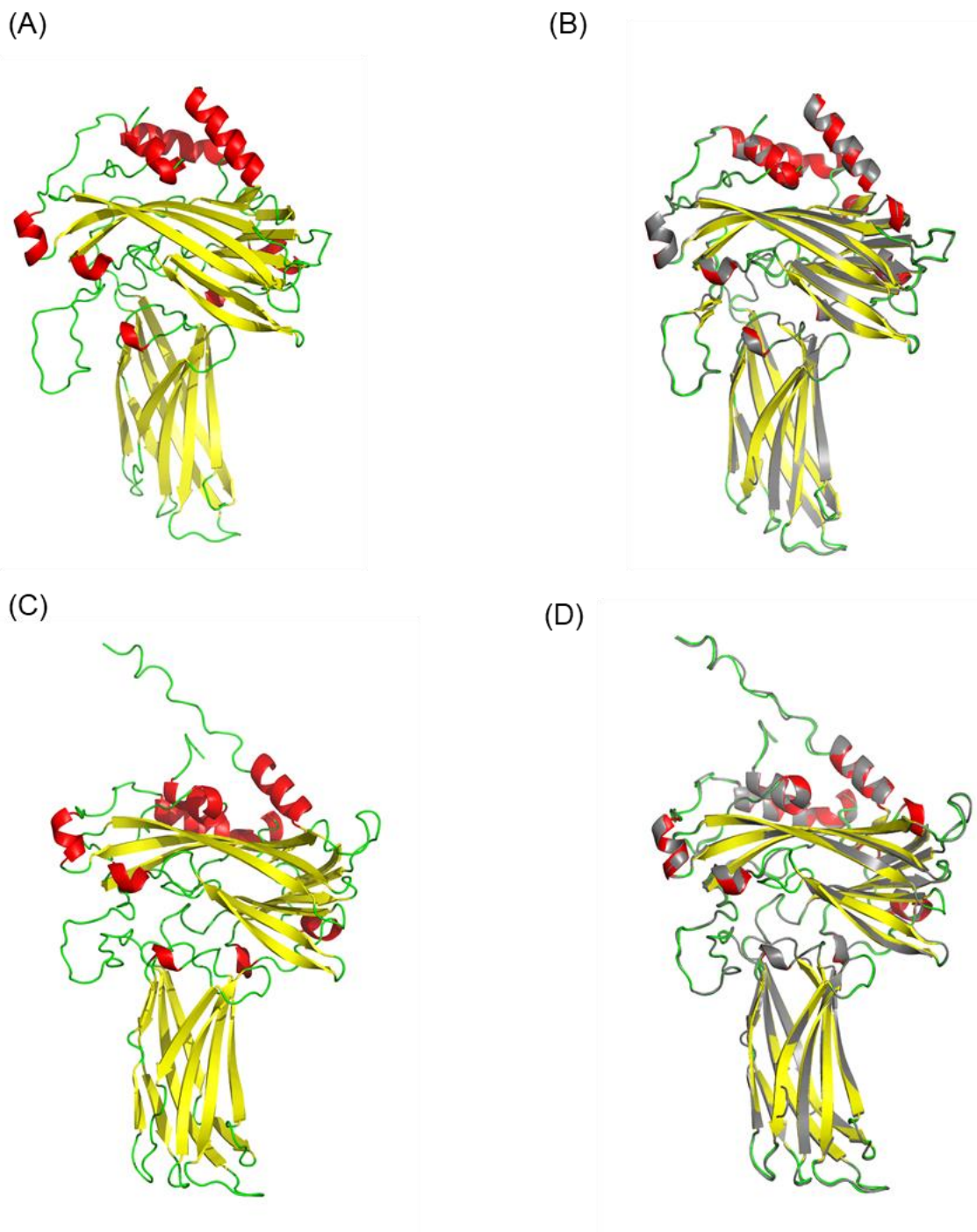


Figura 12. Modelo 3D da VP2 madura usando dois servidores de modelagem por homologia. (A) Phyre2, (C) SWISS-MODEL. Os modelos apresentam as estruturas de α -hélice (vermelho), folha- β (amarelo) e de alça (verde). Refinamento: sobreposição gerados pelo servidor GalaxyRefine das estruturas 3D refinadas (coloridas) dos modelos iniciais (cinza) gerados por Phyre2 (B) e SWISS-MODEL (D).

4.8. Validação da estrutura terciária dos modelos da proteína VP2

Para realizar a validação das estruturas terciárias da proteína VP2 foi usado o servidor ProSA. Os resultados de *Z-score* foram de -7.33 e -7.36 para o modelo 5

(Phyre2) e o modelo 4 (SWISS-MODEL) respectivamente (Figura 13A e 13C). Os resultados apresentam valores de *Z-score* dentro da faixa aceitável de proteínas nativas obtidas de diferentes fontes (raios-X, NMR), com tamanhos similares, o que evidencia uma alta qualidade do modelo. O servidor ProSA também valida a qualidade do modelo de forma local, agrupando os resíduos (*Windows size*), sendo que valores negativos não sugerem partes errôneas na estrutura do modelo (Figura 13B e 13D).

Os modelos escolhidos após o refinamento foram processados no servidor ERRAT e tiveram um fator de qualidade geral de 89,12 e 90,63% para o modelo 5 (Phyre2) e modelo 4 (SWISS-MODEL) respectivamente. Também foi usado o servidor VADAR para realizar a análise do gráfico Ramachandran que revelou uma pontuação de 97% nas regiões favorecidas (Figura 13E), 100% nas permitidas e 0% nas regiões não permitidas dos resíduos da VP2 da estrutura terciária do modelo refinado de Phyre2. Na mesma forma, para o modelo refinado de SWISS-MODEL, a análise do gráfico Ramachandran (Figura 13F) revelou uma pontuação de 97,4% nas regiões favorecidas, 100% nas permitidas e 0% nas regiões não permitidas.

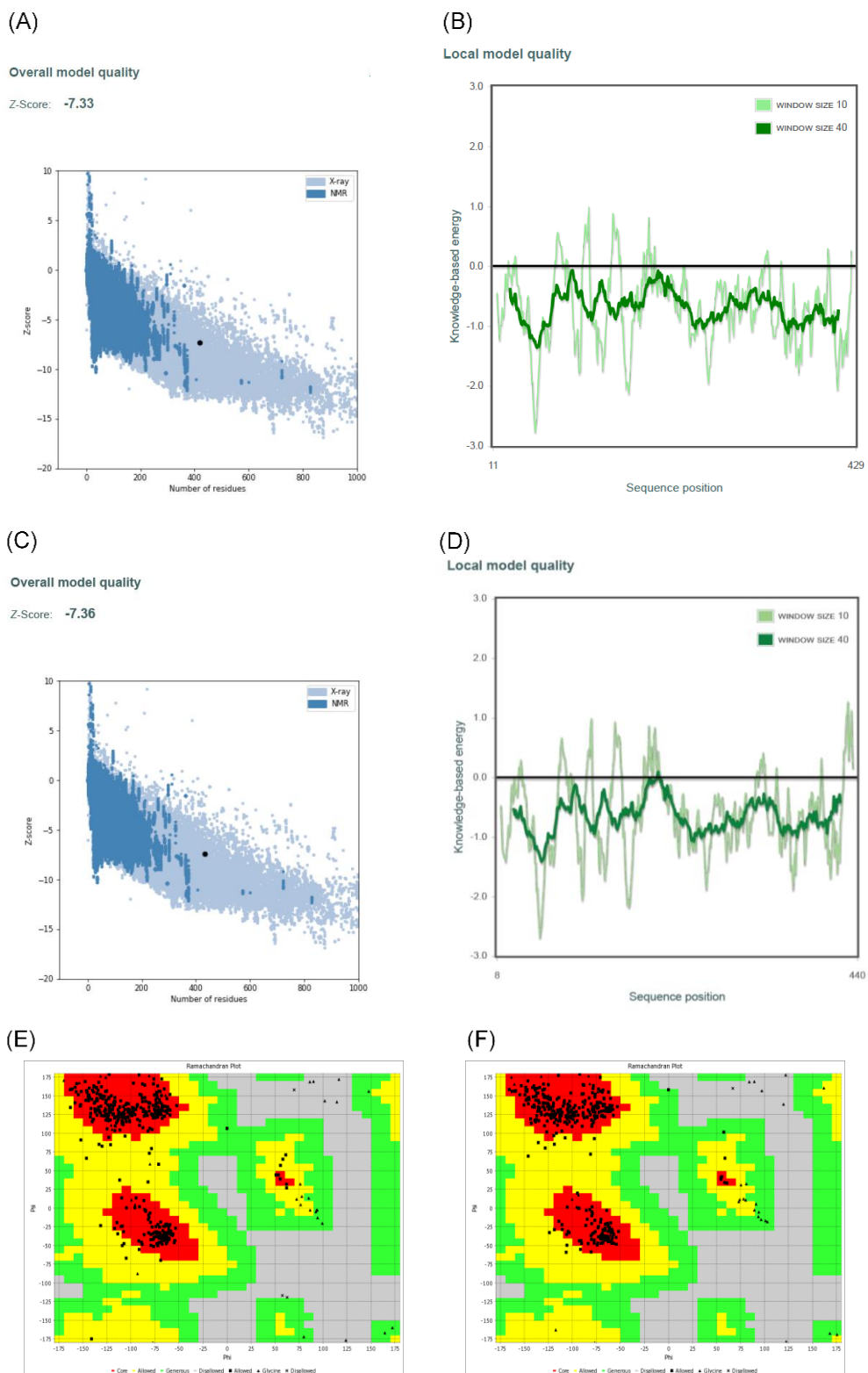


Figura 13. Validação pelo servidor ProSA da estrutura terciária dos modelos da VP2 refinados. (A) e (C) O Z-score dos modelos refinados foram de -7.33 e -7.36 do modelo 5 (Phyre2) e modelo 4 (SWISS-MODEL) respectivamente. (B) e (D) O servidor ProSA plota as pontuações de resíduos (*window size* 40) para verificar a qualidade do modelo local e os valores negativos sugerem a ausência de partes erradas da estrutura do modelo. Análise do gráfico de Ramachandran mostrando resíduos de proteínas favorecidos, permitidos e não permitidos de (E) Phyre2 e (F) SWISS-MODEL.

4.9. Predição de epítomos conformacionais de células B

Devido ao processo de refinamento de cada estrutura terciária dos modelos da proteína VP2 é possível realizar uma análise de epítomos conformacionais (descontínuos). O servidor ElliPro foi utilizado para predição dos epítomos conformacionais de células B a partir dos modelos de 3D refinados. O servidor ElliPro modelou 5 novos epítomos conformacionais de células B os quais envolvem um total de 223 resíduos de aminoácidos com pontuação na faixa de 0.551-0.801 para o modelo 5 (Phyre2). A conformação dos epítomos de células B apresentaram tamanhos na faixa de 3 a 143 resíduos de aminoácidos (Figura 14). Além disso, o servidor ElliPro modelou 5 novas epítomos conformacionais de células B os quais envolvem um total de 232 resíduos de aminoácidos com pontuação na faixa de 0.667-0.804 para o modelo 4 (SWISS-MODEL). A conformação dos epítomos apresentou tamanhos na faixa de 4 a 71 resíduos de aminoácidos (Figura 15).

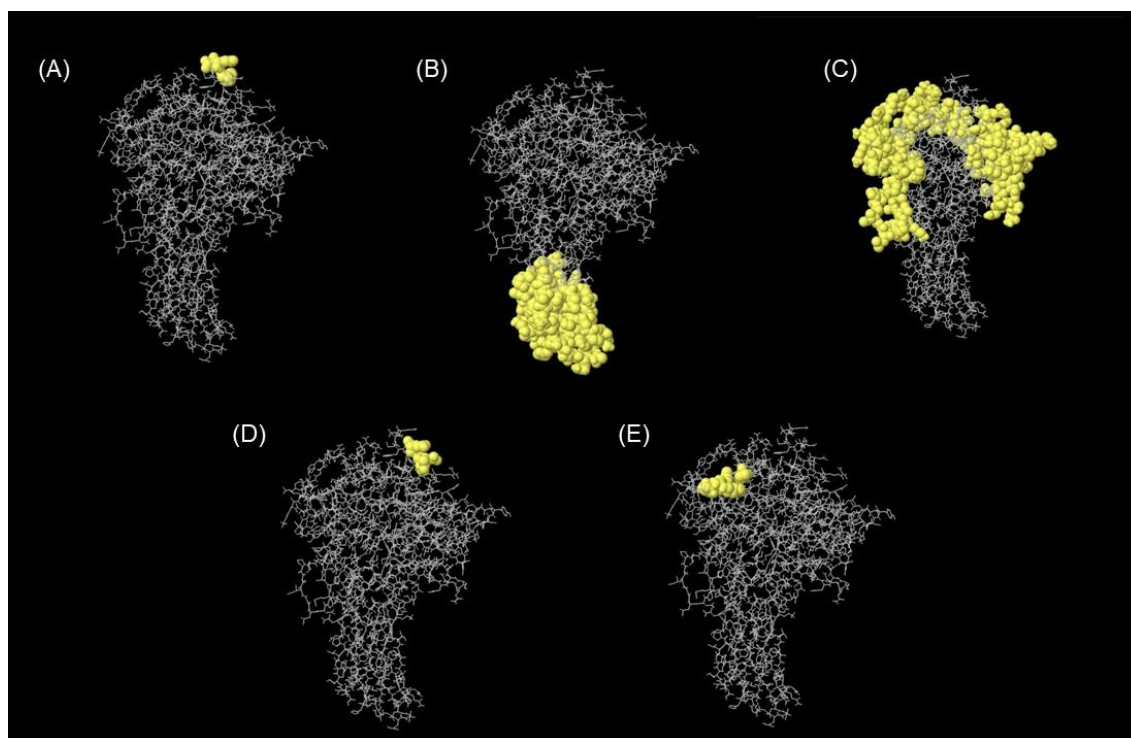


Figura 14. Representação tridimensional de epítomos conformacionais ou descontínuos de células B da VP2 gerada por Phyre2 baseada em multi-epítomos. **(A – D)** A superfície amarela representa os epítomos conformacionais ou descontínuos das células B, e a maior parte da poliproteína é representada em bastões cinza. **(A)** 3 resíduos com pontuação de 0.801. **(B)** 69 resíduos com pontuação de 0.782. **(C)** 143 resíduos com pontuação de 0.687. **(D)** 3 resíduos com pontuação de 0.660 **(E)** 5 resíduos com pontuação de 0.551.

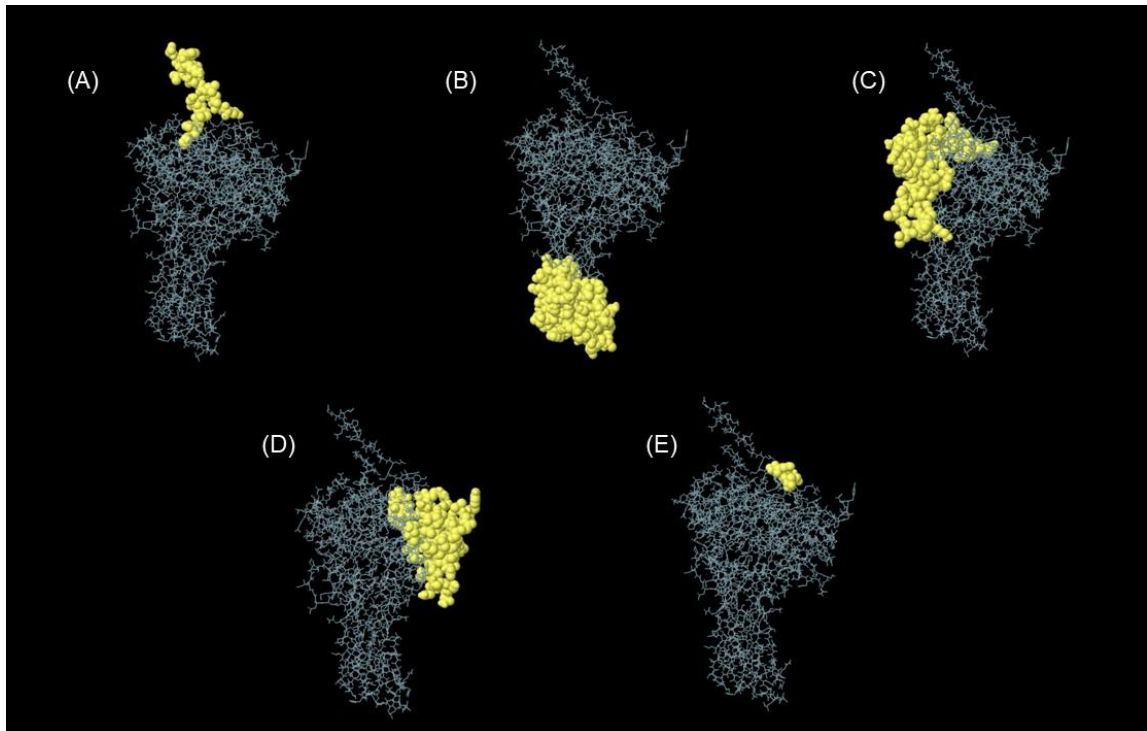


Figura 15. Representação tridimensional de epítomos conformacionais ou descontínuos de células B da VP2 gerada por SWISS-MODEL baseada em multi-epítomos. **(A – D)** A superfície amarela representa os epítomos conformacionais ou descontínuos das células B, e a maior parte da poliproteína é representada em bastões cinza. **(A)** 19 resíduos com pontuação de 0.804. **(B)** 71 resíduos com pontuação de 0.768. **(C)** 68 resíduos com pontuação de 0.680. **(D)** 70 resíduos com pontuação de 0.667. **(E)** 4 resíduos com pontuação de 0.626.

4.10. Epítomos consenso lineares e conformacionais da proteína VP2 madura

Foram selecionadas sequências de epítomos lineares que contém as regiões hidrofílicas dos picos A (QYQPGG) e B (KSGGQAGDQ). Os seis métodos computacionais do servidor IEDB foram utilizados para gerar os diferentes epítomos lineares. Foram gerados 10 epítomos lineares com a sequência do pico A (TAADDYQFSSQYQPGG, DSSDRPRVYTITAADDYQFS, SSSDRPRVYTITAADDYQFSS, CDSSDRPRVYTITAADDYQF, FSSQYQP, QFSSQYQ, TSKSGGQ, SKSGGQA, KSGGQAG e AADDYQFSSQYQP) e 10 epítomos lineares com a sequência do pico B (SKSGGQAGDQMSWS, DSSDRPRVYTITAADDYQFS, SSSDRPRVYTITAADDYQFSS, CDSSDRPRVYTITAADDYQF, TSKSGGQ, SKSGGQA, KSGGQAG, TSKSGGQAGDQMSWSARGSL, VTSKSGGQAGDQMSWSARGS e SKSGGQAGDQMSWSARGSLA). As sequências de cada pico foram alinhadas por MEGA X e sequências consenso foram obtidas (Figura 16). Na Figura 16A e 16C é possível observar o modelo da proteína VP2 madura gerada no servidor SWISS-

MODEL. Foram obtidas duas sequências consenso contendo os picos hidrofílicos A e B identificadas no modelo 3D. Da mesma forma, no modelo gerado no servidor Phyre2, conforme observado nas Figuras 16B e 16D, foi identificada na estrutura 3D a sequência consenso contendo os picos hidrofílicos A e B.

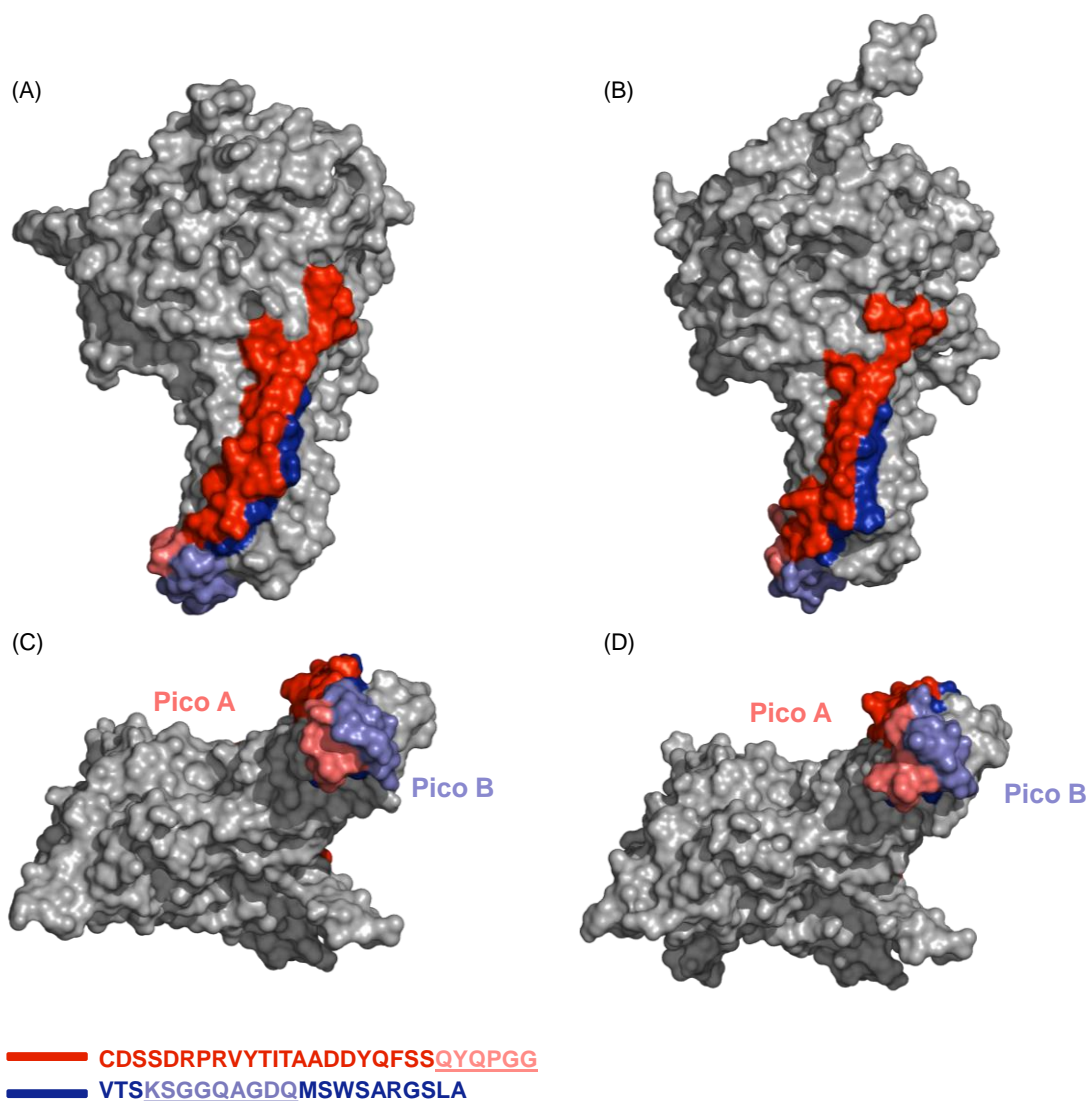


Figura 16. Comparação dos modelos 3D da proteína VP2 madura da cepa IBV GBV-8 gerados usando o programa PyMOL. Os dois picos hidrofílicos A e B foram identificados em cada estrutura 3D.

5. DISCUSSÃO

A doença de Gumboro é um dos maiores problemas na avicultura, por se tratar de uma doença com surtos frequentes nas granjas, sendo portanto de vital importância o uso extensivo de vacinas para o controle da doença. Cepas atenuadas clássicas são as mais usadas nos programas de vacinação. Cepas atenuadas de IBDV são utilizadas desde 1980 para proteção contra a doença de Gumboro (LETZEL et al., 2007), as quais tem se demonstrado pouco eficientes, uma vez que anticorpos maternos dos pintinhos interferem com as vacinas clássicas por produzir neutralização do antígeno (JEURISSEN et al., 1998).

Novas estratégias, como as vacinas recombinantes, vem sendo utilizadas para o desenvolvimento de vacinas com maior eficácia e segurança. Tendo em vista o cenário atual e a necessidade de uma vacina que não seja inativada pelos anticorpos maternos é necessário avaliar o antígeno candidato para produção de uma vacina recombinante, motivo pelo qual foi selecionada a cepa IBDV GBV- 8 para realização do sequenciamento do genoma e determinação da sequência de nucleotídeos da proteína VP2 madura como antígeno. Dessa forma, neste trabalho foram avaliadas as características antigênicas da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8 como um possível gene candidato a ser inserido no genoma do vírus de Marek FC-126 (vírus vetor) para a produção de uma vacina recombinante.

O uso da bioinformática aliada a genômica e proteômica permite a utilização de diversas ferramentas que facilitam muito a pesquisa e desenvolvimento de vacinas em relação ao desenho tradicional das mesmas. Portanto, a caracterização de proteínas para determinação de regiões imunogênicas é essencial para a escolha do melhor antígeno para o desenho de virus recombinantes utilizando métodos computacionais.

A identificação dos ORFs do segmento A foi realizada visando uma correta avaliação. Foram identificados os nucleotídeos relacionados os genes de expressão da proteína preVP2, protease VP4 e da proteína de capsídeo VP3, bem como o sítio de clivagem para obtenção da proteína VP2 madura. Uma avaliação molecular da região hipervariável da proteína VP2 madura das 17 cepas foi conduzida para comparação das sequências de nucleotídeo e aminoácidos. Alinhamentos múltiplos e uma análise filogenética da sequência da proteína VP2 madura auxiliou o

agrupamento das cepas de IBDV em diferentes grupos. A análise filogenética das cepas clássicas, atenuadas clássicas, não virulenta, variante antigênica e cepas muito virulentas selecionadas do banco GenBank revelou o agrupamento do gene VP2 maduro do IBDV GBV-8 dentro do mesmo clado da cepa IBDV D78 (cepa atenuada clássica) e a porcentagem de identidade foi superior a 99,9% para aminoácidos e nucleotídeos. A sequência de heptapeptídeo rica em serina SWSASGS, característica de cepas muito virulentas, adjacente ao pico B (região hidrofílica), foi conservada quando comparada as cepas atenuadas clássicas (IBDV PBG-98, IBDV D78 e IBDV CEF), podendo-se observar uma substituição S330R (SWSARGS). A substituição deste aminoácido da sequência do heptapeptídeo foi reportada como sendo uma característica de perda de virulência, o que produziria atenuação de cepas (ETERRADOSSI et al., 1999). Na posição 294 foi observado o aminoácido isoleucina somente nas cepas virulentas, e nas cepas restantes foi observado o aminoácido leucina. Acredita-se que cepas de IBDV com a substituição na posição 294 não estão relacionadas a sinais clínicos e mortalidade, mas podem produzir uma forma subclínica com atrofia de Bursa de Fabricius (RAJA et al., 2018).

As análises físico-químicas e moleculares de caracterização *in silico* foram realizadas na sequência de aminoácidos da proteína VP2 madura do IBDV GBV-8. A massa molecular (MW) da proteína VP2 madura foi de 47,1 kDa. A análise de solubilidade relativa da estrutura monomérica da proteína gera informações a respeito das propriedades ligadas à sua imunogenicidade. Os resultados revelaram que a proteína VP2 monomérica é solúvel. O ponto isoelétrico teórico de 4.93 sugere propriedades ácidas da proteína. A pontuação do índice de instabilidade de 27,90, evidencia que a proteína VP2 madura pode ser extremamente estável. Valores altos de índice alifático indicaram termoestabilidade e valores de hidropaticidade sugeriram uma natureza hidrofílica.

A caracterização e análise da estrutura secundária de proteínas pode revelar propriedades imunogênicas, sendo que regiões com estrutura de α -hélice e alça (*coil*) têm sido identificadas com propriedades similares a “antígenos estruturais” com capacidade de reconhecimento por anticorpos (CORRADIN; VILLARD; KAJAVA, 2008). As análises da estrutura secundária da proteína VP2 madura evidenciaram uma porcentagem de 51% da conformação em alça e 9% da conformação em α -hélice.

Os refinamentos e as validações das estruturas 3D da proteína VP2 madura por SWIS-MODEL e Phyre2 foram aprovados. O critério foi baseado nos resultados do gráfico de Ramachandran. Os resultados indicaram valores superiores a 97% dos resíduos nas regiões favorecidas e 0% nas regiões não favorecidas, evidenciando que os modelos da proteína VP2 madura pelos dois métodos apresentam alta qualidade, e portanto a modelagem molecular foi aceitável.

Foi realizada uma avaliação para predição de epítomos de células B da sequência de resíduos de aminoácidos do gene da proteína VP2 madura IBDV GBV-8. Sendo assim, uma avaliação de predição de epítomos de células B que pudessem estimular a imunidade humoral usando ferramentas bioinformáticas foi conduzida. A predição de epítomos de células B é relevante para determinação das características de antígenos no desenho de modelos vacinais e fornece informações a respeito de sítios de interação antígeno-anticorpo (PARVIZPOUR et al., 2020). Neste trabalho foram pesquisados diferentes epítomos gerados pelo servidor IEDB *Analysis Resource*. O critério de avaliação de possíveis epítomos foi a seleção das sequências contendo os picos hidrofílicos A (**CDSSDRPRVYTITAADDYQFSSQYQPGG**) e B (**VTSKSGGQAGDQMSWSARGSLA**).

Sequência consenso, gerada pelo programa MegaX, foi identificada nos modelos 3D. As análises revelaram que a proteína avaliada possui regiões imunogênicas, sendo evidenciada pela presença dos picos A e B dentro das sequências, quais se acreditam que são as principais áreas para neutralização do vírus por anticorpos (ETERRADOSSI et al., 2004), portanto, podemos afirmar que o estudo *in silico* permitiu prever os sítios com maior relevância para uma possível resposta por imunidade humoral que pode produzir a proteína VP2 madura da cepa IBDV GBV-8 e da viabilidade do seu uso como candidato para o desenvolvimento do vírus recombinante expressando a proteína.

6. CONCLUSÕES

Para o sucesso no desenvolvimento de uma vacina recombinante, é muito importante avaliar o antígeno a ser inserido dentro do vetor. Ferramentas bioinformáticas são poderosas para poder predecir se um modelo de vacina pode gerar o resultado desejado. Foi identificada a sequência de polipeptídeos do segmento A do genoma do IBDV GBV-8. Ademais, foi possível identificar a proteína VP2 madura com inserção do códon de parada para gerar o quadro de leitura aberto (ORF)

O presente trabalho apresentou resultados de características físico-químicas, modelagem molecular e propriedades de antigenicidade da proteína VP2 madura da cepa IBDV GBV-8. Resultados de antigenicidade, alergenicidade, solubilidade, propriedades físico-químicas e análise da estrutura terciária do antígeno resultaram ser satisfatórios.

Análise de epítópos lineares e estruturais da proteína VP2 madura mostraram que foi possível identificar os picos A e B, características do antígeno em outras cepas vacinais, sítios altamente hidrofílicos e com alta antigenicidade, sítios onde acontece a neutralização por anticorpos. Estes resultados preliminares são úteis para o análise de candidatos de genes exógenos para inserção num vector viral, mas também para futuras pesquisas para uso de desenho *in silico* de vacinas multiepítópos.

7. REFERÊNCIAS

- AZAD, A. A. et al. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. **Virology**, v. 161, n. 1, p. 145–152, 1987a.
- BAYLISS, C. D. et al. 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, n. 6, p. 1303–1312, 1 jun. 1990.
- BRANDT, M. et al. Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 75, n. 24, p. 11974–11982, 2001.
- CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the Secondary Structure of Proteins From Their Amino Acid Sequence. In: **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2006. v. 47p. 45–148.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.
- CORRADIN, G.; VILLARD, V.; KAJAVA, A. Protein Structure Based Strategies for Antigen Discovery and Vaccine Development Against Malaria and Other Pathogens. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 259–265, 18 abr. 2008.
- DEWEESE-SCOTT, C.; MOULT, J. Molecular modeling of protein function regions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 55, n. 4, p. 942–961, 1 jun. 2004.
- DIMITROV, I. et al. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. **Bioinformatics**, v. 30, n. 6, p. 846–851, 15 mar. 2014a.
- DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2 - A server for in silico prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, n. 6, p. 1–6, 31 maio 2014b.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 4, 5 jan. 2007.
- EMINI, E. A. et al. **Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide Downloaded from JOURNAL OF VIROLOGY**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/>>.
- ERIK, J. et al. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. 2006.
- ETERRADOSSI, N. et al. Avian Pathology Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. **Avian Pathology**, v. 28, p. 36–46, 1999.
- ETERRADOSSI, N. et al. Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. **Avian Pathology**, v. 33, n. 4, p. 423–431, ago. 2004.

HEBDITCH, M. et al. Protein-Sol: A web tool for predicting protein solubility from sequence. **Bioinformatics**, v. 33, n. 19, p. 3098–3100, 1 out. 2017.

HEINE, H.-G. et al. **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 I strains** *Journal of General Virology*. [s.l: s.n.].

HEO, L.; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W384, 2013.

JAISWAL, M.; ZAHRA, S.; KUMAR, S. Bioinformatics tools for epitope prediction. In: **Systems and Synthetic Immunology**. [s.l.] Springer Singapore, 2020. p. 103–124.

JEURISSEN, S. H. et al. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. **Immunology**, v. 95, n. 3, p. 494–500, nov. 1998.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212–213, abr. 1985.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1–2, p. 172–174, 10 dez. 1990.

LEE, G. R.; HEO, L.; SEOK, C. Effective protein model structure refinement by loop modeling and overall relaxation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 84, n. S1, p. 293–301, 1 set. 2016.

LETZEL, T. et al. Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious Bursal Disease Virus. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 81, n. 23, p. 12827–12835, 2007.

MAGNAN, C. N. et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 23, p. 2936–2943, dez. 2010.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. **The PSIPRED protein structure prediction server** *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://globin.bio.warwick.ac.uk/psipred/>>. Acesso em: 28 mar. 2021.

PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 1986.

PARVIZPOUR, S. et al. **Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches** *Drug Discovery Today* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2020.

PAXMAN, J. J.; HERAS, B. Bioinformatics tools and resources for analyzing protein structures. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1549p. 209–220.

PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins.

Immunology Letters, v. 36, n. 1, p. 83–99, 1993.

PONOMARENKO, J. et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. 2008.

RAJA, P. et al. Sequence analysis of VP2 hypervariable region of the field isolates of infectious bursal disease viruses from southern region of India. **Acta Virologica**, v. 62, n. 1, p. 86–97, 2018.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 17, n. 4, p. 355–362, 1 dez. 1993.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. **An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development** *Journal of Biomedical Informatics* Academic Press Inc., , 1 fev. 2015.

VAN DEN BERG, T. P. et al. Infectious bursal disease (Gumboro disease). **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 509–543, 2000.

VAN DEN BERG, T. P.; GONZE, M.; MEULEMANS, G. Avian Pathology Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain. **Avian Pathology**, v. 20, p. 133–143, 1991.

VAN DEN BERG, T. P.; MEULEMANS, G. Avian Pathology Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. **Avian Pathology**, v. 20, p. 409–421, 1991.

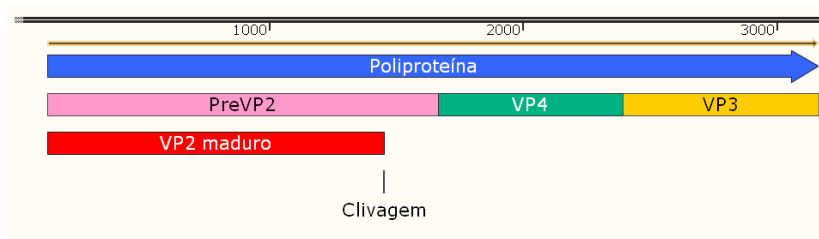
WANG, S. et al. Protein Secondary Structure Prediction Using Deep Convolutional Neural Fields OPEN. 2015.

ZHANG, S. Y.; LIU, S. L. Bioinformatics. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 338–340.

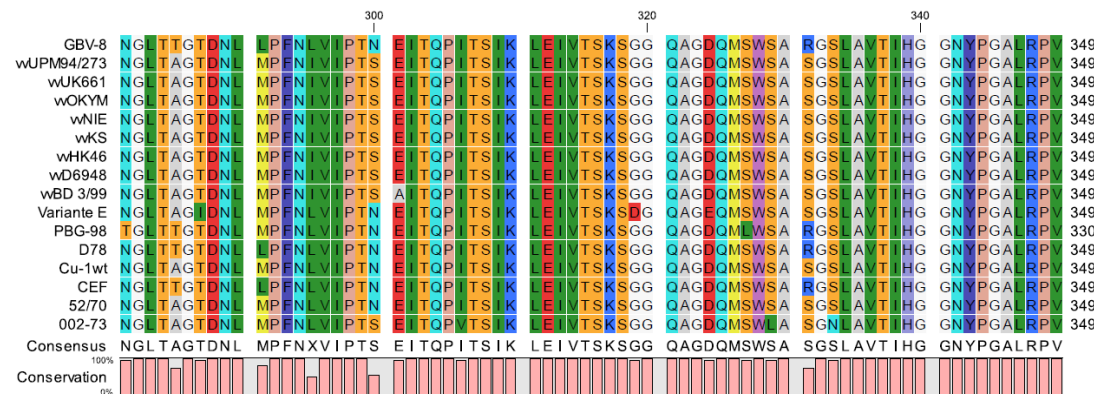
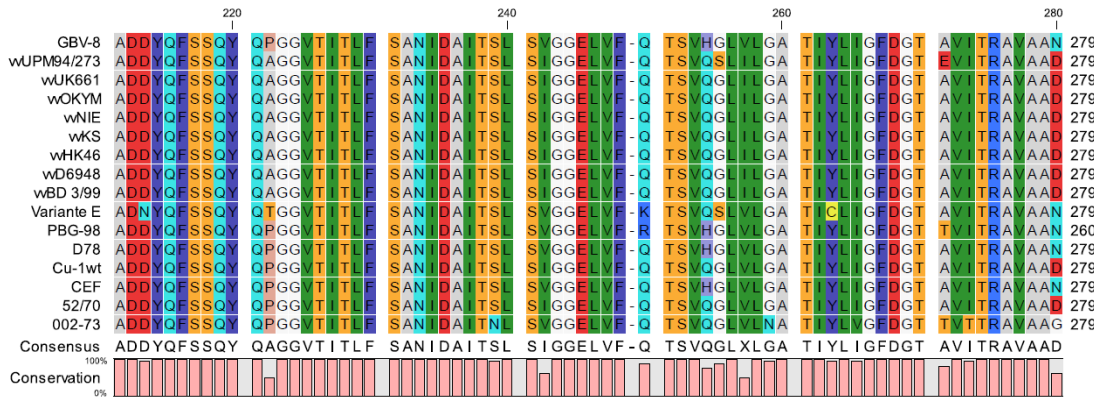
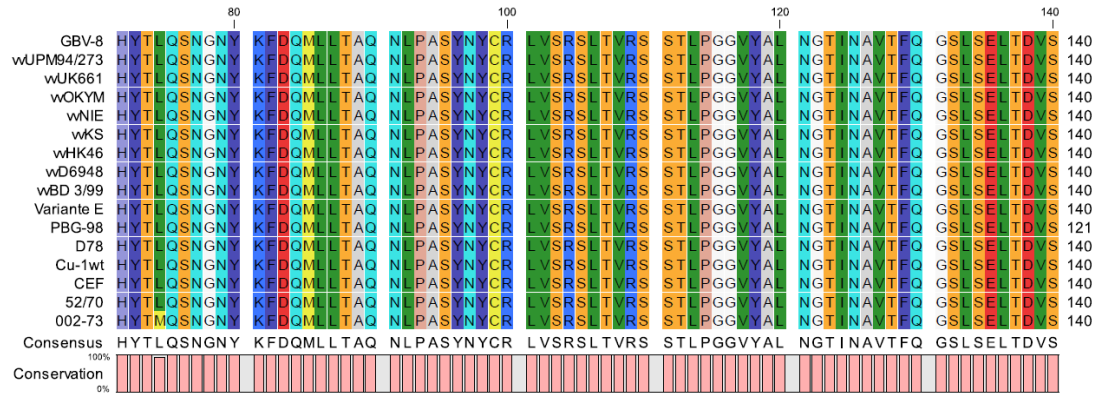
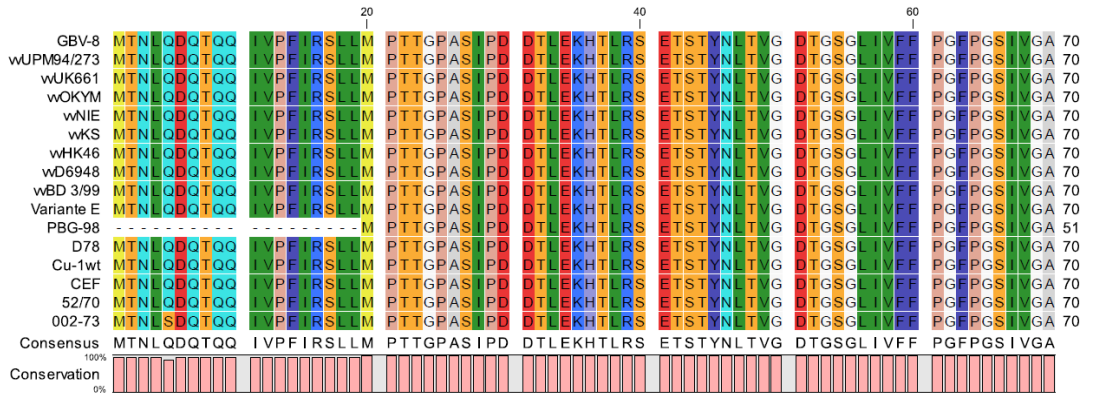
APÊNDICE 1

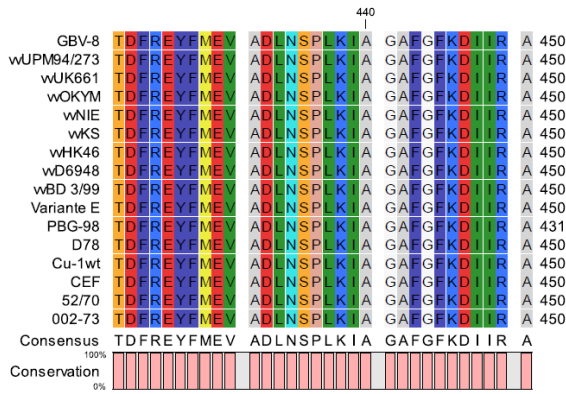
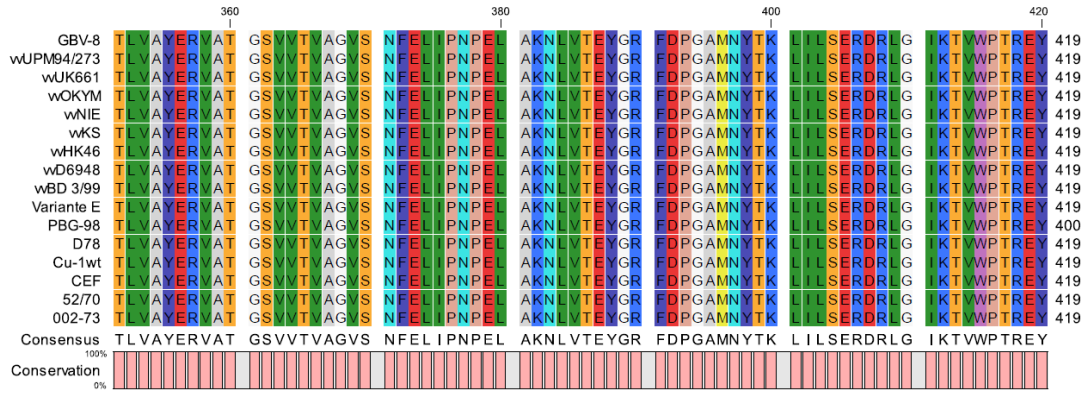
>Segmento A IBDV GBV-8

CCCGGGGACAGGCCGCCAAGGCCTTGTTCAGGATGGAACCTCCTCTTCTACAACGCTATCATTGATGGTCA
 GTAGAGATCAGACAAACGATCGCAGCGATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGGTTCAT
 ACGGAGCCTTCTGATGCCAACCAACCGGACCGGCGTCCATTCCGGACGACACCCTGGAGAAGCACACTCTC
 AGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGGACACAGGGTCAGGGCTAATTGTCTTTTTCCCTGG
 ATTCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTGCAGAGCAATGGGAACATAAGTTCGATCAGATGC
 TCCTGACTGCCAGAACCTACCGGCCAGTTACAATACTGCAGGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAG
 GTCAAGCACACTTCTGGTGGCGTTTATGACTAAACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGC
 CTGAGTGAAGTACAGATGTTAGCTACAATGGTTGATGTCTGCAACAGCCAACATCAACGACAAAATTG
 GGAACGTCTAGTAGGGGAAGGGGTACCCGCTCAGCTTACCCACATCATATGATCTTGGGTATGTGAG
 GCTTGGTGACCCATTCCCGCAATAGGGCTTGACCCAAAAATGGTAGCCACATGTGACAGCAGTGACAGG
 CCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGGTAA
 CAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGAGCTCGTGTTCAA
 ACAAGCGTCCACGGCCTTGTACTGGGCGCCACCATCTACCTCATAGGCTTTGATGGGACAGCGGTAATCA
 CCAGGGCTGTGGCCGCAAACAATGGGCTGACGACCGGCACCGACAACCTTTTGCATTCAATCTTGTGAT
 TCCAACAAACGAGATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGT
 CAGGCAGGGGATCAGATGTCATGGTCCGCAAGAGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGCAACTAT
 CCAGGGGCCCTCCGTCCCGTACGCTAGTGGCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTGCTTACGGTC
 GCTGGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACGGCC
 GATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGAC
 CGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTTTCGTGAATACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCC
 CTGAAGATTGCAGGAGCAATTCGGCTTCAAAGACATAATCCGGGCCATAAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGT
 CTCCACATTGTTCCACCTGCCGCTCCCCTAGCCCATGCAATTGGGGAAGGTGTAGACTACCTGCTGGGCG
 ATGAGGCACAGGCTGCTTCAGGAACTGCTCGAGCCGCTCAGGAAAAGCAAGAGCTGCCTCAGGCCGCATA
 AGGCAGCTGACTCTCGCCGCCGACAAGGGGTACGAGGTAGTCGCGAATCTATTCCAGGTGCCCCAGAATCC
 CGTAGTCGACGGGATTCTTGCTTACCTGGGGTACTCCGCGGTGCACACAACCTCGACTGCGTGTAAAGAG
 AGGGTGCCACGCTATTCCCTGTGGTTATTACGACAGTGGAAGACGCCATGACACCCAAAGCATTGAACAGCA
 AAATGTTTGCTGTCATTGAAGGCGTGCGAGAAGACCTCCAACCTCCTTCTCAAAGAGGATCCTTCATACGAAC
 TCTCTTGACACAGAGTCTATGGATATGCTCCAGATGGGGTACTTCCACTGGAGACTGGGAGAGACTACAC
 CGTTGTCCCAATAGATGATGTCTGGGACGACAGCATTATGCTGTCCAAAGATCCCATACCTCCTATTGTGG
 AAACAGTGAAATCTAGCCATAGCTTACATGGATGTGTTTCGACCCAAAGTCCCAATCCATGTGGCTATGACG
 GGAGCCCTCAATGCTTGTGGCGAGATTGAGAAAGTAAGCTTTAGAAGCACCAAGCTCGCCACTGCACACCC
 ACTTGGCCTTAAGTTGGCTGGTCCCAGGACTTCGATGTAACACCCGGGCCCAACTGGGCAACGTTTCATCAA
 ACGTTTCCCTCACAATCCACGCGACTGGGACAGGCTCCCCTACCTCAACCTACCATACCTTCCACCCAAATGC
 AGGACGCCAGTACCACCTTGCCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAGACCCCCGAACCTCGAGAGTGCCGTCA
 GAGCAATGGAAGCAGCAGCCAACGTGGACCCACTATTCCAATCTGCACTCAGTGTGTTTCATGTGGCTGGAAG
 AGAATGGGATTGTGACTGACATGGCCAACCTCGCACTCAGCGACCCGAACGCCATCGGATGCGAAATTTTC
 TTGCAAACGCACCACAAGCAGGCAGCAAGTCGCAAAGGGCCAAGTACGGGACAGCAGGCTACGGAGTGGA
 GGCTCGGGGCCCCACACCAGAGGAAGCACAGAGGGAAAAAGACACACGGATCTCAAAGAAGATGGAGACC
 ATGGGCATCTACTTTGCAACACCAGAATGGGTAGCACTCAATGGGCACCGAGGGCCAAGCCCCGGCCAGCT
 AAAGTACTGGCAGAACACACGAGAAATACCGGACCCAAACGAGGACTATCTAGACTACGTGCATGCAGAGAA
 GAGCCGGTTGGCATCAGAAGAACAATCCTAAGGGCAGCTACGTGATCTACGGGGCTCCAGGACAGGCAG
 AGCCACCCCAAGCTTTCATAGACGAAGTTGCCAAAGTCTATGAAATCAACCATGGACGTGGCCCAAACCAAG
 AACAGATGAAAGATCTGCTCTTGACTGCGATGGAGATGAAGCATCGCAATCCCAGGCGGGCTCTACCAAAGC
 CCAAGCCAAAACCAATGCTCCAACACAGAGACCCCTGGTCCGGCTGGGCCGCTGGATCAGGACCGTCTCT
 GATGAGGACCTTGAGTGAGGCTCCTGGGAGTCTT



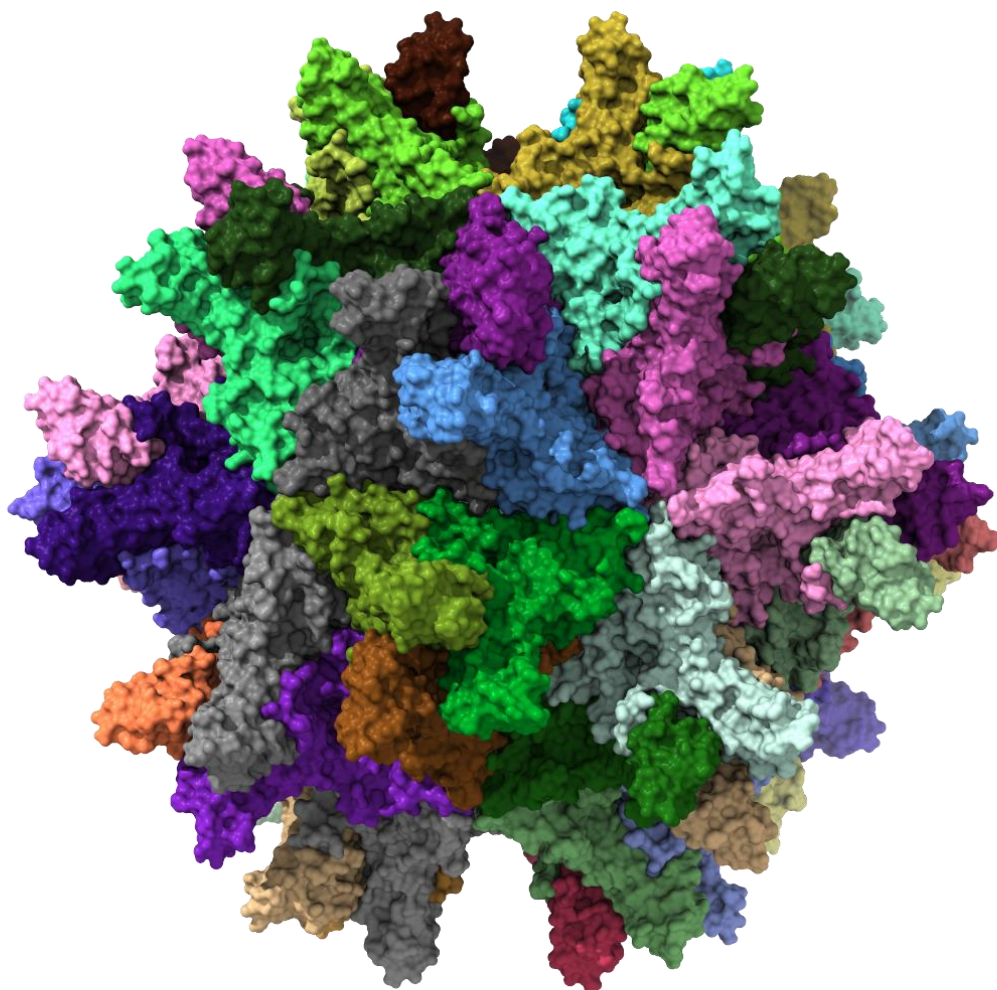
APÈNDICE 2





APÊNDICE 3

Estrutura VLP (*Virus Like-Particle*) formada por 60 monómeros da proteína VP2 do IBDV GBV-8 ligados por íons cálcio.



CAPÍTULO 3

CONSTRUÇÃO DE DOIS VÍRUS DE MAREK RECOMBINANTES EXPRESSANDO O GENE VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA SOB O CONTROLE DOS PROMOTORES CMV E SV40

1. INTRODUÇÃO

O vírus da doença infecciosa da Bursa (IBDV) ou também chamado de vírus da doença de Gumboro é um membro da família Birnaviridae, gênero Avibirnavirus, cujo genoma consiste em dois segmentos de RNA de fita dupla (A e B) com cerca de 3.200 e 2.800 nucleotídeos de comprimento, respectivamente (LU et al., 2015). O segmento A do genoma tem duas fases de leitura abertas parcialmente sobrepostas (ORF). A primeira e menor ORF codifica uma proteína VP5 não estrutural que não é essencial para a replicação do vírus e está envolvida na liberação do vírus. A segunda e maior ORF codifica uma poliproteína (preVP2-VP4-VP3) que pode ser autoclivada pela protease VP4 para formar as proteínas virais VP2 madura, VP3 e VP4 (LI et al., 2015).

O segmento B contém apenas o ORF da proteína VP1 que expressa a função da RNA polimerase do segmento e pode estar relacionado com a virulência. A proteína VP2 está localizada no capsídeo externo, que é responsável pela expressão de epítopos indutores de resposta de anticorpos, ou seja, antigenicidade, e permite a diferenciação de sorotipos e subtipos virais (neutralização por anticorpos). A proteína VP3 é encontrada no capsídeo interno e é a principal proteína responsável pela conformação estrutural do vírus e relacionada a antígenos específicos.

A doença de Marek (DM) é uma doença imunossupressora caracterizada por paralisia, perda crônica de movimento, linfoma visceral e muscular e cegueira em galinhas (MCPHERSON; DELANY, 2016). O vírus da doença de Marek (MDV), ou também chamado de herpesvírus Gallid é um membro da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpevirus, gênero Mardivirus (RONG; WHEELER; WEBER, 2014b). O vírus da doença de Marek pode ser dividido em três sorotipos. O sorotipo 1 está associado ao efeito oncogênicos, enquanto o sorotipo 2 e 3 não são oncogênicos. O genoma do MDV tem aproximadamente 160-175 kb de DNA e pode estar na forma de DNA linear ou circular (estrutura episomal) dependendo da cepa viral. A estrutura do genoma MDV contém várias seções, uma região única longa (UL) e uma região única curta (US), semelhantemente a outros Alphaherpevírus (MCPHERSON; DELANY, 2016).

Nos últimos anos, diferentes trabalhos têm utilizado a tecnologia recombinante para inserir genes de proteínas estruturais no genoma do MDV. Os trabalhos

demonstraram claramente a segurança e a eficácia das vacinas MDV como vetor viral. A falta de eficácia e segurança de algumas vacinas e as variações antigênicas de algumas doenças motivaram a busca pelo desenvolvimento de novas vacinas. O uso de vacinas recombinantes tornou possível a produção de vacinas de vírus ativos com melhorias significativas em segurança e eficácia. As vacinas recombinantes podem ser classificadas em três tipos: vacinas de DNA ou RNA, vacinas de subunidades recombinantes e vacinas vetorizadas (NASCIMENTO; LEITE, 2012).

A produção de uma vacina vetorizada recombinante consiste em identificar o material genético do patógeno e segmentá-lo por ação enzimática DNase ou RNase. O segmento de RNA ou DNA é identificado por sua capacidade de expressar uma proteína capaz de ser reconhecida por anticorpos ou células imunocompetentes eficazes em neutralizar a ação infecciosa do patógeno. Assim, o material genético desejado é selecionado. Se o material genético for RNA, ele é convertido em cDNA pela transcriptase reversa. O DNA ou cDNA é então inserido em um hospedeiro receptor que geralmente é uma levedura, bactéria ou vírus. Um ou mais segmentos gênicos podem ser inseridos por recombinação no organismo receptor (VAN KAMPEN, 2001). Portanto, por meio da tecnologia do DNA recombinante é possível gerar vacinas virais como vetores para a expressão de antígenos protetores a outros vírus. Essa classe de vacina é chamada de "vacinas vetorizadas" (HUANG et al., 2003).

Novas tecnologias desenvolvidas nos últimos anos geraram um rápido aumento na pesquisa e desenvolvimento de tecnologias biosintéticas e de engenharia de bioprocessos com a finalidade de gerar organismos geneticamente modificados de uma forma mais simples, economizando custos e tempo (XIN et al., 2018). Biologia sintética é uma área emergente que combina as disciplinas da biologia, engenharia, física e matemática para desenhar, criar e manipular novos sistemas biológicos (CHOWNK et al., 2018). A biologia sintética foi definida pela *UK Royal Society* como *“uma área emergente de pesquisa que pode ser amplamente descrita como o projeto e a construção de novas vias, organismos ou dispositivos biológicos artificiais ou o redesenho de sistemas biológicos naturais existentes”* (RAI et al., 2018).

Do exposto acima, a Biologia sintética pode ajudar a desenvolver novos organismos aplicando novas ferramentas e metodologias como a genética reversa e a transformação genética. Desta forma, é possível desenhar vetores de plasmídeos

específicos para cada organismo com diferentes marcadores de seleção, assim como com diferentes promotores, permitindo processos de recombinação de forma otimizada (XIN et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Produzir vírus recombinantes de Herpesvírus de peru (HVT) cepa FC-126 expressando o gene de expressão da proteína VP2 madura do vírus da doença infecciosa da Bursa (IBDV) cepa GBV-8.

2.2. Específicos

- a) Construir dois vetores plasmidiais contendo o gene de expressão da proteína VP2 madura sob controle de dois promotores (pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40US2-VP2-GBV8).
- b) Clonar os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40US2-VP2-GBV8 em células quimio-competentes DH5 α .
- c) Determinar a concentração mínima do antibiótico Geneticina (G418) para inibição do crescimento de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) e inibição da replicação viral do HVT FC-126.
- d) Otimizar a fórmula (mistura DNA:lipossomo) de transfecção em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40US2-VP2-GBV8 complexado com a Lipofectamina 2000.
- e) Inserir o gene de expressão da proteína VP2 na região US2 do genoma do HVT FC-126 para gerar os vírus recombinantes rHVT-CMV e rHVT-SV40.
- f) Verificar a expressão da proteína VP2 em células infectadas pelos vírus recombinantes rHVT-CMV e rHVT-SV40.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus e células.

A cepa de vacinal HVT FC-126, fornecida pela empresa Biovet-Vaxxinova (Brasil) foi usada como o vírus original para a produção dos vírus HVT recombinantes (rHVT). Os HVTs FC-126 foram propagados a partir células primárias de fibroblastos de embrião de galinha (FEGs) preparadas a partir de ovos livre de patógenos específicos (SPF) embrionados com 10 dias de idade e mantidos em meio MEM (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB).

3.2. Construção e sínteses dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.

A sequência da proteína preVP2 tem aproximadamente 1,5 kb, dos quais cerca de 1,3 kb pertence à sequência da proteína VP2 madura (proteína estrutural). Para gerar o ORF da sequência do gene da proteína VP2 madura foi realizada a substituição do códon TTC, que codifica o aminoácido fenilalanina, pelo códon de parada TAA nas posições 1324-1326. Os promotores são sequências específicas responsáveis pela ligação da RNA polimerase ao início da transcrição e, portanto, pela expressão do gene. Dois vetores foram desenhados para construção, cada um com diferentes promotores para o gene da proteína VP2. O primeiro promotor foi o de citomegalovírus (CMV) (0,2 kb), um forte promotor de expressão em mamíferos do citomegalovírus humano seguido por intensificador de citomegalovírus (0,38 kb) e o segundo promotor foi o Vírus Simian 40 (SV40) (0,3 kb). Os terminadores também são responsáveis pela poliadenilação do RNA mensageiro. O objetivo deste pós-processo em células eucarióticas é promover a longevidade da transcrição. Portanto, no gene sintético foi inserido na região downstream a sequência de sinal SV40 poli (A). Para facilitar a seleção de células eucariotas transfectadas com os vetores, o gene de resistência NeoR/KanR sob o controle do promotor SV40 foi inserido. O gene NeoR/KanR (0,8 kb) confere resistência à neomicina, canamicina e G418 (Geneticina). Este gene de resistência será utilizado como marcador de seleção dos vírus recombinantes. Por último, a construção da sequência de DNA sintético foi realizada com as sequências flangeadoras 5' e 3' US2 HVT FC-126 (1 kb) envolvendo a região de codificação completa (1,3 kb) do gene da proteína de VP2 madura do IBDV GBV-8 e a região codificadora de resistência NeoR/KanR. Foram inseridos sítios de restrições KpnI

(região UP) e EcoRI (região DOWM) para serem inseridos dentro do vetor pBlueScript II KS(+). Assim foi feita a construção de vetores personalizados a partir da síntese de genes e de clonagem padrão. A síntese gênica foi realizada pela Genscript (EUA). O pedido foi feito através da FastBio (distribuidor oficial da GenScript no Brasil).

3.3. Ressuspensão e armazenamento dos vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.

Os vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 liofilizados fornecidos pela empresa FastBio foram reconstituídos em 20 µL de água ultrapura e vortexados durante 1 minuto. As amostras foram aquecidas a 50°C durante 15 minutos para uma reconstituição completa. Processo de transformação foi imediatamente realizada depois da reconstituição. Enquanto na forma liofilizada, os plasmídeos foram armazenados em freezer a -20°C.

3.4. Clonagem dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8

3.4.1 Transformação das células *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente com os vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8

As suspensões de células competentes DH5α foram descongeladas em gelo durante 10 minutos. Alíquotas de 50 µL da suspensão destas células foram adicionadas em microtubos de 1,5 mL. Em cada microtubo foi adicionado 10 pg de cada vetor pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8. As misturas resultantes foram homogeneizadas suavemente e mantidas em gelo por 30 minutos. Em sequência, as amostras foram submetidas a incubação em banho-maria a 42°C durante 30 segundos. Após este período, as amostras foram mantidas em gelo por 2 minutos. Finalizado o processo de choque térmico, 250 µL de meio SOC (*Caldo Super Ótimo com repressão de catabólitos*) foram adicionados a cada um dos tubos contendo as células transformadas. As misturas resultantes foram mantidas a 37°C por 1 hora sob agitação de 225 rpm. Uma diluição de 1:10 com meio SOC foi realizada para cada amostra para plaqueamento em placas Petri com meio sólido LB-Agar (Luria-Bertani Agar) suplementado com ampicilina (100 mg/mL), X-Gal (20mg/mL) e IPTG (100 mM). As placas contendo os meios sólidos foram incubadas *overnight* a 37°C em estufa. Para o controle do processo de transformação foi usado o vetor pBluescript II SK (+) como controle positivo. Após finalizado, uma colônia de cada

placa de LB Agar (pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8) foi isolada e inoculada em 100 mL de caldo LB contendo ampicilina (100 mg/mL) e incubado *overnight* a 37°C sob agitação de 200 rpm.

3.4.2. Extração, purificação e quantificação dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.

As culturas bacterianas com densidade ótica próxima a 2,0 em 600 nm (OD₆₀₀) foram coletadas para realizar a purificação dos plasmídeos sintéticos utilizando o *Purelink HiPure Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), segundo as instruções do fabricante. Uma cultura bacteriana com células competentes transfectadas com o vetor pUC19 foi usada como controle do processo. A concentração e a pureza do DNA (relação A₂₆₀/A₂₈₀) dos plasmídeos purificados foram determinados por espectrofotometria no equipamento Epoch™ 2 (Biotek).

3.5. Verificação da clonagem dos vetores

3.5.1. Digestão dos plasmídeos sintéticos com enzimas de restrição KpnI e EcoRI.

Para cada plasmídeo foi realizada uma dupla digestão num volume final de 20 µL. Na primeira digestão foi utilizada a enzima de restrição KpnI em excesso de 4 vezes. A reação foi incubada por 1 hora a temperatura de 37°C e a enzima foi inativada a 80°C por 20 minutos. Na segunda digestão, foi usada a enzima de restrição EcoRI. A reação foi incubada por 1 hora a 37°C e a enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. Em cada reação foi utilizado o tampão Tango (10x), sendo que, na primeira digestão foi usada uma baixa concentração de sal e na segunda reação, uma alta concentração de sal. O vetor pBluescript II SK (+) foi usado como controle do processo.

3.5.2. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos sintéticos

Após a digestão dos plasmídeos, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Para a análise foi usado o equipamento *FlashGel™* (Lonza., Basel, Switzerland). As amostras foram diluídas em corante de carga *FlashGel™* (1X). Cinco microlitros (5 µL) das amostras diluídas (5-20 ng/banda) foram aplicadas em cassetes *FlashGel™* DNA (agarose a 1,2%, 12 + 1 camada simples). Para a corrida do gel foi aplicada uma voltagem de 275 V durante 7 minutos. A

eletroforese foi realizada com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8, pSV40 US2-VP2-GBV8 e pBluescript II SK (+)

3.5.3. Sequenciamento dos plasmídeos sintéticos

Amostras purificadas dos plasmídeos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 foram sequenciadas pelo método Illumina. O sequenciamento foi realizado pela empresa BPI.

3.6. Cultura de célula

3.6.1. Células primárias de fibroblasto de embrião de galinha (FEG)

Cultivos de células de fibroblasto de embrião (FEG) de galinha foram preparados a partir de ovos embrionados SPF (livres de patógenos específicos) com 10 dias de incubação. A casca dos ovos embrionados foi desinfetada com álcool 70%. As cascas foram cortadas com tesoura e os embriões foram retirados e colocados em placa de Petri de vidro. Foram descartadas a cabeça, as extremidades dos membros e as vísceras dos embriões e depois transferidos para um frasco tipo Schott de 100 mL. Foram realizadas lavagens sucessivas dos embriões com solução PBS para retirada das hemácias e outros restos celulares até que o líquido desprezado se apresente transparente. Em seguida foi feita a adição de 3 mL de tripsina citrada por embrião. O frasco, juntos com os embriões, foi guardado durante 5 horas para que as células dos embriões se individualizassem. Após este período, foi descartado o sobrenadante e foi realizada a lavagem com meio de cultura por duas vezes. Na terceira lavagem, foi adicionado meio de cultura acrescido de 5% de Soro Fetal Bovino na proporção de 4 mL por embrião e foi realizada agitação para que ocorra o desprendimento das células individuais. A suspensão celular foi filtrada em Becker com *voil*. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer utilizando azul tripan como indicador de células viáveis em microscópio invertido.

3.6.2. Titulação viral em FEG

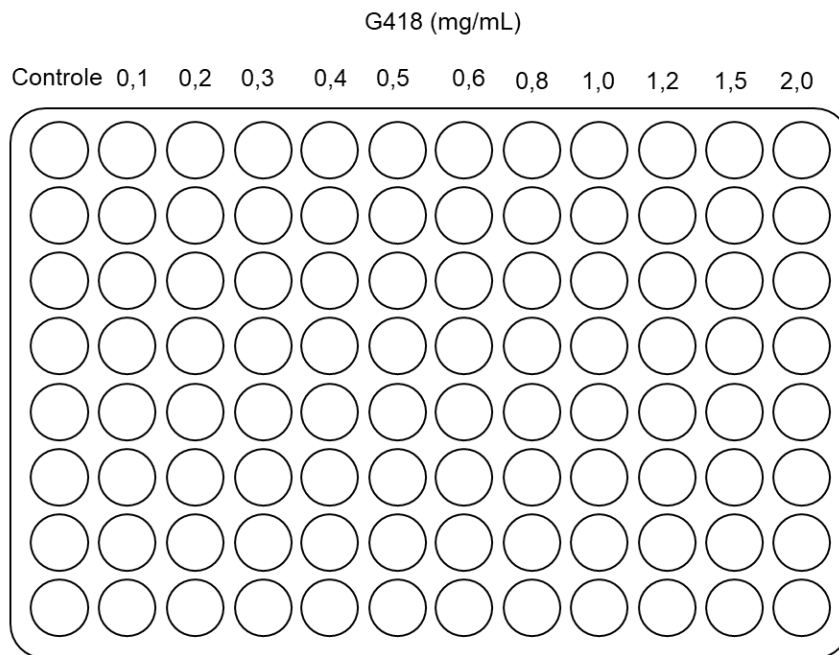
Células primárias de fibroblasto de embrião de galinha foram preparadas de ovos com 10 dias de incubação e semeadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células em placas de 6 poços. Um dia depois de plaqueadas as células, foi observada a confluência e a viabilidade celular. Foi verificada a morfologia celular padrão em monocamada confluenta em aproximadamente 90% da área plaqueada. Cinco

diluições seriadas em base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) da amostra de HVT FC-126 com meio MEM sem soro fetal bovino foram realizadas. O meio de cultura previamente existente em cada poço foi descartado. Quatrocentos microlitros (400 μ L) de cada diluição viral foram adicionados em cada poço e incubados em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora. Após o período de incubação, em cada poço foi adicionado meio MEM para um volume final de 3 mL. As placas foram incubadas em estufa durante 5 dias. O título viral foi determinado em unidades formadoras de *plaque* (PFU - *plaque forming units*). O PFU formado foi verificado quando placas pequenas, claras e distintas com uma borda circular bem definida contra a luz foram observadas. O número de placas para cada diluição foi contado considerando a média das repetições na mesma diluição. A contagem desconsiderou poços com menos de 5 ou mais de 100 placas. O controle negativo obtido apresentou monocamada uniforme e foi usado como um controle de referência. Para determinação do título viral da amostra foi considerado o número médio de placas para uma determinada diluição e o inverso do fator de diluição total segundo a seguinte fórmula:

$$PFU/mL = \frac{\text{Media de numero de placas}}{\text{Diluição} \times \text{Volume}}$$

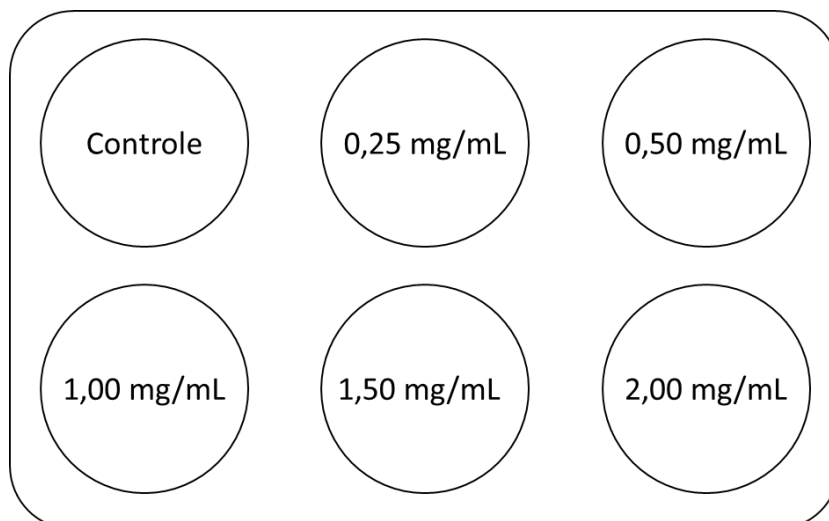
3.6.3. Sensibilidade das células de FEG ao antibiótico Geneticin (G418).

Em 3 microplacas de 96 poços foram cultivadas células de fibroblasto de embrião de galinha em monocamada na concentração de 5×10^4 células por poço em meio de cultura MEM com 5% de soro fetal bovino. O cultivo durou 24 horas para que houvesse formação de confluência superior a 90%. Diferentes concentrações do antibiótico Geneticin (G418) diluído em meio MEM com 5% sem soro fetal bovino foram adicionadas nas microplacas segundo o seguinte esquema:



As 3 placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em diferentes tempos de incubação: 2, 5 e 7 dias. Após o tempo de incubação, em cada poço foi adicionado 20 µL de MTT (5 mg/mL) e estes, em seguida foram incubados em estufa durante 3 horas, até formação dos cristais de formazan. O meio foi retirado e foram adicionados em cada poço 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), até solubilizar os cristais. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e a viabilidade foi determinada.

O mesmo processo foi realizado em placa de 6 poços em triplicata. Nestas placas, cultivos de células de fibroblasto de embrião de galinha em monocamada e concentração de $2,5 \times 10^6$ células por poço foram incubados em meio de cultura MEM com 5% de soro fetal bovino por 24 horas até a formação de confluência superior a 90%. Concentrações de Genitocina (G418) de 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 e 2,0 mg/mL com um tempo de incubação de 2 dias foram utilizadas no ensaio segundo o esquema abaixo:



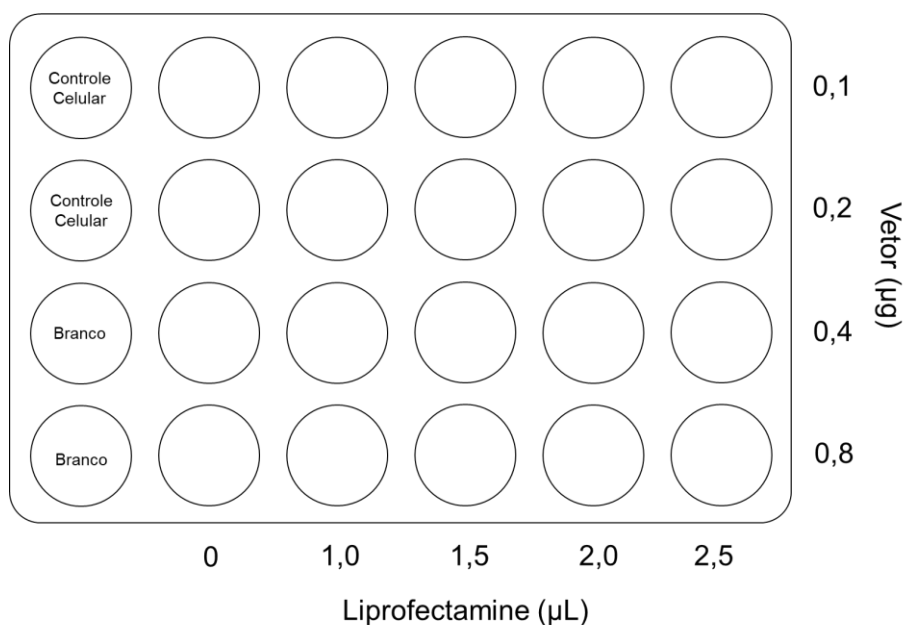
Após a incubação, em cada poço foi adicionado 330 μ L de MTT (5mg/mL) e realizou-se a incubação do material por 3 horas. Depois deste período, o meio foi retirado e adicionado 5 mL de dimetilsufóxido (DMS). As absorbâncias foram determinadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 550 nm e a viabilidade foi verificada. Observações microscópicas de cada poço foram realizadas.

3.6.4. Inibição da replicação de HVT FC-126 pelo antibiótico Geneticina (G418) em FEG

Em 3 placa de 6 poços foram cultivadas células de fibroblasto de embrião de galinha em monocamada e concentração de $2,5 \times 10^6$ células por poço em meio de cultura MEM com 5% de soro fetal bovino até a obtenção de confluência superior a 90%. Em cada poço, as células foram infectadas com $1,25 \times 10^4$ PFU de HVT FC-126 e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações de Geneticina (G418) a 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 e 2,0 mg/mL e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após quarenta e oito horas, as células infectadas foram coletadas para titulação. O meio de cultura foi removido, adicionou-se 1 mL de 0,05% de tripsina-EDTA (0,48 mM) em cada poço e as células foram incubadas a 37°C em estufa por 10 minutos. Depois, as células foram ressuspensas, transferidas a microtubos de 1,5 mL com 50 μ L de SFB para inativar a tripsina e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS com 1% de SFB. As suspensões foram utilizadas para determinar o título de cada amostra.

3.6.5. Otimização da fórmula de transfecção em FEG

Um dia antes da transfecção, em uma placa de 24 poços foram cultivadas células de fibroblasto de embrião de galinha em monocamada em concentração de $2,5 \times 10^5$ células por poço em médio de cultura MEM com 5% de soro fetal bovino até a obtenção de confluência de aproximadamente de 80%. Para a transfecção foi usado o reagente lipídico catiônico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os vetores e a Lipofectamina foram diluídos apropriadamente com meio Opti-MEM. Cinquenta microlitros (50 μ L) dos vetores diluídos e 50 μ L da Lipofectamina diluída foram misturados e depois incubados por 5 minutos. Diferentes quantidades dos vetores e da Lipofectamina foram usadas segundo o seguinte esquema abaixo.



O meio MEM com 5% do SFB foi substituído por 2,5 mL do meio Opti-MEM na monocamada de FEG. Cinquenta microlitros (50 μ L) de cada complexo DNA-lipídeo catiônico foram adicionados gota a gota em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 16 horas. Após a transfecção, o meio Opti-MEM foi substituído pelo antibiótico Geneticina (G418) diluído em meio MEM a uma concentração final de 1,5 mg/mL. As placas foram incubadas por 48 horas. Após o período de incubação, em cada poço foram adicionados 330 μ L de MTT (5 mg/mL) e estes foram incubados por 3 horas até formação dos cristais de formazan. O meio de cultura foi retirado e posteriormente foi adicionado a cada poço 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura

das placas foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e a viabilidade celular de cada poço foi determinada.

3.6.6. Transfecção e isolamento de HVT recombinantes (rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2)

Células de fibroblasto de embrião de galinha foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células por poço em microplaca de 6 poços durante 24 horas até 80% de confluência. Meio micrograma (0,5 μ g) do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 foi transfectado com 5 μ L de Lipofectamina 2000 em um dos poços, em outro poço 1 μ g do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 foi transfectado com 5 μ L de Lipofectamina 2000. A formação do complexo e a transfecção foi realizada em meio Opti-MEM. Dezesesseis horas após, as células foram infectadas com 1×10^4 PFU por poço e incubadas por 48 horas. Após esta incubação, o meio das células infectadas foi substituído por meio MEM suplementado com 5% de SFB e com antibiótico G418 na concentração de 1,5 mg/mL e as microplacas foram incubadas durante 48 horas. Finalizada a incubação e com o processo de infecção completo, cada poço foi digerido em tripsina 0,05% por 5 minutos. A tripsina foi inativada com 50 μ L de SFB. As amostras digeridas foram transferidas para células CEF semeadas em placas de 6 poços. Quarenta e oito horas (48h) após a infecção, foi adicionado meio MEM suplementado 5% de SFB e com antibiótico G418 na concentração de 1,5 mg/mL e as amostras foram mantidas até a observação do completo efeito citopático ou morte celular. Este processo foi repetido 3 vezes. Após o processo de seleção, as células infectadas foram coletadas e transferidas para meio MEM com 5% de SFB sem adição do antibiótico.

RESULTADOS

4.1. Construção dos vetores

Foram construídos dois vetores contendo o gene de expressão da proteína VP2 madura sob controle de dois diferentes promotores (CMV e SV40). Para seleção das células transfectadas, foi utilizado o gene de expressão de resistência NeoR/KanR. Os vetores foram construídos com a inserção de sequências flanqueadoras (1 kb) à região US2 para direcionar a recombinação homóloga (Figura 1). A construção dos vetores foi realizada usando pBlueScript II KS(+).

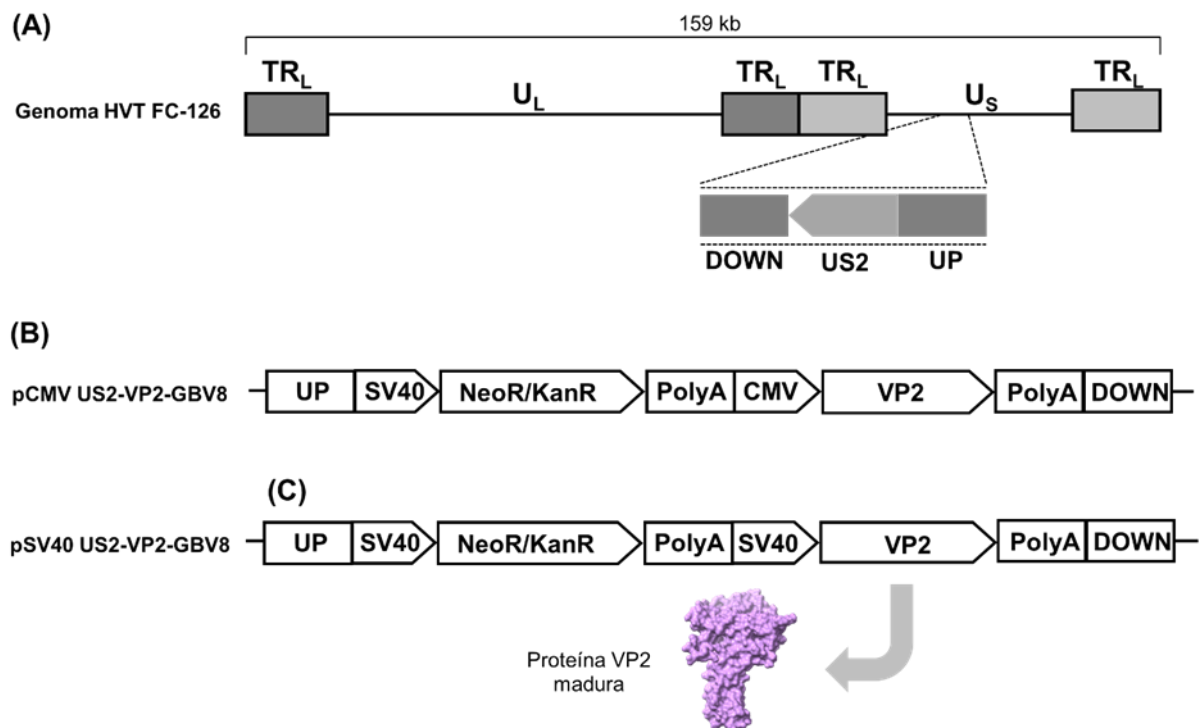


Figura 1. Construção dos vetores contendo o gene VP2 maduro sob o controle de diferentes promotores. **(A)** Estrutura genômica da cepa HVT FC-126 (159 kb). Localização da região U₂ com as sequências flanqueadoras inseridas nos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 para recombinação homóloga. **(B)** Diagrama esquemático do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 contendo o gene VP2 maduro sob controle do promotor CMV. **(C)** Diagrama esquemático do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 contendo o gene VP2 maduro sob controle do promotor SV40.

4.2. Transformação das células de *Escherichia coli* DH5 α

A transformação das células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DH5 α foi realizada com 10 pg dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-

GBV8 (Figura) resultando em eficiências de transformação de $\sim 4,5 \times 10^6$ CFU/ μ L e $\sim 1,7 \times 10^7$ CFU/ μ L respectivamente (Figura 2).

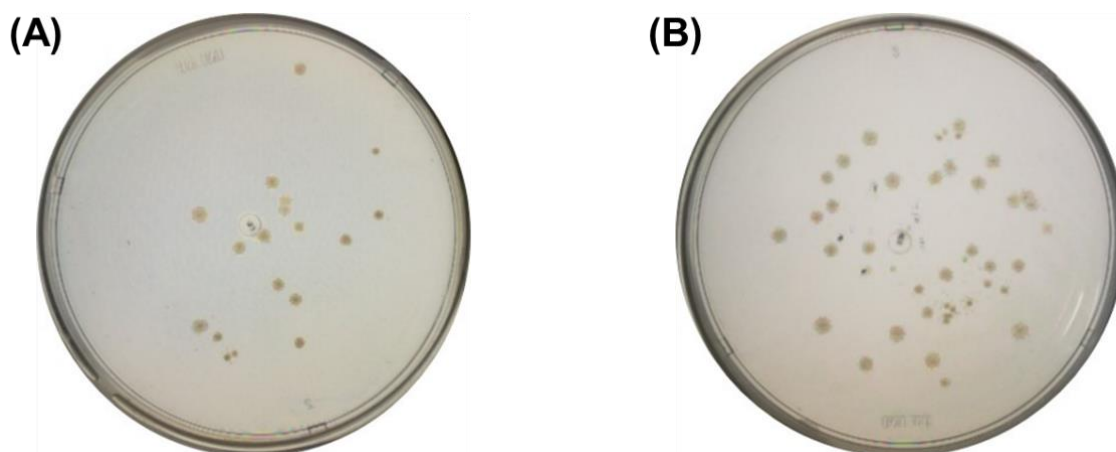


Figura 2. Isolamento das células de *E. coli* DH5 α transformadas com os vetores. **(A)** Colônias das células transformadas com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8. **(B)** Colônias das células transformadas com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8.

4.3. Extração e purificação dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8

As colônias isoladas de cada vetor foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina (1 μ g/mL). Uma colônia de cada placa foi adicionada a 200 mL de meio que posteriormente foi incubado *overnight* com agitação a 37°C. Os vetores foram extraídos e purificados. Foi realizado um espectro de absorvância das amostras purificadas para determinação da pureza e da concentração (Figura 3). Os resultados de concentração foram de 450,6 ng/ μ L e 650,2 ng/ μ L para os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 respectivamente. Avaliou-se também a pureza do material genético purificado. Valores da razão de A_{260}/A_{280} foram de 1,878 (pCMV US2-VP2-GBV8) e 1,891 (pSV40 US2-VP2-GBV8), sendo que os valores aceitos para esta razão estão entre 1,8-2,2. Portanto, os valores obtidos de razão das absorvâncias evidenciaram um alto grau de pureza dos vetores purificados.

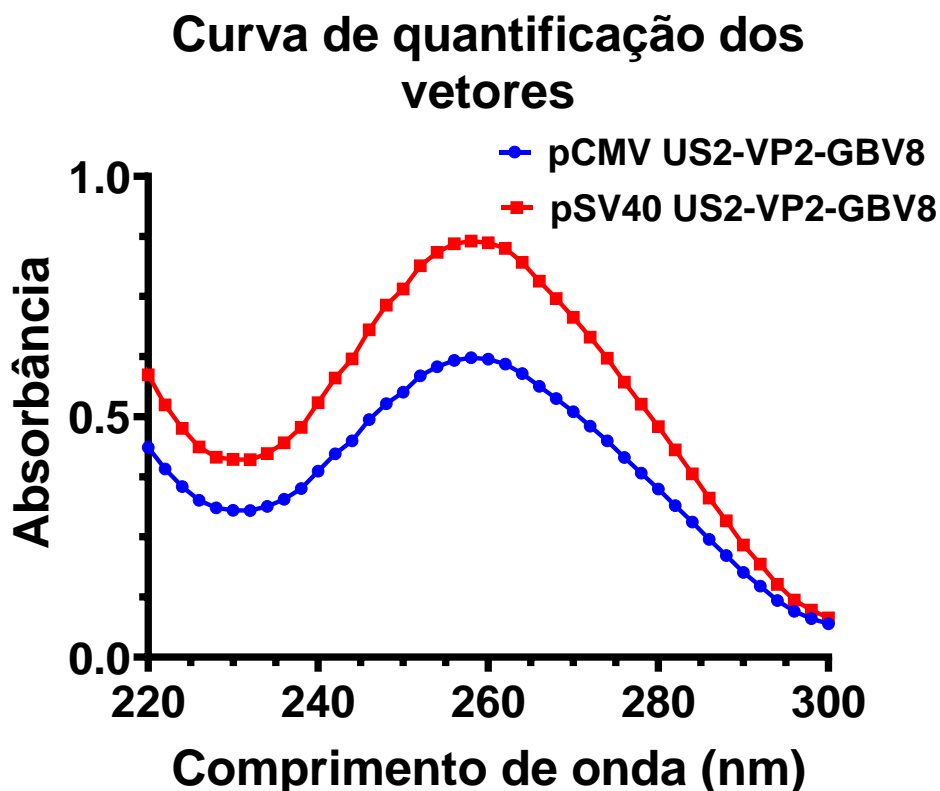


Figura 3. Gráfico de espectro de absorvância dos vetores com comprimentos de onda relevantes para determinação da pureza do material genético.

4.4. Eletroforese em gel de agarose dos vetores digeridos pelas enzimas de restrição KpnI e EcoRI

Após a verificação da pureza dos vetores, foi realizada a digestão com enzimas de restrições KpnI e EcoRI dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 amplificados. Previamente, uma simulação de gel de agarose 1% no Snapgene dos vetores foi executada para avaliação do perfil de digestão, e portanto dos produtos resultantes da digestão (Figura 4A). Os produtos resultantes da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e comparados com o perfil do gel simulado, onde observou-se que as linhas marcadas em quadro apresentaram o mesmo perfil de bandas (Figura 4B). Para o controle do processo, foi realizada a digestão do vetor de transferência pBlueScript II KS(+). Foi observado um único fragmento de 2909 pb (linha 2). O fragmento de 52 pb não foi observado possivelmente devido ao tamanho reduzido. Os produtos de digestão do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 (linha 4) consistiram de dois fragmentos. O fragmento superior apresentou 5297 pb, que representa o cassete de expressão da proteína VP2 sob

controle do promotor CMV para recombinação homóloga, e o fragmento inferior com 2917 pb, que forma parte da estrutura restante do vetor pBlueScript II KS(+). Da mesma forma, foram obtidos dois produtos de digestão do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 (linha 6). O fragmento superior apresentou 5028 pb, consistindo do cassete de expressão da proteína VP2 sob controle do promotor SV40, e o fragmento inferior (2917 pb) representa o restante do vetor pBlueScript II KS(+).

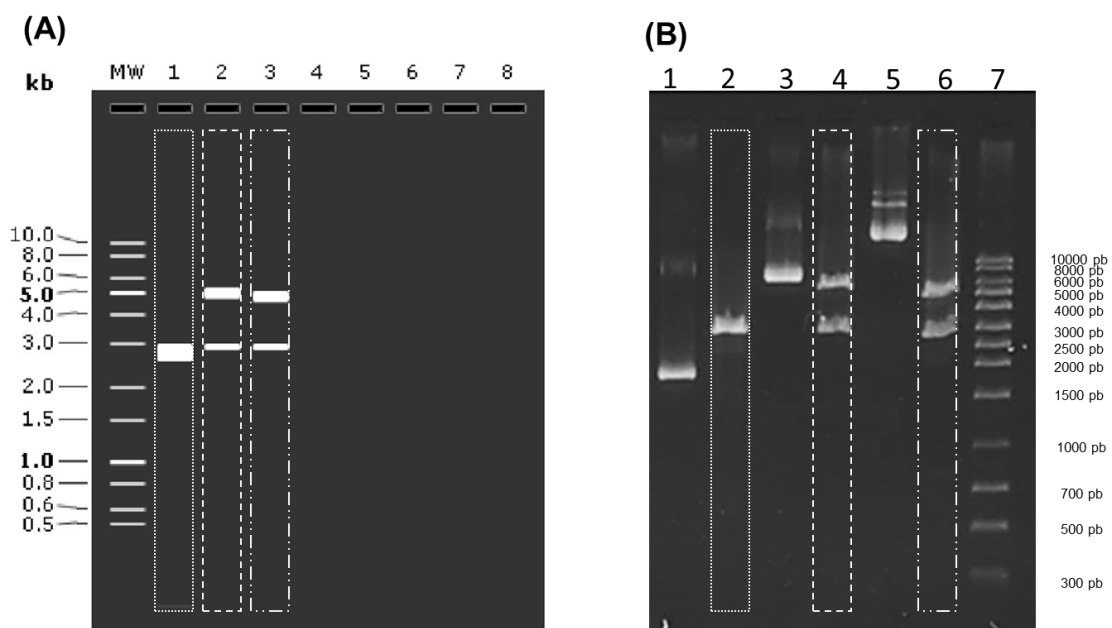


Figura 4. Digestão por enzimas de restrição dos vetores pBlueScript II KS(+), pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8. **(A)** Simulação do gel de agarose 1% dos vetores. MW: Marcador 1kb. 1: pBlueScript II KS(+). 2: pCMV US2-VP2-GBV8 (KpnI + EcoRI). 3: pSV40 US2-VP2-GBV8 (KpnI + EcoRI). **(B)** Eletroforese em gel de agarose 1% experimental. 1: pBlueScript II KS(+). 2: pBlueScript II KS(+ (KpnI + EcoRI). 3: pCMV US2-VP2-GBV8. 4: pCMV US2-VP2-GBV8 (KpnI + EcoRI). 5: pSV40 US2-VP2-GBV8. 6: pSV40 US2-VP2-GBV8 (KpnI + EcoRI). 7: Marcador 1kb.

4.5. Titulação do HVT FC-126

Ampolas da amostra vacinal de HVT FC-126 em nitrogênio líquido foram fornecidas pela empresa Biovet-Vaxxinova. No microscópio foi observado o efeito citopático das células infectadas com HVT FC-126 relacionado às características da infecção viral. Células de embrião de galinha sem infecção (células normais)

apresentaram morfologia heterogênea com um citoplasma ramificado (prolongamentos citoplasmáticos) (Figura 5).

Após 24 horas de inoculação foram observados aglomerados de pequenos policarócitos circulares em diferentes pontos da monocamada celular. Após 120 horas, diferentes características (morfologia nuclear) do efeito citopático foram observadas. Foram identificados numerosos policariócitos circulares, células na fase de degeneração terminal e núcleos preenchidos por massa homogênea difusa, nucléolos neste tipo de núcleo geralmente são localizados na periferia do foco infeccioso (AYAZ; SHARMA; KENZY, 1972). Áreas centrais claras foram identificadas no foco de infecção devido ao desprendimento de algumas células infectadas que aumentaram de tamanho com mais horas de incubação.

A amostra foi titulada em monocamada de células de embrião de galinha (FEG) com o objetivo de determinar os números de PFU/mL necessários para realizar a infecção das células transfectadas com os vetores para a recombinação homóloga. Microplacas de 6 poços foram usadas para realizar a titulação, sendo que 400 µL do vírus diluído 10 x foram inoculados para infecção nas monocamadas de FEG com um tempo de absorção de 1 hora. Após a contagem de *plaques* nos poços da diluição de 10^{-4} (21, 21 e 12 PFU/ poço), obteve-se um título de $2,2 \times 10^5$ PFU /mL do HVT FC-126 como banco de trabalho.

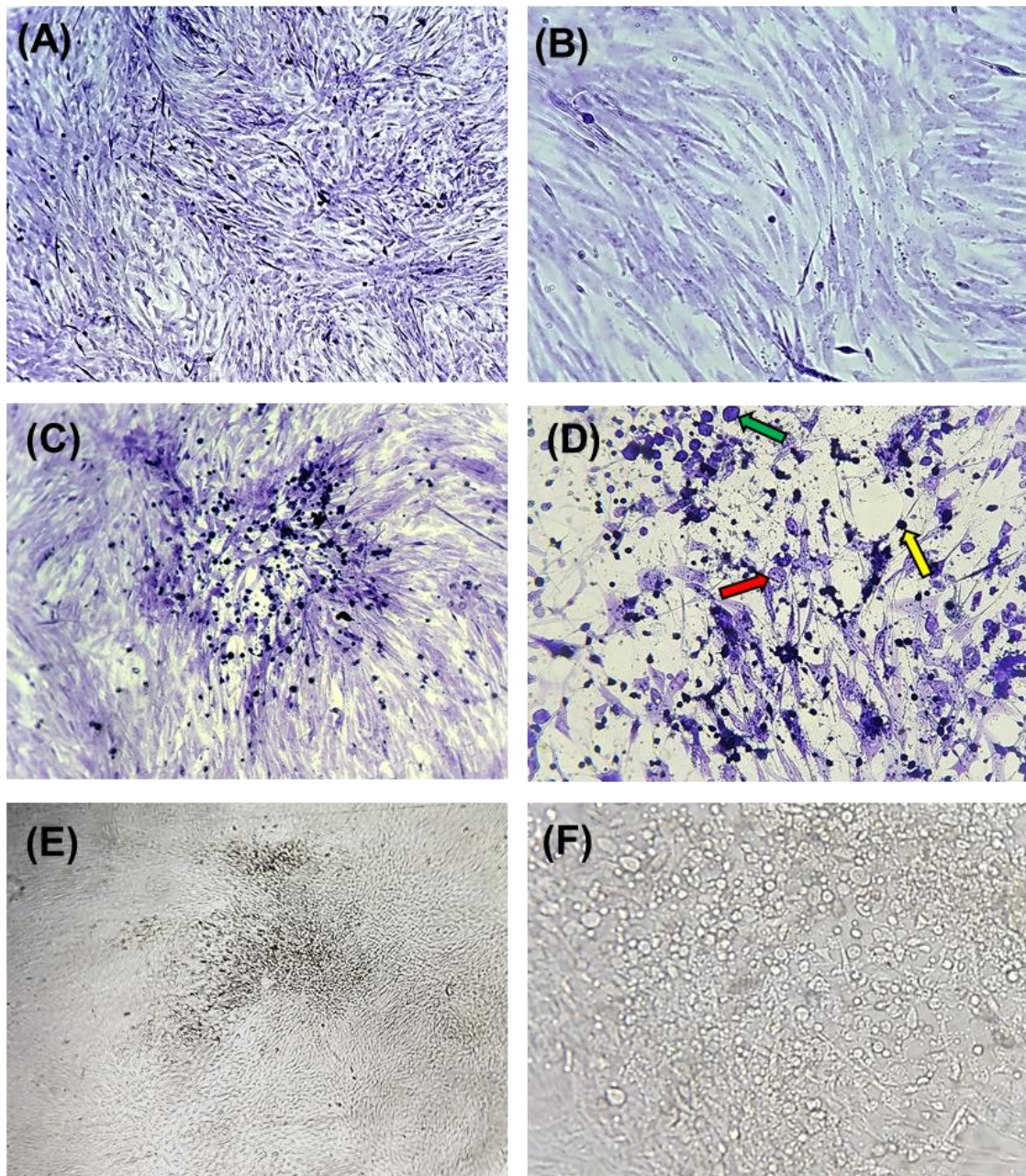


Figura 5. Células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) observados por microscópio invertido. **(A)** Monocamada de FEG (100X). **(B)** Monocamada de FEG (400X). **(C)** Coloração imuno-histoquímica das células FEG infectadas com HVT FC-126 com 5 dias de incubação (100X). **(D)** Coloração imuno-histoquímica das células FEG infectadas com HVT FC-126 com 5 dias de incubação (400X), onde é possível observar policariócitos circulares (seta vermelha), degeneração terminal celular (seta amarela) e células com massa homogênea difusa (seta verde) (400X). **(E)** Morfologia das *plaques* após 120 horas da infecção com HVT FC-126 (100x). **(F)** Morfologia das células FEG infectadas (400X).

4.6. Ensaio de sensibilidade das células FEG com o antibiótico Geneticin (G418)

O ensaio de sensibilidade das células de fibroblasto de embrião de galinha ao antibiótico Geneticin (G418) foi realizado em microplaca de 96 poços. Diluições de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,5 e 2,0 mg/mL do antibiótico foram preparadas (Figura 6). Cada diluição foi adicionada a 5×10^4 células por poço e cada valor da porcentagem de viabilidade celular representa a média de oito repetições, sendo que o ensaio foi executado com diferentes tempos de incubação (2, 5 e 7 dias).

Em baixas concentrações de G418 (0,1 mg/mL) as células com 2 dias de incubação apresentaram os valores mais altos de porcentagem de viabilidade celular (11,2%). Células incubadas com 5 e 7 dias mostraram valores entre 2% e 5,5 % de viabilidade celular. Com o aumento das concentrações de G418 foi observada uma diminuição exponencial dos valores das células incubadas durante 2 e 5 dias, e com concentrações superiores a 1,2 mg/mL os resultados de porcentagem de viabilidade celular estiveram abaixo de 0,2% com tempos de incubação de 2 e 5 dias.

Uma porcentagem de viabilidade celular equivalente a 0,082% foi obtida com G418 a 1,5 mg/mL após incubação por 7 dias, e uma viabilidade celular próxima a zero foi obtida após incubação durante 2 e 5 dias.

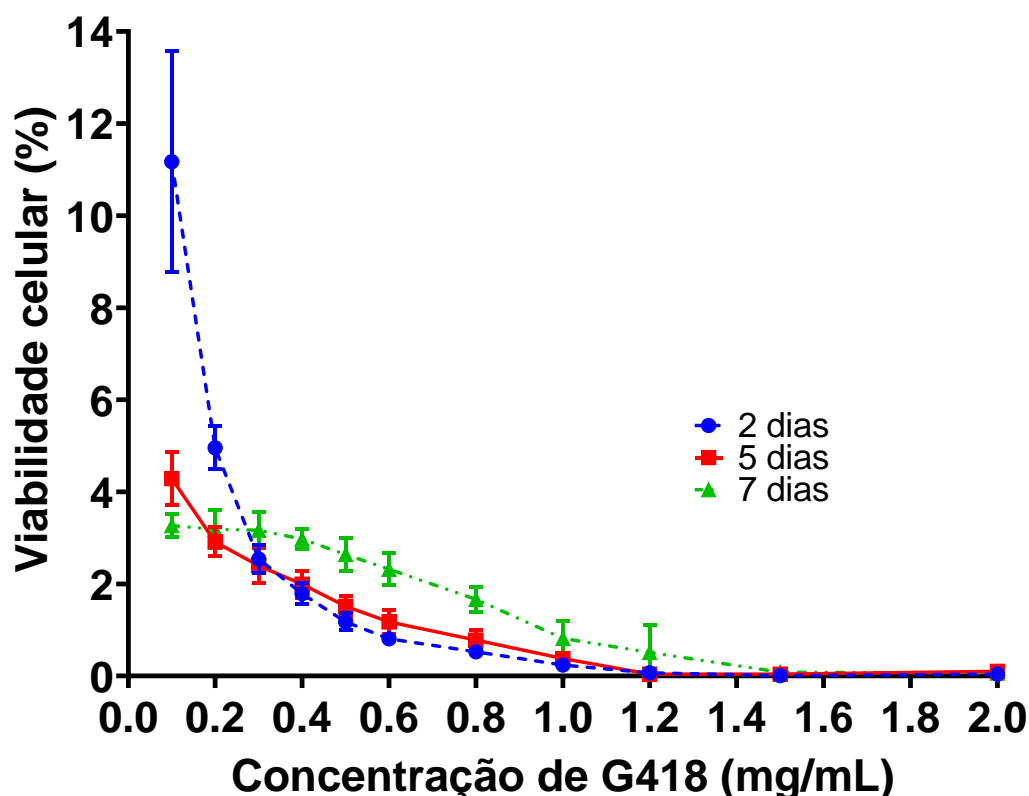


Figura 6. Gráfico de sensibilidade das células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) ao antibiótico Geneticin (G418) nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,5 e 2,0 mg/mL com tempos de incubação de 2, 5 e 7 dias. Cada ponto representa a média de oito repetições. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de viabilidade celular MTT.

O mesmo teste de sensibilidade foi realizado em placas de 6 poços com células FEG ($2,5 \times 10^6$ células por poço.) Cinco diferentes concentrações do antibiótico G418 (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL) foram selecionados. Similar aos resultados obtidos com placas de 96 poços, foi observada uma diminuição exponencial das porcentagens de viabilidade celular com aumento das concentrações do antibiótico. Mudanças na estrutura na monocamada foram evidenciadas na observação ao microscópio (Figura 7).

Os resultados de viabilidade celular foram avaliados por análise de variância simples (one-way ANOVA) para determinar se havia diferença significativa entre os grupos. O antibiótico G418 produziu uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) da porcentagem de viabilidade celular quando as células foram incubadas por 48 horas em relação ao cultivo celular controle (MOCK). Entre os grupos das concentrações de 0,25 e 0,50 mg/mL de G418 foi observada uma diferença significativa ($p = 0,006$) na porcentagem de viabilidade celular, com redução significativa observada para a maior

concentração do antibiótico. Os valores de viabilidade de 16,0% para concentração de 0,25 mg/mL e 6,6% na concentração de 0,50 mg/mL de antibiótico foram obtidos, uma diminuição de 2,4 vezes. Para os grupos com concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL de G418, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 8).

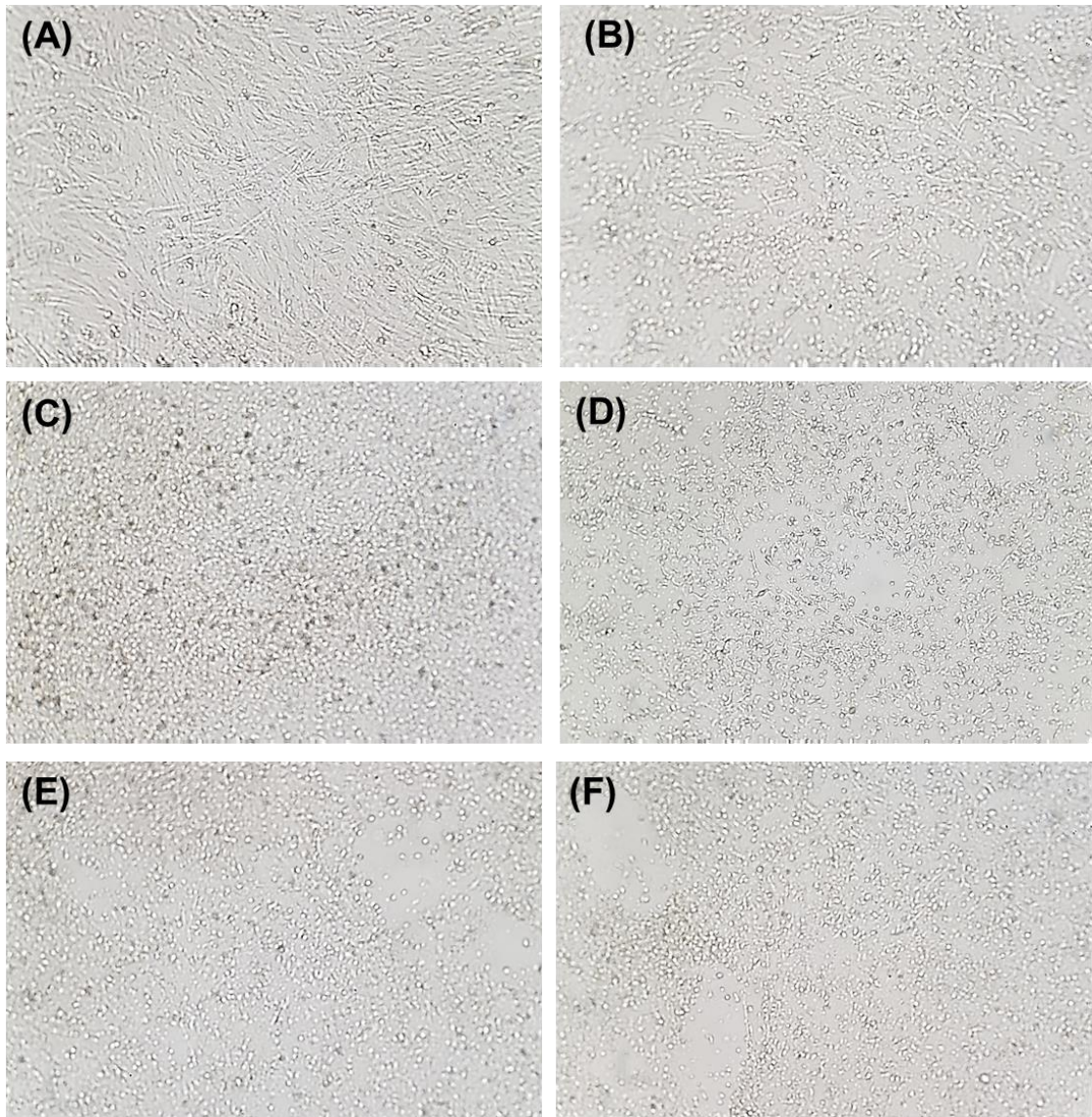


Figura 7. Células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) observadas por microscópio invertido (100X) com diferentes concentrações do antibiótico G418. **(A)** MOCK. **(B)** FEG com 0,25 mg/mL de G418. **(C)** FEG com 0,5 mg/mL de G418. **(D)** FEG com 1,0 mg/mL de G418. **(E)** FEG com 1,5 mg/mL de G418. **(F)** FEG com 2,0 mg/mL de G418.

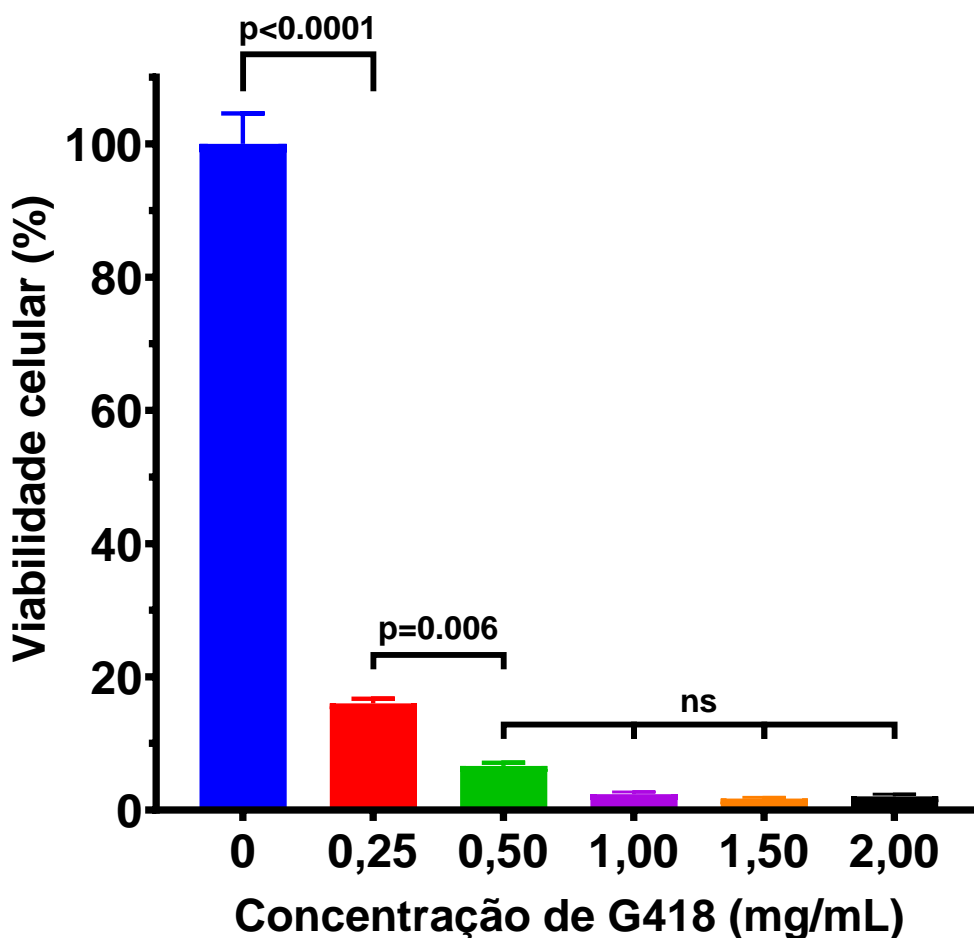


Figura 8. Gráfico de sensibilidade das células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) ao antibiótico Geneticin (G418) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL com tempo de incubação de 2 dias. Cada ponto representa a média de três repetições. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT.

4.7. Inibição da replicação viral pelo antibiótico Geneticin (G418)

Com o intuito de avaliar a influência do antibiótico G148 na replicação viral, foi realizado o ensaio de sensibilidade em células FEG infectadas com HVT FC-126. O ensaio foi realizado em microplacas de 6 poços com $2,5 \times 10^6$ células em cada poço até a formação de monocamada com confluência acima de 90%. Em cada poço foi aplicado um título de $1,25 \times 10^4$ PFU de HVT FC-126 (na razão de 1:200 célula/PFU) com um tempo de absorção de 1 hora para melhor infecção com um período de incubação de 48 horas. O ensaio de viabilidade celular por MTT foi aplicado para o cálculo dos resultados, além disso de cada grupo foi coletado um volume de suspensão celular para determinação do título viral após exposição das células infectadas ao antibiótico G418. Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos com concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL de G418, similar

aquela observada no experimento anterior (células não infectadas com antibiótico G418), conforme já mencionado. Resultados diferentes daqueles observados no experimento anterior foram obtidos quando os grupos de 0,5 e 1,0 mg/mL de G418 foram comparados, onde houve uma diferença significativa ($p=0,0072$) na porcentagem da viabilidade celular. Contrariamente, ao comparar os grupos expostos a 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL de antibiótico não foi observada diferença significativa entre eles (Figura 9A).

A titulação viral das células infectadas com HVT FC-126 foi realizada para cada grupo. O grupo controle (sem infecção) apresentou um título de $1,73 \times 10^5$ PFU/mL com 24 horas de incubação. Uma diminuição acima de 99% dos títulos virais foi observada com aumentos progressivos das concentrações do antibiótico G418. Para os grupos com concentrações de 1,5 e 2,0 mg/mL de G418 não foi possível a detecção de *plaques*. Os resultados mostraram que para as células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) expostas a altas concentrações de G418 (1,5 e 2,0 mg/mL) por um período de 48 horas a divisão celular é inibida em função da alta sensibilidade. Um impacto maior foi observado sobre a inibição da replicação viral, mesmo a baixas concentrações de G418. Nas células cultivadas em condições de altas concentrações do antibiótico G418, a replicação viral foi completamente abolida (Figura 9B).

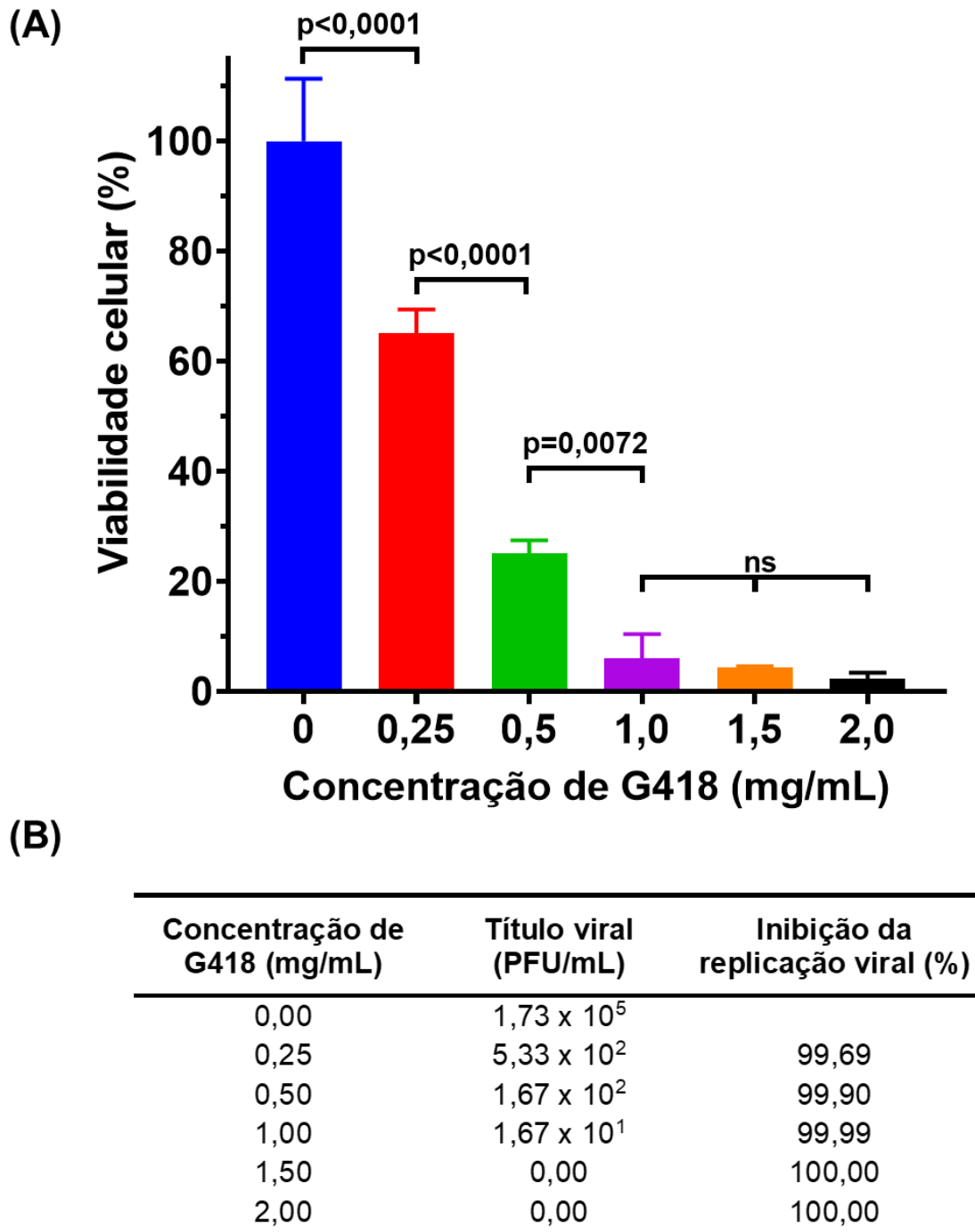


Figura 9. Inibição da replicação viral pelo antibiótico Geneticin (G418) em células FEG infectadas por HVT FC-126. **(A)** Porcentagem de viabilidade celular determinada pelo método MTT a diferentes concentrações do antibiótico G418 (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL). **(B)** Valores de titulação viral das células infectadas com HVT FC-126 e porcentagem da inibição da replicação viral.

4.8. Otimização da transfecção em FEG

Quantidades adequadas de Lipofectamina e do vetor são necessárias para realizar uma transfecção eficiente em células eucarióticas. Portanto, foram avaliadas diversas proporções Lipofectamina/vetor ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$) para determinação da melhor proporção para transfecção mais eficiente do vetor em células FEG. Os vetores foram desenhados contendo o gene NeoR/KanR (marcador de seleção) que confere resistência ao antibiótico G418. Desse modo, células FEG contendo o vetor possuem resistência ao antibiótico e por conseguinte a viabilidade das células transfectadas não é alterada na presença do G418. Os resultados foram obtidos por meio da seleção das células na presença de G418 a 1,5 mg/mL e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT.

Em placas de 24 poços foram realizados os experimentos de transfecção com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 (Figura 10 e 11). Outro parâmetro que foi considerado no experimento foi a confluência da monocamada. Microplacas com monocamadas de FEG com 80% e 100% de confluência foram testadas no experimento. Os resultados de viabilidade celular em microplacas com 100% de confluência celular foram variáveis e portanto foram observadas diferenças de viabilidade entre os vetores.

Para as células transfectadas com 0,1 μg do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 e 1 μL de Lipofectamina foi obtido um valor de 3,8% de viabilidade celular, e para as células transfectadas com 0,1 μg do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 e 2,5 μL de Lipofectamina foi possível obter-se um valor de viabilidade celular de 1,4%. Contrariamente, nas microplacas de monocamada de células FEG com confluência de 80% foram observados resultados similares de viabilidade entre os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8.

Pode-se observar que os resultados com os maiores valores de viabilidade celular foram obtidos quando foram utilizadas quantidades dos vetores entre 0,1 a 0,2 μg complexados com volumes de Lipofectamina entre 1,0 a 1,5 mL por poço. Os resultados revelaram que usando 0,1 μg do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 complexado a 1 μL de Lipofectamina é possível alcançar uma viabilidade celular de 6,9%. Assim também, usando 0,2 μg do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 complexado com 1 μL de Lipofectamina foi obtida uma viabilidade celular de 7,3%. Sendo assim, valores

maiores foram apresentados quando a confluência celular da monocamada foi de 80%.

Os resultados de transfecção dos vetores com Lipofectamina permitiram realizar um escalonamento do processo a diferentes áreas de superfície (tamanho de placa). Conhecendo que são necessárias quantidades determinadas do vetor assim como volumes de Lipofectamina para maior eficiência de transfecção, foi construída uma tabela com as proporções para as placas de 24, 12, 6 poços e para placas de 60 mm e 100 mm (Tabela 1 e 2). Para realizar a transfecção em microplacas de 6 poços com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8 foi necessário 0,5 µg do vetor complexado com 5 µL de Lipofectamina com um inóculo de densidade celular de 1×10^6 por poço. Para realizar a transfecção com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 foi necessário 1 µg do vetor complexado com 5 µL de Lipofectamina com um inóculo de densidade celular de 1×10^6 por poço.

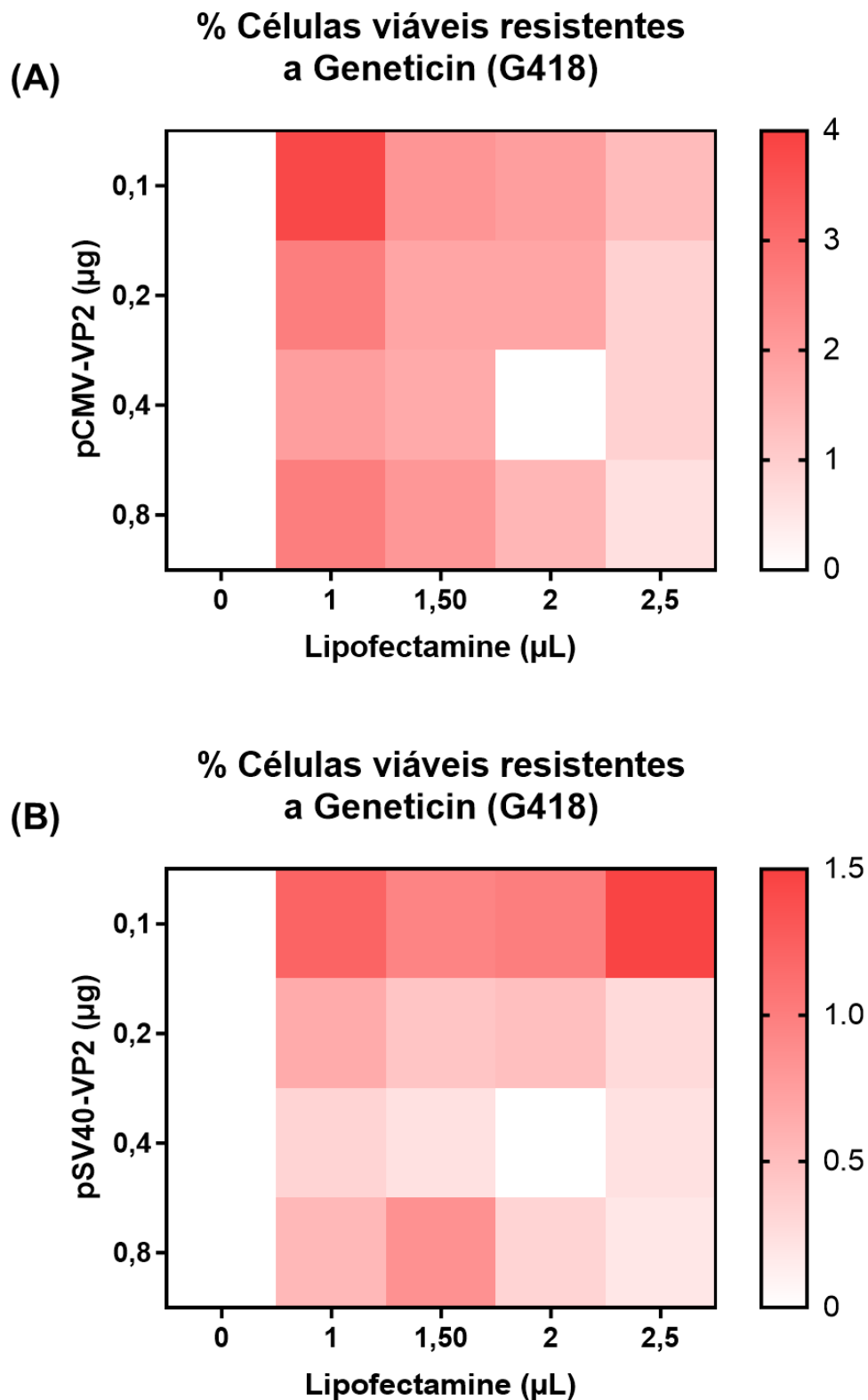


Figura 10. Transfecção de células FEG semeadas a $2,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas com Lipofectamina complexada com vetor. **(A)** Resultados da transfecção com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8. **(B)** Resultados da transfecção com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8. As células foram expostas a 1,5 mg/mL de antibiótico G418 durante 2 dias após transfecção, e foram então lavadas uma vez com PBS e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT.

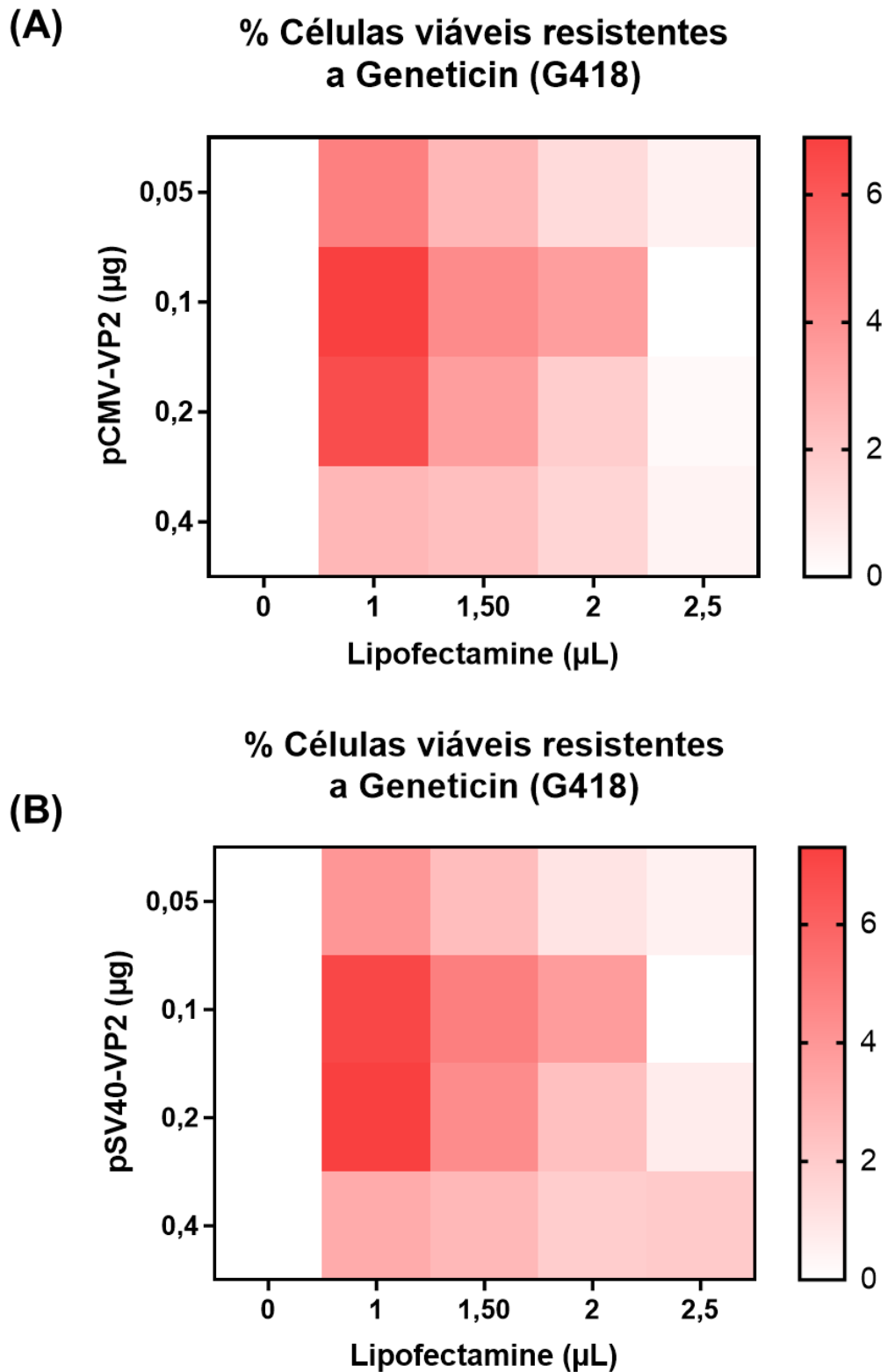


Figura 11. Transfecção de células FEG semeadas a $2,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas com Lipofectamina complexada com vetor. **(A)** Resultados da transfecção com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8. **(B)** Resultados da transfecção com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8. As células foram expostas a 1,5 mg/mL de antibiótico G418 durante 2 dias após transfecção, e foram então lavadas uma vez com PBS e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT.

Tabela 1. Quantidades de células, DNA e Lipofectamina para transfecção do vetor pCMV US2-VP2-GBV8 em células FEG.

pCMV US2-VP2-GBV8				
Placa	Area de superfície relacionado à placa de 24 poços	Células/poço ($\times 10^5$)	DNA/poço (ug)	Lipofectamine (uL)
24 poços	1	2	0,1	1
12 poços	2	4	0,2	2
6 poços	5	10	0,5	5
60 mm	10	20	1	10
100 mm	28	56	2,8	28

Tabela 2. Quantidades de células, DNA e Lipofectamina para transfecção do vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 em células FEG.

pSV40 US2-VP2-GBV8				
Placa	Area de superfície relacionado à placa de 24 poços	Células/poço ($\times 10^5$)	DNA/poço (ug)	Lipofectamine (uL)
24 poços	1	2	0,2	1
12 poços	2	4	0,4	2
6 poços	5	10	1	5
60 mm	10	20	2	10
100 mm	28	56	5,6	28

Os recombinantes rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2 foram produzidos em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) transfectadas com 0,5 μ g de pCMV US2-VP2-GBV8 e 1 μ g de pSV40 US2-VP2-GBV8 complexado com 5 μ L de Lipofectamina 2000. As células infectadas com vírus recombinantes foram selecionadas com o antibiótico G418 (Figura 12). Nos poços com células FEG não transfectadas em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418, não foram observadas células aderidas na superfície (Figura 12B). Embora, nos poços com células transfectadas com os vetores em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 foram observadas células aderidas na superfície (células viáveis). Estas células foram resistentes ao antibiótico G418 (Figura 12C e 12D). Células transfectadas (células viáveis) com os vetores pCMV-VP2-GBV8 e pSV40-VP2-GB8 foram infectadas com HVT FC-126 (Figura 12E e 12F) e selecionadas em presença de meio MEM suplementado com o antibiótico G418 (1,5 mg/mL).

Após finalização do tempo de infecção, as células foram tripsinizadas, resuspendidas e transferidas em poços com células FEG em monocamada. O processo de seleção dos vírus recombinantes foi repetido 3 vezes em meio MEM suplementado com 5% de SFB e com o antibiótico G418 (1,5 mg/mL). Este processo permitiu selecionar as células infectadas com os vírus recombinantes devido a que as células adquiriram a resistência devido a expressão do gene NeoR/KanR localizado no genoma dos vírus recombinantes (rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2).

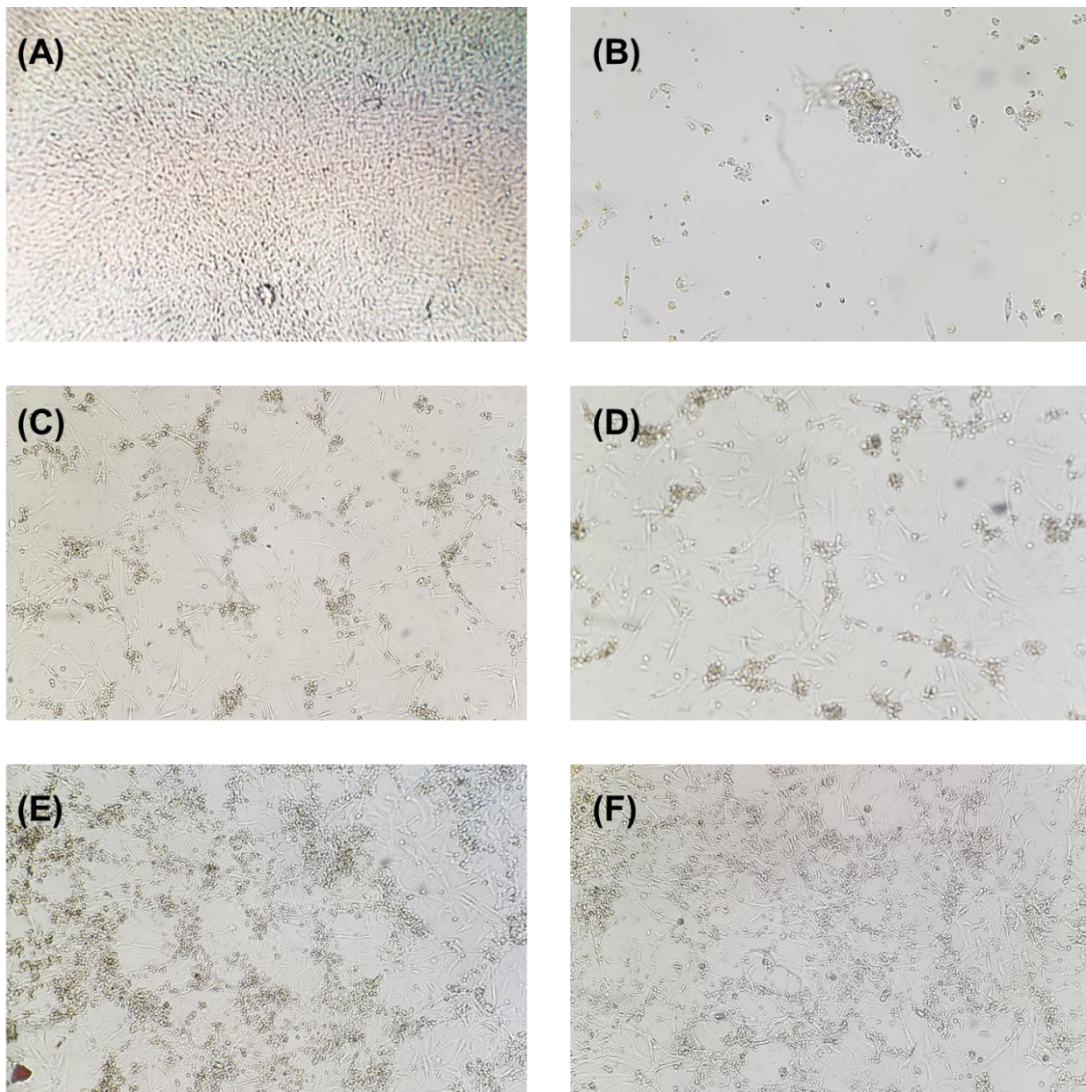


Figura 12. Células transfectadas com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 e infectadas com HVT FC-126. **(A)** FEG MOCK (100x). **(B)** FEG em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 (100x). **(C)** FEG transfectadas com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8 em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 (100x). **(D)** FEG transfectadas com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 (100x). **(E)** FEG transfectadas com o vetor pCMV US2-VP2-GBV8 e infectadas com HVT FC-126 em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 (100x). **(F)** FEG transfectadas com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8 e infectadas com HVT FC-126 em meio MEM suplementado com 1,5 mg/mL do antibiótico G418 (100x).

Logo do processo de seleção, as células infectadas com os vírus recombinantes foram coletadas para realizar a infecção em células FEG em meio MEM suplementado com 5% de SFB sem adição do antibiótico G418. As microplacas foram incubadas durante 7 dias até formação de Unidades Formadoras de *Plaque* (PFU) (Figura 13).

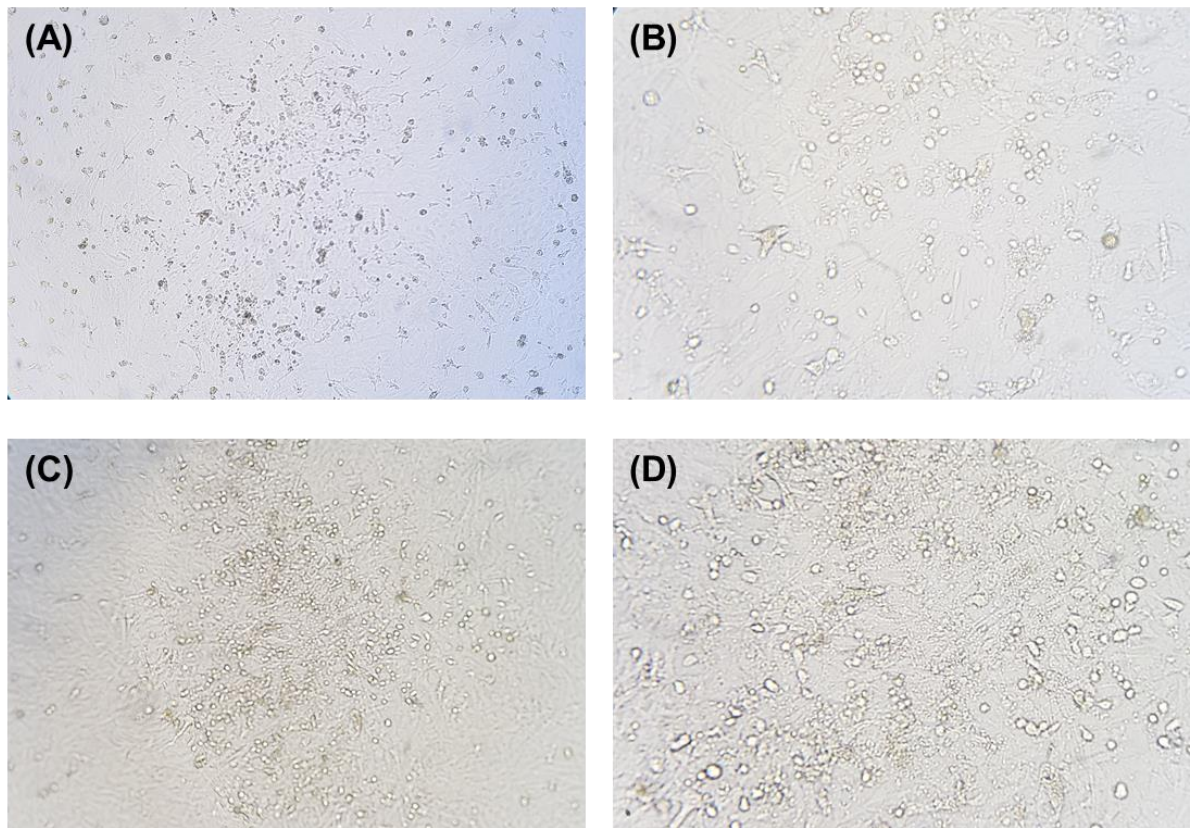


Figura 13. Isolamento dos vírus recombinantes rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2 em células FEG em meio MEM suplementado com 5% de SFB sem adição do antibiótico G418. **(A)** Unidade formadora de *plaque* (PFU) do vírus rHVT-CMV-VP2 em células FEG (100x). **(B)** Células FEG infectadas com o vírus rHVT-CMV-VP2 (400x). **(C)** Unidade formadora de *plaque* (PFU) do vírus rHVT-SV40-VP2 em células FEG (100x). **(D)** Células FEG infectadas com o vírus rHVT-SV40-VP2 (400x).

5. DISCUSSÃO

O vírus de Marek (HVT FC-126) possui um genoma de tamanho considerável de 159 160 pb que pode ser dividido em duas partes, uma região única longa (UL) e uma região única curta (US) e cada sequência é flanqueada por sequências repetidas (TRL). Foram identificadas 397 ORFs das quais 99 são funcionais. Na região curta (US) de comprimento de 8,617 pb foram identificadas 7 sequências que codificam proteínas homologas US1, US2, US3, US6, US7, US8 e US10 ao vírus herpes simples (HSV-1)(AFONSO et al., 2001). A região US2 (ORF HVT088) codifica uma proteína com massa molecular de 32,4 kDa que contém uma região N-terminal hidrofóbica e pode estar relacionada à membrana (PARCELLS, et al., 1994). Foi demonstrado que esta proteína não é essencial a replicação viral em cultura de células, e portanto pode ser substituída para expressão de genes endógenos (CANTELLO et al., 1991; LIU et al., 2006; TSUKAMOTO et al., 1999). Por esta razão, a identificação de uma região adequada para direcionar a inserção de um gene endógeno por recombinação homóloga é de vital importância para o sucesso da construção de um micro-organismo recombinante, e em função disso, a região US2 do genoma do HVT FC-126 foi escolhida como a melhor região para a construção dos vetores.

Na construção dos plasmídeos, duas sequências homólogas (*upstream* e *downstream*) ao genoma do HVT FC-126 (Nº GenBank AF291866.1) de comprimento de 1 kpb foram inseridas para flanquear o gene da proteína VP2 madura e o marcador de seleção. A sequência de *upstream* compreende os nucleotídeos entre 140913 – 141912 cobrindo parte da ORF US3 (serina/treonina quinase), e a sequência *downstream*, posicionada entre os nucleotídeos 139065 -140064 cobre parte da sequência da ORF SORF3.

O sequenciamento do segmento A do genoma do IBDV GBV-8 revelou um comprimento de 3154 pb e 3036 pb para a poliproteína (preVP2-VP4-VP3). A proteína precursora do VP2 (preVP2) foi identificada com 1536 pb, onde é clivada pela protease VP4 entre os aminoácidos alanina e fenilalanina na posição 441-442 da poliproteína. A clivagem gera a proteína VP2 madura com 441 aminoácidos. Na sequência de nucleotídeos foi inserido o códon de parada TAA para construção da ORF de expressão da proteína VP2 madura (DARTEIL et al., 1995).

Neste trabalho foram construídos dois plasmídeos contendo o gene de expressão da proteína VP2 sob o controle de diferentes promotores. Os promotores virais mais usados são derivados do vírus símio 40 (SV40), citomegalovírus (CMV), vírus do sarcoma de Rous (RSV), e tumor viral mamário de camundongo (MMTV) (GONG FENG, 2003). O promotor é responsável diretamente pela expressão de proteínas devido às sequências de nucleotídeos que controlam a ligação da RNA polimerase que dá início à transcrição do gene de interesse (FEKLISTOV, 2013). Os vetores de expressão com promotores de mamíferos em cultura de células estão localizados tipicamente no sítio de *upstream* (início-5') do gene transcrito, e assim desempenham um papel importante na produção de altos níveis de proteínas. Adicionalmente, foi demonstrado que a atividade dos promotores tem sido um dos principais fatores que afetam a expressão de proteínas e a eficácia protetora das vacinas recombinantes (LI et al., 2016; TSUKAMOTO et al., 2002). Os promotores CMV e SV40 foram selecionados pois são utilizados em células eucarióticas para expressão constitutiva de proteínas. O promotor CMV foi ligado a um elemento potenciador CMV de iniciação da transcrição, sendo a função principal a de ativação da expressão da transcrição dos genes (PANIGRAHI; O'MALLEY, 2021). A adição de um potenciador demonstrou ser capaz de induzir a produção de níveis muito maiores de transcrição do que os encontrados em promotores sem potenciador (SADOWSKI et al., 1988).

Uma sequência de cauda poli-A do SV40 foi adicionada ao sítio de *downstream* (final-3') da região codificante do gene da proteína VP2 madura e do gene marcador de seleção NeoR/KanR. A cauda poli-A é um elemento no desenho de genes que permite a poliadenilação do preRNA mensageiro (pré-RNA_m) bem como a terminação da transcrição nas regiões de *downstream* para regiões codificantes (PROUDFOOT, 2011). As funções da cauda poli-A não estão bem definidas, mas acredita-se que ela ajudaria na estabilidade do mRNA aumentando sua vida média e estimulando sua translação para o citoplasma. (GRAY; WICKENS, 1998). O poli-A SV40 é um dos terminadores mais utilizados para expressão de genes em células eucarióticas e um dos mais eficientes na terminação da transcrição uma vez que possui sequências adicionais auxiliares (SCHEK et al., 1992).

O gene de resistência NeoR/KanR foi escolhido como marcador de seleção de células de fibroblasto de embrião de galinha transfectadas com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pCMV US2-VP2-GBV8. O marcador gera resistência aos antibióticos

kanamicina e neomicina, além de resistência ao antibiótico Geneticin (G418) mediante a codificação de um aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH 3 'II) que inativa a atividade do antibiótico por fosforilação (KUCHERLAPATI et al., 1984). O antibiótico G418 é um potente inibidor do crescimento celular uma vez que afeta a síntese de proteínas na fase de alongação de polipeptídios ligando-se aos ribossomos, particularmente ribossomos 80S eucarióticos (EUSTICE; WILHELM, 1984).

Os plasmídeos pCMV US2-VP2-GBV8 e pCMV US2-VP2-GBV8 desenhados possuem sequências de origem de replicação (Ori/Replicon) para produzir clones em sistemas procarióticos. Outro diferencial na construção dos plasmídeos consiste nas sequências de origem de replicação SV40 (SV40 Ori) para clonagem em células eucarióticas que foram desenhadas dentro dos promotores SV40 (BOROWIEC et al., 1990). Esta abordagem é utilizada para aumentar o número de réplicas dos fragmentos de DNA dos plasmídeos de para obtenção do aumento da expressão das proteínas de interesse (ASCENZIONI et al., 1996).

Os plasmídeos sintéticos desenhados foram fornecidos em pequenas quantidades, e portanto é de vital importância a realização de processos de amplificação, extração e purificação das amostras com alta qualidade e com alto rendimento. Estes processos devem ser realizados por metodologias que permitam a manutenção das características iniciais. Considerações devem ser tomadas em relação ao tamanho do plasmídeo, o tipo ou o número de cópias, bem como as condições de crescimento da cepa bacteriana uma vez que todos esses fatores influenciam no rendimento dos plasmídeos. Entretanto, kits de isolamento de plasmídeos com colunas de sílica reduzem o tempo e o esforço para purificações de plasmídeos com altos rendimentos embora o processo necessite de tempo e trabalho significativos (PRONOBIS; DEUITCH; PEIFER, 2016).

Para clonagem dos plasmídeos foi utilizada a bactéria *E.coli* da linhagem DH5 α quimicamente competente. Estas células são utilizadas para clonagem e subclonagem de DNA e cDNA e isolamento de plasmídeos (CHAN et al., 2013) podendo-se obter uma eficiência de transformação de até $> 1 \times 10^9$ CFU/ μ g quando a transformação é realizada com o plasmídeo pUC19.

As células quimio-competentes (método por choque térmico) DH5 α foram transformadas com os vetores sintéticos pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-

GBV8 e apresentaram valores de eficiência de transformação inferiores ao máximo possível quando foi utilizado o vetor pUC19, possivelmente devido aos tamanhos maiores dos plasmídeos sintéticos (>5k pares de base a mais). Em geral, os resultados de eficiência de transformação dependem da quantidade de plasmídeo usado. Testes complementares foram realizados com o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8. Diferentes quantidades do vetor (5 pg, 100 pg, 1000 pg, 10 ng e 100 ng) foram usados na transformação das células quimio-competentes para determinação das quantidades mínimas necessárias para se obter eficiências de transformação adequadas (ANEXO 1).

Após o processo de clonagem, extração e purificação, foi realizada a digestão, eletroforese em gel de agarose, e por último o sequenciamento dos vetores. As características dos plasmídeos foram as esperadas, isto é, as mesmas características iniciais. Os tamanhos das bandas no gel de agarose foram semelhantes quando comparados com aqueles observados no gel de simulação. O sequenciamento dos plasmídeos foi realizado para confirmação de que não houve alguma deleção ou mutação de nucleotídeos (ANEXO 2 e 3). Os resultados confirmaram que não aconteceu qualquer alteração dos códons e portanto foram mantidas as fases de leituras (ORF) das proteínas.

Realizar um bom desenho de vetores é um fator de crucial para o sucesso na recombinação homóloga. Por outro lado, conhecer as características de replicação do vetor viral em cultura de células vai permitir o correto isolamento do vírus recombinante a partir do vírus parental em um meio cultura na presença de um agente de seleção adequado. O vírus da doença de Marek (MDV) podem ser propagados *in vitro* em cultura de células primárias de fibroblasto de embrião de galinha, rins de embrião de galinha, rins de galinha e fibroblastos de embriões de pato (JAIKUMAR; READ; TANNOCK, 2001). As células infectadas com o vírus não apresentaram lise celular. A formação de *plaques* nas monocamadas das células de embrião de galinha mostraram policariócitos nos estágios iniciais da infecção quando observados ao microscópio (WITTER; SOLOMON; BURGOYNE, 1969). As *plaques* aumentaram de tamanho com o decorrer do tempo de incubação, devido a liberação dos policariócitos no meio de cultura, além disso pode-se observar áreas claras centrais no foco de infecção (ausência de células) (JAIKUMAR; READ; TANNOCK, 2001). O HVT FC-126 possui uma natureza altamente associada às células, portanto é essencial que as

suspensões de células contenham células viáveis (OIE, 2019), do contrário o vírus perde a capacidade de infecção de outras células.

Pelas características de crescimento celular do vírus vetorial, a metodologia de titulação por unidades formadoras de *plaque* (PFU) foi realizada com sucesso e não houve a necessidade de adição de algum polímero no meio de cultura para gerar um sistema sólido ou semissólido para titulação (XU; ZHANG; WILLIAMS, 2018). Aliás, o ensaio de titulação por *plaques* de muitos vírus é executado com técnicas de imobilização com polímeros para restringir a propagação viral evitando o surgimento de *plaques* secundárias e a obtenção de resultados errados (BAER; KEHN-HALL, 2014).

Por outro lado, a capacidade de infecção de vírus associados a células depende da viabilidade da célula infectada, motivo pelo qual adotar metodologias que ajudem a selecionar células transfectadas (células com plasmídeos ou células infectadas com vírus recombinantes) das células parentais sensíveis a substâncias que alterem o metabolismo celular, consiste em uma abordagem eficaz para construção de vacinas de vírus recombinantes (MARS; VASSEF; BEAUD, 1986). Os ensaios de sensibilidade das células de embrião de galinha transfectadas com plasmídeos com fator de resistência ao antibiótico Geneticin (G418) mostraram com 48 horas uma alta capacidade de seleção. Além disso, quando as células não transfectadas e infectadas com o vírus foram tratadas com G418, os resultados evidenciaram que a replicação viral foi diretamente afetada. Esses resultados eram esperados uma vez que o antibiótico G418 inibe a síntese de proteínas celulares, e dessa forma ocorre também o bloqueio da síntese dos componentes proteicos virais e por conseguinte a completa inibição da replicação viral (FRANKE et al., 1985).

Células podem ser transfectadas por mecanismos físicos, químicos ou biológicos (agentes virais). O processo de transfecção em células eucarióticas é predominantemente do tipo físico ou químico. Entre os mecanismos de transfecção química temos lipossomos catiônicos, polímeros ou combinações, fosfato de cálcio ou dextran (*Di-ethyl-amino-ethyl Dextran*- DEAE) (SHABANI et al., 2010). Lipofectamina 2000 consiste em uma formulação de lipossomos catiônicos compostos por uma mistura 3:1 de DOSPA (2,3-dioleoiloxi-N-[2 (esperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-trifluoroacetato de propanimínio) e DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina) (YANG; HUANG, 1998). A formação de complexo DNA-Lipofectamina acontece pela interação eletroestática envolvendo as cargas negativas do DNA e as cargas positivas dos lipossomos. Assim, o complexo DNA-lipossomos carregado positivamente interage com a membrana de células vivas carregadas negativamente, permitindo a endocitose do complexo (DALBY et al., 2004).

Considerações para uma transfecção ótima em células eucarióticas são requeridas usando Lipofectamina 2000. A densidade celular é um dos fatores que influenciam na eficiência de transfecção. No presente trabalho foram realizados experimentos com confluências de 80% e 100% aproximadamente. Foi evidenciado que as microplacas com 80% de confluência apresentaram melhores valores de porcentagem de viabilidade celular, já que a eficiência de transfecção foi maior, e portanto houve uma maior expressão do gene de resistência NeoR/KanR ao antibiótico G418, quando comparado aos resultados das placas com 100% de confluência celular. Os resultados evidenciam que para transfecções em células com alta confluência há uma diminuição da eficiência de transfecção, o que pode estar relacionado a uma maior resistência à absorção (endocitoses) do complexo DNA-lipossomo devido a diminuição do contato com as células em função da alta densidade celular e por conseguinte uma baixa absorção do complexo (DALBY et al., 2004). Além disso, cultura de células com alta confluência entram em um estado de quiescência, apresentando uma diminuição da absorção do complexo DNA-Lipofectamina em comparação as células no estado de divisão ativa (FELGNER et al., 1995).

Outro fator importante para uma boa eficiência de transfecção é a razão de DNA:Lipofectamina 200. Os resultados mostraram que mantendo-se fixa a quantidade de plasmídeo e aumentando-se progressivamente a quantidade de Lipofectamina, ocorre uma diminuição progressiva da viabilidade celular, o que pode estar correlacionado a toxicidade da Lipofectamina em altas concentrações (FELGNER et al., 1987). Baixas quantidades de plasmídeo e de Lipofectamina foram necessárias para que fossem alcançadas eficiências máximas de transfecção.

As quantidades de Lipofectamina (μL) e dos plasmídeos (μg) necessárias para transfecção/recombinação foram otimizadas para obtenção da maior quantidade possível de células viáveis e conseqüentemente maior probabilidade de recombinação homóloga do vírus. A metodologia de seleção de células transfectadas e de células infectadas com os vírus recombinantes (rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2) foi bem

sucedida, uma vez a que a atividade do vírus depende da viabilidade da célula infectada, isto é, o vírus perde a capacidade de infecção. Outro fator responsável pelo sucesso no isolamento dos vírus recombinantes se deve à característica do antibiótico G418 de inibir a síntese de proteínas celulares e conseqüentemente a inibição da sínteses de proteínas estruturais virais (FRANKE et al., 1985). Os resultados mostraram que a resistência das células FEG ao antibiótico G418 foi produzida tanto pela transfecção com os vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8, como pela infecção com os vírus recombinantes rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2.

6. CONCLUSÕES

Os vetores plasmidiais pCMV US2-VP2-GBV8 (8,2 kb) e pSV40 US2-VP2-GBV8 (7,9 kb) foram desenhados e sintetizados com dois tipos de promotores (CMV e SV40) para expressão do gene de expressão da proteína VP2 madura do IBDV cepa GBV-8. Os plasmídeos contêm os flaqueadores para direcionamento da recombinação homóloga na região US2 (HVT088) do genoma do HVT F-126 e um marcador de seleção (gene de resistência NeoR/KanR).

Clones dos vetores pCMV US2-VP2-GBV8 e pSV40 US2-VP2-GBV8 foram obtidos em sistema de células transformadas quimio-competentes DH5 α com adição 1ng de cada vetor. Eficiências de transformação de $\sim 4,5 \times 10^6$ CFU/ μ L e $\sim 1,7 \times 10^7$ CFU/ μ L respectivamente foram obtidas.

O antibiótico Genitacin (G418) na concentração de 1,5 mg/mL produziu inibição completa do crescimento das células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG). Além disso, o antibiótico G418 inibiu a replicação viral do HVT FC-126 em concentrações superiores a 0,25 mg/mL.

Microplacas de 6 poços semeadas com 1×10^6 células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) transfectadas com 0,5 μ g pCMV US2-VP2-GBV8 e 1 μ g pSV40 US2-VP2-GBV8 complexadas com 5 μ L de Lipofectamina 2000 geraram resistência ao antibiótico Genitacin (G418).

Os vírus recombinantes rHVT-CMV-VP2 e rHVT-SV40-VP2 foram isolados do vírus parental com seleções sucessivas com o antibiótico G418 na concentração de 1,5 mg/mL em células FEG. A metodologia foi adequada já que as células infetadas com os vírus recombinantes mostraram resistência ao antibiótico G418 facilitando o processo de seleção.

Como perspectivas futuras, experimentos adicionais são requeridos para confirmar a inserção da sequência de nucleotídeos da proteína VP2 no genoma do HVT FC-126 e assim como também a expressão da proteína VP2 em cultura de células. Os vírus recombinantes serão replicados em células FEG e será realizado a extração e purificação do genoma viral. As amostras serão avaliadas por PCR para confirmação da inserção do gene VP2. Primers serão elaborados para amplificação de segmentos específicos do genoma dos vírus. A sequência da proteína VP2 e a

sequência da região US2 (controle) serão amplificadas e posteriormente, os fragmentos obtidos serão sequenciados para determinar a correta orientação do gene.

Métodos para confirmação da expressão da proteína VP2 são requeridas. Análise de Western blot e imunofluorescência indireta podem avaliar a expressão da proteína VP2 de forma específica, já que os métodos são realizados usando um anticorpo primário específico que se ligue a sequências específicas da proteína. Para obter o anticorpo primário, foi realizado um contrato com a empresa Rheabiotech para sua síntese. A sequência de aminoácidos da proteína VP2 foi analisada para determinar e sintetizar peptídeos que apresentem alta antigenicidade e baixa hidrofobicidade para o desenvolvimento de anticorpo policlonal anti-peptídeo sintético feito em coelho.

Testes *in vitro* serão realizados futuramente para determinar a eficácia dos vírus recombinantes como vacina contra as doenças de Gumboro e Marek. Pintos SPF serão vacinados com a vacina recombinante via subcutânea e em ovos embrionados com 18 a 19 dias de incubação. Nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, os pintos de cada grupo serão sangrados, sacrificados, pesados, necropsiados e bursas removidas e pesadas para determinar as relações de peso da bursa/corpo para o cálculo do índice de bursa/peso corporal. Os soros obtidos serão analisados por ELISA para identificação de anticorpos anti-VP2. Análise histopatológica das Bursas para determinar lesões do tipo hemorrágica ou edematosa. O desafio será realizado no dia 28 após vacinação. E para determinar a eficácia contra a doença de Marek, pintos SPF com 1 dia de idade serão vacinados com os vírus recombinantes via subcutânea. No dia 7 após vacinação, os pintos serão desafiados via intraperitoneal com 50 µL de sangue coletado de galinhas infectadas com vírus MDV RB1B (cepa virulenta). Os pintos serão monitorados diariamente. 10 semanas após o desafio, os pintos sobreviventes serão eutanasiados e necropsiados.

7. REFERÊNCIAS

- AFONSO, C. L. et al. The Genome of Turkey Herpesvirus. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 75, n. 2, p. 971–978, 2001.
- ASCENZIONI, F. et al. Replication of circular and linear SV40-based plasmids in monkey cells. **Research in Virology**, v. 147, n. 5, p. 277–287, 1 set. 1996.
- AYAZ, M.; SHARMA, J. M.; KENZY, S. G. Comparison of cytopathic effects of a classical isolate of Marek's disease virus in cell cultures of duck embryo fibroblasts and chicken kidney. **Avian diseases**, v. 16, n. 2, p. 291–307, 1972.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, p. 52065, 4 nov. 2014.
- BOROWIEC, J. A. et al. **Binding and unwinding-How T antigen engages the SV40 origin of DNA replication**Cell, 26 jan. 1990.
- CANTELLO, J. L. et al. **Isolation of a Marek's Disease Virus (MDV) Recombinant Containing the lacZ Gene of Escherichia coli Stably Inserted within the MDV US2 Genet**JOURNAL OF VIROLOGY. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/>>. Acesso em: 5 dez. 2018.
- CHAN, W. T. et al. A comparison and optimization of methods and factors affecting the Transformation of Escherichia coli. **Biosci. Rep**, v. 33, n. 6, p. 86, 2013.
- CHOWNK, M. et al. Applications and future perspectives of synthetic biology systems. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 393–412.
- DALBY, B. et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. **Methods**, v. 33, n. 2, p. 95–103, 1 jun. 2004.
- DARTEIL, R. et al. **Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 Immunogen Induce Protection against an IBDV Virulent Challenge in Chickens**Virology, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285714304>>
- EUSTICE, D. C.; WILHELM, J. M. **Mechanisms of Action of Aminoglycoside Antibiotics in Eucaryotic Protein Synthesis**ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. [s.l: s.n.].
- FEKLISTOV, A. RNA polymerase: In search of promoters. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1293, n. 1, p. 25–32, 2013.
- FELGNER, P. L. et al. **Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure (liposomes/cationic lipid vesicles/gene transfer)**Proc. Nati. Acad. Sci. USA. [s.l: s.n.].
- FELGNER, P. L. et al. Improved Cationic Lipid Formulations for In Vivo Gene Therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 772, n. 1, p. 126–139, 1995.
- FRANKE, C. A. et al. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for

selection and isolation of vaccinia virus recombinants. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 8, p. 1918–1924, ago. 1985.

GONG FENG, P. H. & P.-L. C. Differential expression of mammalian or viral promoter-driven gene in adherent versus suspension cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, n. 39, p. 420–423, 2003.

GRAY, N. K.; WICKENS, M. **Control of translation initiation in animals** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* Annu Rev Cell Dev Biol, , 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9891789/>>. Acesso em: 2 jun. 2021

HUANG, Z. et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. **Poultry science**, v. 82, n. 6, p. 899–906, jun. 2003.

JAIKUMAR, D.; READ, K. M.; TANNOCK, G. A. Adaptation of Marek's disease virus to the Vero continuous cell line. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 75–82, 2 mar. 2001.

KUCHERLAPATI, R. S. et al. Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 10 I, p. 3153–3157, 1 maio 1984.

LI, K. et al. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 30, p. 120–7, mar. 2015.

LI, K. et al. Effects of different promoters on the protective efficacy of recombinant Marek's disease virus type 1 expressing the VP2 gene of infectious bursal disease virus. **Vaccine**, v. 34, n. 47, p. 5744–5750, 11 nov. 2016.

LIU, H. M. et al. Construction and Immunological Characterization of Recombinant Marek's Disease Virus Expressing IBDV VP2 Fusion Protein. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 391–396, maio 2006.

LU, Z. et al. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. **Virus research**, v. 203, p. 92–5, 4 maio 2015.

MARS, M.; VASSEF, A.; BEAUD, G. Sélection dominante de recombinants vaccine par co-transfection avec un gène de résistance à la néomycine. **Annales de l'Institut Pasteur Virology**, v. 137, p. 273–290, 1 jan. 1986.

MCPHERSON, M. C.; DELANY, M. E. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. **Poultry science**, n. Mdv, p. pev369, 2016.

NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 45, n. 12, p. 1102–11, dez. 2012.

OIE. Marek's disease. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019**. [s.l.: s.n.]. p. 952–963.

PANIGRAHI, A.; O'MALLEY, B. W. **Mechanisms of enhancer action: the known**

and the unknown Genome Biology BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13059-021-02322-1>>. Acesso em: 2 jun. 2021

PARCELLS, M. S. et al. **Characterization of Marek's Disease Virus Insertion and Deletion Mutants That Lack US1 (ICP22 Homolog), US10, and/or US2 and Neighboring Short-Component Open Reading Frame** *JOURNAL OF VIROLOGY*. [s.l.: s.n.].

PRONOBIS, M. I.; DEUTCH, N.; PEIFER, M. The Miraprep: A protocol that uses a Miniprep kit and provides Maxiprep yields. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. e0160509, 1 ago. 2016.

PROUDFOOT, N. J. **Ending the message: Poly(A) signals then and now** *Genes and Development* Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.17268411>>. Acesso em: 2 jun. 2021

RAI, K. M. et al. Genome engineering tools in plant synthetic biology. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 47–73.

RONG, S.; WHEELER, D.; WEBER, F. Efficient Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkey infection of the QM7 cell line that does not contain latent MDV genome. *Avian Pathology*, v. 43, n. 5, p. 414–419, 3 set. 2014.

SADOWSKI, I. et al. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, v. 335, n. 6190, p. 563–564, 1988.

SCHEK, N. et al. **Definition of the Upstream Efficiency Element of the Simian Virus 40 Late Polyadenylation Signal by Using In Vitro Analyses** *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC360476/pdf/molcellb00135-0116.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

SHABANI, M. et al. Optimization of gene transfection in murine myeloma cell lines using different transfection reagents. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 123–130, jul. 2010.

TSUKAMOTO, K. et al. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology*, v. 257, n. 2, p. 352–362, 1999.

TSUKAMOTO, K. et al. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *Journal of virology*, v. 76, n. 11, p. 5637–45, jun. 2002.

VAN KAMPEN, K. R. Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, v. 31, n. 3, p. 535–8, vii, maio 2001.

WITTER, R. L.; SOLOMON, J. J.; BURGOYNE, G. H. Cell culture techniques for primary isolation of Marek's disease-associated herpesvirus. *Avian diseases*, v. 13, n. 1, p. 101–118, 1969.

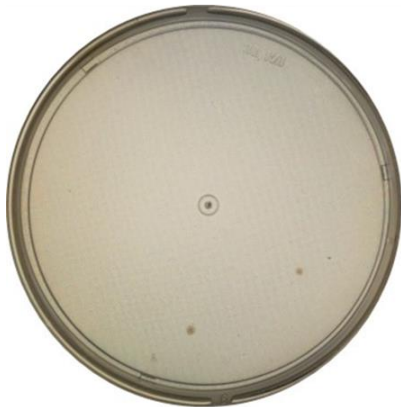
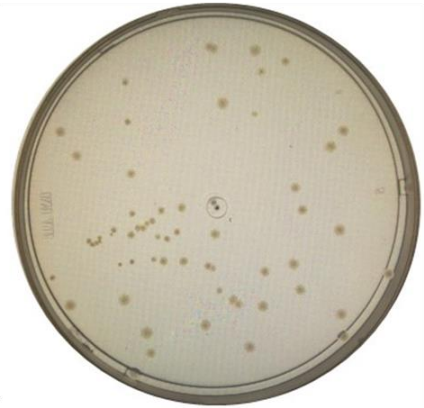
XIN, F. et al. Biosynthetic technology and bioprocess engineering. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 207–232.

XU, J.; ZHANG, Y.; WILLIAMS, J. V. Development and optimization of a direct plaque assay for trypsin-dependent human metapneumovirus strains. **Journal of Virological Methods**, v. 259, p. 1–9, 1 set. 2018.

YANG, J.-P.; HUANG, L. **Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistanceGene Therapy**. [s.l: s.n.].

APÊNDICE 1

Transformação de *E.coli* DH5 α quimio-competentes com diferentes concentrações o vetor pSV40 US2-VP2-GBV8

**5 pg****100 pg****1000 pg****10 ng****100 ng**

APÊNDICE 2

>pCMV US2-VP2-GBV8 (8214 bp)

SEQUÊNCIA FLANQUEADORA UP

POTENCIADOR CMV

PROMOTOR CMV

GENE DE RESISTÊNCIA NeoR/KanR

SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO POLI(A) SV 40

SEQUÊNCIA FLANQUEADORA DOWN

GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
 TCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
 GTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA
 GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
 AGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
 ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA
 CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGACAACATGGGG
 GATCATGTAACCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCA
 CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATACTGCGGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
 CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGT
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
 GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA
 AAATTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGC
 GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA
 CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGATGCCGTAGTTA
 GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC
 AGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGC
 TGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT
 GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGG
 AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCA
 CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG
 GCCTTTTTACGGTCTGCTGCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGG
 ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAG
 CTGGCACGACAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCAT
 TAGGCACCCAGGCTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA
 CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGT
 ACCTTTTTAATTGCCATCTCATATAGAACCAATCCGGCACTCAAATATCTGTTTTTGTGCAATACGGATCAAG
 TGCAGATAATCCGGCGAATTTGTTCCACAGTTCCGCTCCAACCGTAACATTGGGGCGTATCTATACAATCT

CCTAGTTGGCATGCAGCACCGAAGTCACCCAAAACCTGCATTTTCGTGATTATCCAAGAATATATTCTCCGTCT
 TTACGTCTCGGTGAATGATGCCCTTTTCATGTATGTATGCTAGCGCCTCTAGTAGTCCACGTTGAATATAGAT
 CATCTGTTGAAGGGGCATAGGGCCGACTCCGTCAATATATGTGAAAAGATCATAACGATATACACGCATTGC
 CATAACACAACATTTTTCCATTTATAGGCATGGATTAATTTTATAAATTGATTTATGTGAGATGGTTTTTAAAA
 TATCCACTTCCCTCCCGGATTCTTTCTCCAACGACTGCCTTCACTATGCATTTTTTTTTGGTCCGCGTCCCGT
 ATCTAGTACATATATACATGACCCTCTGAACCCGGAGCGAGAGATGAAAGAATACTGTATTGCATGCGCA
 CGGCAGACGTAGGACACGAACACTTTTGAAGTTCGCACGCCGCTCGTTGTTACGGCACGAAGATTCCATAC
 GATCAAGATTAGCAGATTTTCTGGTATTTATCTCCACATCGTATTAGGCCACGGAAGTCTTCGTTATCGAA
 GCTATTGTTACTAGTATCTGGCGACATCGACGTTCTGCAACCGTCGTACCGTTTTCGATATTTTACAGACA
 ATACCCATATTCGAGGCACTTACTTTTGAAGACTCAACATCTACTCCATCGCCGCCACGTATGTAATTTGGG
 ACGTTGGATGATATAAAATATATAGTACGCGTCCGGGTATACACCTGTGCGAAAGTAGTACGAGACCGGCA
 GTCAAAAAGACGTTTCCGATCTTCCACAGCTCCAGTTATTCGGAAGGCGTGGGCGTGTGTCAGTTAGGGTGT
 GGAAAGTCCCAGGCTCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGT
 GTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATA
 GTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTA
 ATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT
 TTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
 AGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAG
 CGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG
 CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAA
 GGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG
 TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGC
 GAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAG
 AGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTC
 GTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACT
 GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTT
 GCGGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCT
 ATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA**AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT**
CACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGATCTT
AGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAAT
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTA
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA
ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGG
 GGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAA
 AATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
 AGAGCTCC

TAA**GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT**

TTGGACAAACCACAACTAGAA**TGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATT**
TGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTACCCA**ACTAGTGTGAGGAAATTGCATCTACTTGCCATATGTT**
GTCCCATTATGTTGTACATAATCGTGATGTAGTGCTACGCAAATGTCAATTGATAGCCATACATGGTGCTAA
TATGCGTTACTTTTAGTATGTGAGTGAATAAAAAAATATTACCCCTATGATACCTGCGTCTTTATGCTACAAG
TTCCTTCACCATGACCAGAGCCGGTGCATCATATTCGACAACCTGGATATTCCCAGAGGTAGATTTGGCCAG
CCGCGGGGAAAAATAAATGACTTCAACTACTGGACCTTGCTAACCGATGAGCTGACGTGTGGAATTATTCAA
TGTATGGAGTCGCGGAGCGAATTGCCCTAGTGCATTAGCAACATACGATCATGGTCAGTTTGACATACAA
AAAGATATGTGGTGTCAAATAGTTCTATGGTCTGCCTATAGGTTTCTTTCCACACTAGAACGTAGTTTTTCAA
TTAAAAGTGTCTTAGAGTTTGGAGATACAAACGTGAACGGAAGTGCCAATTTTGCAATCAATTGCACGCCAT
GGGATTTGAGAGATTCGCCGAAAATGAAAATGTTTGGAACTCTTGCCCGCTTGTTTTCTTTCCATTTAGA
AAATTGGACGACGATGCTCTCAATCGGCGTAGTAAAGGATATTCTCAGTGAATTTGCGACAGATTTTTAT
GAGAAATCCATCCTTTAAAAACGTTATTATAGCCTCCCTGGAGGTTGCGAGATCTGCTATTGCCTTACCATC
CCAATATGCGAATATAGAACTCCCCAGGGCTGCCGGACGATTACATCGGAAATGCCATAAAGTTGTGCTGT****
GCCAGAATGCAACATCTGAGACTTGAACATCCTGGCCAATGTATAGATCAAATGTGCAGCGATCCTTCAGAA
GAAGAAATGTATTACAGATATGTCCAACGACTCGTAACGAGCGGCAATAAATATTCAGAATCATCGGAAAA
TTTCCGAATGAGTGTGGGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGG
AGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCA**ACTTAATCGCCTTG**CAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTC
GCTTTCTTCCCTCCTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG
TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAA**ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATC**
GCCCTGATAGACGGTTTTT**CGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGG**
AACAACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT**GATTTATAAGGGATTTGCCGATTTGGCCTATTGGTTAAA**
AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAG

APÊNDICE 3

>pSV40 US2-VP2-GBV8 (7945 bp)

SEQUÊNCIA FLANQUEADORA UP

PROMOTOR SV40

GENE DE RESISTÊNCIA NeoR/KanR

SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO POLI(A) SV 40

SEQUÊNCIA FLANQUEADORA DOWN

GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
 TCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
 GTCGCCCTTATTCCTTTTTGCGGCATTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA
 GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
 AGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
 ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA
 CACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGG
 GATCATGTAACGCTTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA
 CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATACTGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
 CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGT
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
 GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTA
 AAATTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGC
 GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAA
 CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
 GGCCACCACTCAAGAAGCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC
 AGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGC
 TGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT
 GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCG
 AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCA
 CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG
 GCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGG
 ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAG
 CTGGCACGACAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGTCACTCAT
 TAGGCACCCAGGCTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA
 CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGT
 ACCTTTTTAATTGCCATCTCATATAGAACCAATCCGGCACTCAAATATCTGTTTTGTGCAATACGGATCAAG
 TGCAGATAATTCCGGCGAATTTGTTCCACAGTTCCGCTCCAACCGTAACATTGGGGCGTATCTATACAATCT
 CCTAGTTGGCATGCAGCACCGAAGTACCCAAAACGATTTTCGTGATTATCCAAGAATATATTCTCCGTCT
 TTACGTCTCGGTGAATGATGCCCTTTCATGTATGTATGCTAGCGCCTCTAGTAGTCCACGTTGAATATAGAT

CATCTGTTGAAGGGGCATAGGGCCGACTCCGTCAATATATGTGAAAAGATCATAACGATATACACGCATTGC
CATAACACAACATTTTTCCATTTATAGGCATGGATTAATTTTATAATTGATTTATGTGAGATGGTTTTAAAA
TATCCACTTCCCTCCCGGGATTCTTCTCCAACGACTGCCTTCACTATGCATTTTTTTGGTCCGCGTCCCGT
ATCTAGTACATATATACATGACCCTCTGAACCCGGAGCGAGAGATGAAAGAATACTGTATTGCATGCGCA
CGGCAGACGTAGGACACGAACACTTTTGAAGTTCGCACGCCGCTCGTTGTTACGGCACGAAGATTCCATAC
GATCAAGATTAGCAGATTTTCTGGTATTTATCTCCACATCGTATTCAGGCCACGGAAGTCTTCGTATCGAA
GCTATTGTTACTAGTATCTGGCGACATCGACGTTCTGCAACCGTCGTACCGCTTTCGATATTTTCACAGACA
ATACCCATATTTCGAGGCACTTACTTTTGAAGACTCAACATCTACTTCCATCGCCGCCACGTATGTAATTCGGG
ACGTTGGATGATATAAAATATATAGTACGCGTCCGGGTATACACCTGTGCGAAAGTAGTACGAGACCGGCA
GTCAAAAAGACGTTTCCGATCTTCCACAGCTCCAGTTATTCGGAAGGCGTGGGCGTGTGTCAGTTAGGGTGT
GGAAAGTCCCAGGCTCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGT
GTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATA
GTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTA
ATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT
TTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAG
CGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG
CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAGTGAAGCGGAA
GGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG
TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCACCAAGC
GAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAACGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAG
AGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTC
GTCGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCAGACT
GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTT
GGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCTTCT
ATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT
CACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTT
AGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATGGCT
GACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA

TAA**GATCCAGACATG**

ATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATT
TGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTACCCAACTAGTGTGAGGAAATT
 GCATCTACTTGCCATATGTTGTCCCATTATGTTGTACATAATCGTGATGTAGTGCTACGCAAATGTCAATTGAT
 AGCCCATACATGGTGCTAATATGCGTTACTTTTAGTATGTGAGTGAATAAAAAAATATTACCCCTATGATACC
 TCGTCTTTATGCTACAAGTTCCTTCACCATGACCAGAGCCGGTGCGATCATATTCGACAACTTGGATATTCCC
 AGAGGTAGATTTGGCCAGCCGCGGGGAAAAATAAATGACTTCAACTACTGGACCTTGCTAACCGATGAGCT
 GACGTGTGGAATTATTCAATGTATGGAGTCGCGCGAGCGAATTGCCCTAGTGCATTGAGCAACATACGATCA
 TGGTCAGTTTGACATACAAAAGATATGTGGTGTCAAATAGTTCTATGGTCTGCCTATAGGTTTCTTCCACA
 CTAGAACGTAGTTTTTCAATTAAGGTGTCTTAGAGTTTGGAGATACAAACGTGAACGGAAGTGCCAATTTT
 GCAATCAATTGCACGCCATGGGATTTGAGAGATTCGCCGAAAATGAAAATGTTTGAACACTCTTGCCCGCC
 TTGTTTTCTTCCATTTAGAAAATTGGACGACGATGCTCTCAATCGGCGCTAGTAAAGGATATTCTCAGTGTA
 ATTTGCGACAGATTTTTATGAGAAATCCATCCTTTAAAAACGTTATTATAGCCTCCCTGGAGGTTGCGAGATC
 TGCTATTGTCCTTACCATCCAATATGCGAATATAGAACTCCCCAGGGCTGCCGGACGATTACATCGGAAAT
 GCCATAAAGTTGTGCTGTGCCAGAATGCAACATCTGAGACTTGAACATCCTGGCCAATGTATAGATCAAATG
 TGCAGCGATCCTTCAGAAGAAGAAATGTATTACAGATATGTCCAACGACTCGTAACGAGCGGCAATAAATA
 TTCAGAATCATCGGAAAATTTCCGAATGAGTGTGGGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAG
 CGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTT
 ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCT
 GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACG
 CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCG
 CCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAA
 TCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATG
 GTTACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTGCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGT
 GGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCG
 ATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGCTT
 ACAATTTAG