T636.08
R196a
2003

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

Aymara Alves Corrêa Rangel

ASSOCIAÇÃO DOS SISTEMAS DE RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA E DE GENÉTICA REVERSA PARA A OBTENÇÃO DE REARRANJOS ENTRE OS VÍRUS DA INFLUENZA HUMANA E EQÜINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia.

Orientador: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2003

359699

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
24/03/04
1023604-10

R196a Rangel, Aymara Alves Corrêa, 1971-
Associação dos sistemas de recombinação em levedura e de genética reversa para a obtenção de rearranjos entre os vírus da influenza humana e eqüina / Aymara Alves Corrêa Rangel. –2003.
114 p. :il.

Orientador: Zélia Inês Portela Lobato
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Eqüino – Genética – Teses. 2. Influenza eqüina – Teses. 3. Vírus da influenza – Teses. 4. Clonagem – Teses, I. Lobato, Zélia Inês Portela, 1963 – II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.
CDD – 636.108 96

Tese defendida e aprovada em 27 de novembro de 2003, pela Comissão Examinadora constituída por:

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

Profa. Zélia Inês Portela Lobato
(Orientadora)

Prof. Amauri Alcindo Alfieri

Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Prof. José Antônio Jerez

Dr. Roberto Becht Flatchart

Dedico esta tese aos meus pais, Francisco e Wilma, e a minha irmã, Moraima, os quais admiro muito e que com amor me ensinaram a buscar em mim a coragem e determinação para alcançar os meus sonhos.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato, orientadora desta tese, pelo apoio, orientação e amizade sempre presentes durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ruben O. Donis, co-orientador desta tese, pela consideração em me receber no seu laboratório no Department of Veterinary and Biomedical Sciences, do Institute of Agriculture and Natural Resources, na University of Nebraska - Lincoln, EUA, contribuindo com o seu tempo e os recursos laboratoriais necessários para a realização dos experimentos deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Curso de Pós-Graduação, Doutorado em Ciência Animal, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, representado pelo Coordenador Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite, pelo incentivo profissional e apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Department of Veterinary and Biomedical Sciences, representado pelo Department Chair Dr. Schmitz, pela atenção em me receber na University of Nebraska - Lincoln, apoiando o intercâmbio científico entre o Brasil e os EUA.

Ao Dr. Daniel Perez, Assistant Professor, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine - University of Maryland, EUA, pela participação e contribuição, através de seus conhecimentos sobre influenza, nesta tese.

A Rose Skopp, Laboratory Manager, pela amizade e empenho no meu treinamento dentro de diversas técnicas necessárias à realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, Laura Gil, Dulce Maroni, Ignacio Fernandez, Delin Liang, Israr Ansari, Limei Chen e Ventzislav Vassilev, pela contribuição na minha formação profissional e incentivo a cada nova etapa desta pesquisa.

À equipe administrativa do Department of Veterinary and Biomedical Sciences, em especial a Sra. Lee Jones, pela atenção e consideração sempre presentes a qualquer solicitação.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio e incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa, através da bolsa de estudos na modalidade de Doutorado Sanduíche no Exterior, outorgada durante o curso.

Aos meus pais, Francisco e Wilma, e a minha irmã, Moraima, pelo amor, confiança e incentivo presentes a cada nova etapa desta tese.

Enfim, a todos aqueles que não pude citar, mas que participaram da minha formação profissional e pessoal nestes 4 últimos anos, o meu sincero respeito e agradecimentos.

SUMÁRIO

		Pág.
	ABREVIATURAS	16
	RESUMO	18
	ABSTRACT	18
1	**INTRODUÇÃO**	19
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	20
2.1	VÍRUS DA INFLUENZA	20
2.1.1	Ocorrência e Hospedeiros	20
2.1.2	Classificação	22
2.1.3	Estrutura do Vírion	22
2.1.4	Organização do Genoma e Proteínas Codificantes	23
2.1.4.1	As Proteínas Polimerases: PB1, PB2 e PA	24
2.1.4.2	A Proteína Hemaglutinina: HA	24
2.1.4.3	A Proteína do Nucleocapsídeo: NP	24
2.1.4.4	A Neuraminidase: NA	24
2.1.4.5	A Matriz Protéica: M	25
2.1.4.6	A Proteína não-estrutural: NS	25
2.1.5	Estádios da Replicação	25
2.1.5.1	Adsorção, Entrada e Desnudamento	25
2.1.5.2	Síntese do mRNA e Replicação do RNA viral	26
2.1.5.3	Processamento Pós-transcrição	27
2.1.5.4	Mecanismo de Controle da Tradução	28
2.1.5.5	Empacotamento do Genoma durante a Agregação viral	28
2.1.5.6	Brotamento e Liberação viral	29
2.1.6	Genética dos vírus da influenza	29
2.1.6.1	Mecanismo de escape: deslocamento antigênico e mudança antigênica	29
2.1.6.2	Rearranjo dos segmentos RNA	31
2.1.6.3	Mutações no RNA	32
2.1.6.4	Recombinação de RNA	32
2.1.7	Patogênese	33
2.1.7.1	Fator determinante da patogenicidade: clivagem de HA	33
2.1.7.2	Natureza multifatorial da patogenicidade	33
2.1.8	Aspectos Clínicos e Patológicos	34
2.1.9	Propagação	34
2.1.10	Prevenção e Controle	35
2.2	INFLUENZA EQÜINA	35
2.2.1	Histórico	35
2.2.2	Etiologia	37
2.2.3	Epidemiologia	37
2.2.4	Aspectos Clínicos	37
2.2.5	Patogenia e Aspectos Patológicos	38
2.2.6	Diagnóstico	38
2.2.7	Tratamento	39
2.2.8	Profilaxia	40
2.3	VACINAS ASSOCIADAS À INFLUENZA EQÜINA	40
2.3.1	Vacinas Inativadas	40
2.3.2	Vacinas Vivas Modificadas: em desenvolvimento	41

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

2.4	INFLUENZA EQÜINA NO BRASIL	42
2.5	SISTEMA DE GENÉTICA REVERSA: HISTÓRICO E PERSPECTIVAS	43
2.5.1	Considerações Iniciais	43
2.5.2	Reconstituição de Complexos RNP funcionais	43
2.5.3	Sistemas Celulares: estudo da replicação e transcrição do vírus da influenza	44
2.5.4	Sistemas com vírus auxiliar	44
2.5.4.1	Método de Transfecção da Ribonucleoproteína	44
2.5.4.2	Método RNA polimerase I	45
2.5.4.3	Avanços para o Sistema de Genética Reversa	46
2.5.5	Obtenção do vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados	46
2.5.5.1	Sistema RNA polimerase I: sentido negativo e sentido positivo de abordagens	47
2.5.5.2	Sistema RNA polimerase I/II: unidirecional e bidirecional	48
2.5.6	Aplicações Futuras.	50
2.6	RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA	50
2.6.1	Sistema de Duplo-híbridos em levedura	50
2.6.2	Sistema de Recombinação homóloga em levedura: aprimoramento e novas aplicações	51
2.7	SISTEMA DE REPLICAÇÃO DE UM MINIGENOMA (P5): ANÁLISE DOS CLONES PB1, PB2, PA e NP	51
2.7.1	Análise da Expressão Genética	51
2.7.2	Sistema de Expressão utilizando Acetil Cloranfenicol Transferase (CAT)	52
2.7.3	Sistema P5	53
3	**OBJETIVOS**	53
3.1	OBJETIVOS GERAIS	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	54
4.1	VÍRUS E CULTURA DE CÉLULAS	54
4.2	PRODUÇÃO VIRAL	55
4.3	ISOLAMENTO DE RNA	55
4.4	RT-PCR	55
4.5	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pJG2000	61
4.6	SISTEMA DE CLONAGEM: RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA	63
4.7	AVALIAÇÃO DOS CLONES	66
4.7.1	Avaliações iniciais: digestões e análise da eletroforese em gel de agarose	66
4.7.2	Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5) e Ensaio de CAT	66
4.8	SISTEMA DE GENÉTICA REVERSA	67
4.8.1	Vírus A/WSN/33 recombinante	67
4.8.2	Rearranjos Genéticos	68
4.9	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS OBTIDOS POR REARRANJOS GENÉTICOS	69
4.9.1	Ensaio de Placa	69
4.9.2	Imunofluorescência Indireta	69
4.10	CONFIRMAÇÃO DO SEGMENTO ESPECÍFICO DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86: REARRANJOS GENÉTICOS	69
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	70
5.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pJG2000	70
5.2	OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES, CONTENDO OS SEGMENTOS GENÔMICOS DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86	73

5.3	AVALIAÇÃO DOS CLONES REPRESENTANTES DOS SEGMENTOS DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86	74
5.4	REARRANJO GENÉTICO ENTRE OS VÍRUS DA INFLUENZA EQÜINA E HUMANA: SISTEMA 1 + 7 PARA PRODUÇÃO VIRAL	78
5.5	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS OBTIDOS POR REARRANJOS GENÉTICOS	81
5.5.1	Avaliação por Imunofluorescência Indireta	81
5.5.2	Ensaio de placa	83
5.6	CONFIRMAÇÃO DO SEGMENTO ESPECÍFICO DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86: REARRANJOS GENÉTICOS	87
6	**CONCLUSÕES**	91
7	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	92
8	**ANEXO**	97
8.1	INICIADORES	97
8.1.1	BM-PB1-1-F	97
8,1.2	PB1-1230-R	97
8.1.3	HW-PB1-1-F	97
8.1.4	PB1-1141-F	97
8.1.5	BM-PB1-2341-R	97
8.1.6	HW-PB1-2341-R	97
8.1.7	BmPB1EqKyF	97
8.1.8	BmPB1EqKyR	97
8.1.9	BM-PB2-1-F	97
8.1.10	PB2-1193-R	97
8.1.11	HW-PB2-1-F	97
8.1.12	PB2-1111-F	98
8.1.13	BM-PB2-2341-R	98
8.1.14	HW-PB2-2341-R	98
8.1.15	BaPB2EqKyF	98
8.1.16	BaPB2EqKyR	98
8.1.17	HW-PA-1-F-II	98
8.1.18	EqPA-127-R	98
8.1.19	PA-64-F	98
8.1.20	PA-1182-R	98
8.1.21	PA-1111-F	98
8.1.22	PA-2134-R	98
8.1.23	EqPA-2110-F	98
8.1.24	HW-PA-2233-R	98
8.1.25	BmPAEqKyF	99
8.1.26	BmPAEqKyR	99
8.1.27	HW-HA-1-F	99
8.1.28	KyH3HA-120-R	99
8.1.29	HA-69-F	99
8.1.30	HA-958-R	99
8.1.31	HA-869-R	99
8.1.32	HA-1703-R	99
8.1.33	KyHAHA-1642-F	99
8.1.34	BM-NP-1-F	99
8.1.35	BM-NP-1565-R	99
8.1.36	HW-NP-1-F	99
8.1.37	HW-NP-1565-R	99

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

8.1.38 BA-NA-1-F-II 100
8.1.39 NA-840-R 100
8.1.40 HW-NA-1-F 100
8.1.41 NA-751-F 100
8.1.42 BA-NA-1413-R 100
8.1.43 HW-NA-1413-R 100
8.1.44 BM-M-1-F 100
8.1.45 BM-M-1027-R 100
8.1.46 HW-M-1-F 100
8.1.47 HW-M-1027-R 100
8.1.48 BM-NS-1-F 100
8.1.49 BM-NS-890-R 100
8.1.50 HW-NS-1-F 100
8.1.51 HW-NS-890-R 101
8.1.52 NP-581-F 101

8.2 ESQUEMA SEQÜENCIAL DA METODOLOGIA UTILIZADA NA TESE 102

8.3 SEQÜENCIAMENTOS 103
8.3.1 Seqüenciamento com iniciador BM-PB1-1-F: clone 1 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 103
8.3.1.1 Seqüência de nucleotídeos 103
8.3.1.2 Seqüência de aminoácidos 104
8.3.2 Seqüenciamento com iniciador BM-PB1-1-F: clone 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 105
8.3.2.1 Seqüência de nucleotídeos 105
8.3.2.2 Seqüência de aminoácidos 106
8.3.3 Seqüenciamento com iniciador PB1-1230-R: clone 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 107
8.3.3.1 Seqüência de nucleotídeos 107
8.3.3.2 Seqüência de aminoácidos 108
8.3.4 Seqüenciamento com iniciador BM-NP-1-F: clone 26 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/'Kentucky/2/86 109
8.3.4.1 Seqüência de nucleotídeos 109
8.3.4.2 Seqüência de aminoácidos 110
8.3.5 Seqüenciamento com iniciador NP-581-F: clone 26 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/'Kentucky/2/86 111
8.3.5.1 Seqüência de nucleotídeos 111
8.3.5.2 Seqüência de aminoácidos 112
8.3.6 Seqüenciamento com iniciador NP-581-F: clone 32 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/'Kentucky/2/86 113
8.3.6.1 Seqüência de nucleotídeos 113
8.3.6.2 Seqüência de aminoácidos 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de Genética Reversa (rearranjos genéticos): sistema 1 + 7 de transfecções com um plasmídeo contendo o cDNA de um segmento genômico do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e sete plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33 79

Tabela 2. Sistema de Genética Reversa (rearranjos genéticos): sistema 4 + 4 de transfecções com quatro plasmídeos contendo o cDNA de HA, NA, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e quatro plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do vírus da influenza A (adaptado de Lamb & Krug, 2001)..... 23

Figura 2. Transcrição e replicação dos RNAs do vírus da influenza (adaptado de Hayden & Palese, 1997; Lamb & Krug, 2001) 26

Figura 3. Modelo de síntese do mRNA catalizada pelo complexo RNA polimerase dependente de RNA. A ligação específica do terminal 5' à subunidade PB1 da polimerase persiste durante a síntese do mRNA, para que o RNA viral seja associado ao complexo polimerase, na direção 3' para 5' durante a síntese do mRNA. R3 e R5 são os sítios de PB1 onde os terminais 3' e 5' do RNA viral se ligam. Como conseqüência da ligação de ambos os terminais dos RNAs, a própria polimerase age como uma barreira para a continuidade da síntese do mRNA, seguida da terminação (adaptado de Lamb & Krug, 2001) 27

Figura 4. Evolução dos vírus da influenza tipo A, circulando em humanos (adaptado de Collier & Oxford, 1996; Wright & Webster, 2001) 31

Figura 5. Método da transfecção da ribonucleoproteína (RNP). RNPs virais funcionais foram reconstituídos *in vitro*, através de RNA viral sintetizado e misturado à NP purificada e proteínas polimerases, e transfectados em células eucaróticas. As sete demais RNPs virais foram proporcionadas pela infecção com o vírus auxiliar. Os sistemas de seleção foram então aplicados para a identificação do vírus recombinante (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001) 45

Figura 6. Método RNA Polimerase I (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001)..... 46

Figura 7. Obtenção do vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados. Oito plasmídeos que contêm a região codificante para um dos segmentos virais, flanqueada pelas seqüências promotora e terminadora da RNA polimerase I, são transfectados em células eucarióticas para a síntese do RNA viral pela RNA polimerase I. Nove plasmídeos para a expressão de todas as proteínas estruturais ou apenas quatro plasmídeos para as proteínas virais são necessários para a replicação e transcrição do RNA viral, sendo fornecidos pela co-transfecção de células com construções de expressão de proteínas (adaptado de Newmann & Kawaoka, 2002) 47

Figura 8. Diagrama esquemático do sistema RNA polimerase I/II, com síntese de mRNA e RNA viral, utilizado para a produção do vírus da influenza a partir de apenas oito plasmídeos (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001) 48

Figura 9. Sistemas de transcrição RNA polimerase I/II: unidirecional (A) e bidirecional (B) (adaptado de Hoffmann & Webster, 2000) 49

Figura 10. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PB1, PB2 e NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. Os números 1 e 3, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2 e 4, representam os iniciadores anti-senso (contidos no Quadro 3A) 56

Figura 11. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PA e HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. Os números 1, 3, 5 e 7, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2, 4, 6 e 8 representam os iniciadores anti-senso (contidos no Quadro 3B) 57

Figura 12. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos NP, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. O número 1 corresponde ao iniciador senso, enquanto que o número 2 representa o iniciador anti-senso (contidos no Quadro 3C) 58

Figura 13. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PB1, PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na segunda fase do trabalho. Os números 1 e 3, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2 e 4, representam os iniciadores anti-senso (contidos nos Quadros 4A e 4B) 59

Figura 14. Representação esquemática do sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II, com produção de RNA viral e mRNA (adaptado de Hoffmann & Webster, 2000). O cDNA viral é inserido numa orientação de sentido negativo entre as seqüências promotora (p_{Ih}) e terminadora de pol I (t_I), estando esta unidade inteira de transcrição pol I numa orientação de sentido positivo entre a região promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (p_{IICMV}) e o sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (a_{IIbgh}) 62

Figura 15. Representação esquemática da construção do vetor de clonagem pJG2000. (A) Vetor pHW2000 digerido com as enzimas de restrição *Ssp*I e *Afl*III; (B) Vetor pJG4.5 digerido com as enzimas de restrição *Afl*III e *Pvu*II. (C) Fragmentos, pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III (1285 pb), contendo a estrutura para o sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II e pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III (6271 pb), contendo o marcador triptofano (Trp) e o gene de resistência à ampicilina (Amp^R) ligados, originando o vetor pJG2000 63

Figura 16. Representação esquemática do sistema de clonagem através da Recombinação em levedura. (A) Quatro produtos de PCRs, correspondentes aos segmentos PA (primeira fase do trabalho) ou HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura com o vetor pJG2000 digerido com *Bsm*BI (linearizado) e tratado com fosfatase alcalina (CIAP). (B) Dois produtos de PCRs, correspondentes aos segmentos PB1, PB2, PA (segunda fase do trabalho) ou NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura. (C) Um produto de PCR, correspondente aos segmentos NP, M ou NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura. (D) Vetor pJG2000 com presença do cDNA correspondente a um dos oito segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, que através da Recombinação em levedura resulta em diversos clones 64

Figura 17. Plasmídeos purificados, contendo os cDNAs do vírus A/WSN/33 (Hoffmann *et al.*, 2000 b). Linhas 1, pHW181-PB2; 2, pHW182-PB1; 3, pHW183-PA; 4, pHW184-HA; 5, pHW185-NP; 6, pHW186-NA; 7, pHW187-M; 8, pHW188-NS. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III..... 68

Figura 18. Sistema de Genética Reversa, para a obtenção dos vírus por rearranjos genéticos (ilustração adaptada de Hoffmann *et al.*, 2002a) 68

Figura 19. Vetores pHW2000 e pJG4.5 purificados e digeridos. Linhas 1, pJG4.5 purificado; 2, pJG4.5-*Pvu*II; 3, pJG4.5- *Afl*III; 4, pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III; 5, pHW2000 purificado; 6, pHW2000-*Ssp*I; 7, pHW2000-*Afl*III; 8, pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III..... 71

Figura 20. Purificação ("Gene Clean") dos fragmentos 6271 pb (linha 1) e 1285 pb (linha 2) das digestões pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III e pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III, respectivamente. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III..... 71

Figura 21. Vetor pJG2000 purificado (linha 1) e digerido pela enzima de restrição *Bsm*BI (linha 2). Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III 71

Figura 22. (A) Vetor de clonagem pJG2000, com presença do gene de resistência à ampicilina (Ap^R) e o marcador triptofano (Trp), assim como a região promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (CMV) e o sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (BGHpA). (B) Projeção esquemática do sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II (Hoffmann & Webster, 2000), cuja estrutura viabiliza a fusão precisa do cDNA viral na orientação de sentido negativo entre as regiões promotora (p_{Ih}) terminador (t_I) da pol I, presente no pJG2000 72

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA DA UFMG

Figura 23. Detecção da proteína NP do vírus da influenza pela Imunofluorescência Indireta, utilizando anticorpo monoclonal anti-NP do vírus da influenza humana e subsequentemente, o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de camundongo, em células infectadas pelos controles negativo ("MOCK") (A) e positivos, A/Equine/Kentucky/2/86 (B) e A/WSN/33 (C), assim como pelos vírus obtidos por rearranjos genéticos: pJG2000-K/PB2-WSN (D), pJG2000-K/HA-WSN (E), pJG2000-K/NA-WSN (F), pJG2000-K/M-WSN (G) e pJG2000-K/NS-WSN (H) 82

Figura 24. Detecção das proteínas do vírus da influenza pela Imunofluorescência Indireta, utilizando anticorpo policlonal primário contra proteínas do vírus da influenza humana, A/Aichi/68 (H3N8) e subsequentemente, o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de coelho, em células infectadas pelos controles negativo ("MOCK") (A) e positivos, A/Equine/Kentucky/2/86 (B) e A/WSN/33 (C), assim como pelo vírus pDP2002-NPEq-WSN (D), obtido por rearranjo genético 83

Figura 25. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus A/WSN/33 (controle) 84

Figura 26. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (controle) 84

Figura 27. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/PB2-WSN 84

Figura 28. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/HA-WSN 84

Figura 29. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/NA-WSN 85

Figura 30. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/M-WSN 85

Figura 31. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/NS-WSN 85

Figura 32. Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86: (A) HA-69-F e HA-958-R (seqüência K-HA F. 69); (B) HA-869-F e HA-1703-R (seqüência K-HA F. 869). Linhas 1, reação sem a adição de cDNA (molde); 2, vírus A/WSN/33; 3, vírus obtido por rearranjo genético, pJG2000-K/HA-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (A e B) 87

Figura 33. Confirmação do segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pJG2000-K/HA-WSN, obtido por rearranjo genético. Os produtos das PCRs (Figuras 32 A e B), foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RV, específica ao segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente à seqüência K-HA F. 69, presente no vírus pJG2000-K/HA-WSN; 2, digestão do produto de PCR correspondente à seqüência K-HA F. 869, presente no vírus pJG2000-K/HA-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III 88

Figura 34. (A) Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento NP: BM-NP-1-F e BM-NP-1565-R. Linhas 1, vírus A/WSN/33; 2, reação sem a adição de cDNA (molde); 3, vírus pDP2002-NPEq-WSN, obtido por rearranjo genético. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III. (B) Confirmação do segmento NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pDP2002-NPEq-WSN. Os produtos das PCRs (Figura 34 A) foram digeridos com a enzima *Xho*I, específica ao segmento NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente a NP do vírus A/WSN/33; 2, digestão do produto de PCR correspondente a NP do pDP2002-NPEq-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III 89

Figura 35. (A) Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento M: BM-M-1-F e BM-M-1027-R. Linhas 1, reação sem a adição de cDNA (molde); 2, vírus A/WSN/33; 3, vírus pJG2000-K/M-WSN, obtido por rearranjo genético. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III. (B) Confirmação do segmento M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pJG2000-K/M-WSN. Os produtos das PCRs (Figura 35 A) foram digeridos com a enzima *Afl*III, específica ao segmento M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente a M do vírus A/WSN/33; 2, digestão do produto de PCR correspondente a M do vírus pJG2000-K/M-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III 89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Segmentos genômicos do vírus da influenza A e distribuição das características genéticas 23

Quadro 2. Influenza Eqüina no Brasil (1996-2001) 42

Quadro 3. A) Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PB1, PB2 e NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 57
B) Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PA e HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 58
C) Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos NP, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 59

Quadro 4. A) Iniciadores* utilizados na segunda fase do trabalho, para RT-PCR do segmento PB1 do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, em dois grupos distintos 60
B) Iniciadores* utilizados na segunda fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 61

Quadro 5. Seqüências representantes dos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (primeira fase do trabalho), utilizadas na recombinação em levedura 64

Quadro 6. Seqüências* representantes dos segmentos PB1 (Grupos A e B), PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (segunda fase do trabalho), utilizadas na recombinação em levedura. Todas estas seqüências apresentam um fragmento do vetor pJG2000, para a Recombinação em levedura 65

Quadro 7. Confirmação dos segmentos HA, NP e M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 nos respectivos vírus obtidos por rearranjos genéticos: iniciadores e enzimas utilizados 70

Quadro 8. Recombinação em levedura (primeira fase): plasmídeos contendo os cDNAs correspondentes aos oito segmentos genômico do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 73

Quadro 9. Recombinação em levedura (segunda fase): plasmídeos contendo os cDNAs correspondentes aos segmentos PB1, PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 74

Quadro 10. Avaliação inicial: digestões com *Eco*RV dos clones obtidos na primeira fase do trabalho, após a Recombinação em levedura 75

Quadro 11. Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), aplicado aos clones dos segmentos PB1, PB2, PA e NP, da primeira fase do trabalho, com avaliação da expressão gênica através do Ensaio de CAT 75

Quadro 12. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica dos clones 42 / pJG2000-K/PB1 e 9 / pJG2000-K/NP 76

Quadro 13. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica do clone 15 / pJG2000-K/PB2 76

Quadro 14. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica do clone 19 / pJG2000-K/PA 76

Quadro 15. Seqüenciamento: clones 1 e 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 77

Quadro 16. Seqüenciamento: clones 26 e 32 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 77

Quadro 17. Avaliação inicial: digestões com *Eco*RV dos clones obtidos na segunda fase do trabalho, após a Recombinação em levedura 78

Quadro 18. Transfecção dos clones referentes aos segmentos HA, NA, M ou NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, num sistema 1 + 7, com os demais clones do vírus A/WSN/33: obtenção de vírus e análise pela Imunofluorescência Indireta 78

Quadro 19. Transfecção dos clones referentes aos segmentos PB1, PB2 e NP (segunda fase do trabalho) do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, num sistema 1 + 7, com os demais clones do vírus A/WSN/33: obtenção de vírus e análise pela Imunofluorescência Indireta 79

Quadro 20 Sistema de Genética Reversa: vírus resultantes dos rearranjos genéticos entre o vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e o vírus A/WSN/33 80

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
BSA	Soro de albumina bovina
CAT	Acetil Cloranfenicol transferase
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CIAP	Fosfatase alcalina
cRNA	Ácido Ribonucléico complementar
CV-1	Linhagem celular "African Green Monkey"
DH10B	Cepa de *E. coli*
DIGS	Domínios ricos em glicoproteínas insolúveis em detergentes
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAfd	Ácido Desoxirribonucléico fita dupla
293T	Linhagem celular de rim embriônico humano
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
HA	Hemaglutinina
hGH	Hormônio de crescimento humano
IFN	Interferon
LB	Meio de Luria-Bertani (meio de crescimento de bactéria)
LSC	Contador de cintilação líqüida
M	Matriz Protéica
MDCK	"Madin-Darby canine kidney"
MEM	Meio Mínimo Essencial
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NA	Neuraminidase
NEP	Proteína de exportação nuclear
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína não-estrutural
OD	Densidade Óptica
OIE	"Office Internacional des Epizooties"
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Polimerase ácida
pb	Pares de bases
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PFU	Partículas formadoras de unidade
PKR	Proteína Quinase celular
Poli-A	Poliadenilização
RFY206	Amostra de levedura
RG	Sistema de expressão do genoma
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAfd	Ácido Ribonucléico fita dupla
RNAfs	Ácido Ribonucléico fita simples
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Transcriptase reversa-PCR
SFB	Soro fetal bovino
SV40	Simian vírus
TLC	Cromatografia de camada fina
TPCK	"Tosylsulfonyl phenylalanul chloromethyl ketone"
Trp	Triptofano
VLPs	Partículas virais incompetentes para a replicação
YNB	Meio de crescimento seletivo para levedura (contém glucose e base nitrogenada)
YPD	Meio de crescimento para levedura (contém glucose e peptona)

RESUMO

O Sistema de Recombinação em levedura está surgindo como uma nova tecnologia de clonagem no meio científico, sendo esta tese pioneira na introdução desta metodologia para a clonagem dos segmentos genômicos do vírus da influenza. A rapidez e a eficiência dos procedimentos que envolvem o Sistema de Recombinação em levedura foram verificadas durante a produção dos plasmídeos recombinantes, contendo o cDNA dos oito segmentos genômicos do vírus da influenza eqüina, A/Equine/Kentucky/2/86 (H3N8). Da mesma forma, estas qualidades também poderão garantir a formação de uma coleção de plasmídeos a ser utilizada na produção de uma amostra viral de interesse. A aplicação dos clones produzidos através do Sistema de Recombinação em levedura, no Sistema de Genética Reversa, associando um plasmídeo recombinante contendo o cDNA correspondente a PB2, HA, NP, NA, M ou NS, do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, com sete plasmídeos representantes dos demais segmentos genômicos do vírus da influenza humana, A/WSN/33 (H1N1), resultou na produção de seis vírus por rearranjos genéticos. Estudos de caracterização destes vírus foram iniciados e três vírus foram analisados para a confirmação do respectivo segmento do vírus eqüino, determinando a prova da efetiva interação destes dois sistemas. As avaliações iniciais dos vírus produzidos por rearranjos genéticos, indicaram um pobre crescimento em células "Madin-Darby canine kidney" (MDCK), em comparação com o vírus original A/WSN/33, cuja amostra viral é altamente adaptada em células MDCK. O rearranjo genético com apenas um gene do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, em associação com os demais do vírus A/WSN/33, não confere a produção de um vírus com a mesma eficiência que A/WSN/33 em células MDCK, revelando a importância da adaptação ao hospedeiro e da interação genética para uma replicação eficiente. Os procedimentos adotados nesta tese conduzem a um novo campo de pesquisas e possibilidades, não só para os estudos do vírus da influenza eqüina, que continua a ser o principal patógeno viral em eqüinos, reforçando a necessidade de aperfeiçoar as vacinas para o controle desta doença, mas também para o estudo de outros agentes infecciosos com potencial zoonótico.

Palavras-chave: Influenza eqüina; recombinação em levedura; genética reversa; rearranjo genético.

ABSTRACT

The Yeast Recombination system is appearing as a new cloning technology in the scientific field, where this thesis is pioneer in the introduction of this methodology for cloning the genomic segments of influenza virus. The efficiency and speed of the proceedings that involves the Yeast Recombination system, were verified during the production of recombinant plasmids containing the cDNA of the eight genomic segments of the equine influenza virus, A/Equine/Kentucky/2/86 (H3N8). In the same way, these qualities could guarantee the formation of a plasmid collection to be used in the production of a viral strain of interess. The introduction of the clones produced by the Yeast Recombination system, into the Reverse Genetics system, associating one recombinant plasmid containing the cDNA correspondent to PB2, HA, NP, NA, M or NS of A/Equine/Kentucky/2/86 virus, with seven plasmids representing the others genomic segments from the human influenza virus, A/WSN/33 (H1N1), resulted in the production of six virus by gene reassortment. Studies characterizing these viruses were initiated and three virus were analyzed for confirmation of the respectives equine viral segments, establishing the prove of the efficient interaction of these two systems. The initial valuations of the reassortants viruses produced, indicated a poor growth in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, in comparison with the original virus A/WSN/33, which strain is a highly adapted in MDCK cells. The gene reassortment with only one gene of A/Equine/Kentucky/2/86, interacting with the others from A/WSN/33, does not guarantee a virus with the same efficiency that A/WSN/33 in MDCK cells, revealing the importance of host adaptation and gene interaction for efficient replication. The proceedings adopted in this thesis lead to a new field for research and possibilities, not only to study the equine influenza virus, which continues to be the principal pathogen in equines, reforcing the necessity to improve the vaccines to control this disease, but to study others infectious agents with zoonotic potential.

Keywords: Equine influenza; yeast recombination; reverse genetics; gene reassortment.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

1. INTRODUÇÃO

Influenza é a denominação empregada à várias síndromes clínicas causadas pelos vírus da influenza, tipos A, B ou C, da família *Orthomyxoviridae*. Caracteriza principalmente uma enfermidade infecto-contagiosa que afeta quase que exclusivamente o trato respiratório. Diversos sinônimos são encontrados, dependendo do hospedeiro, como por exemplo a gripe, para infecções humanas e a peste aviária, para formas altamente patogênicas da influenza aviária (Slemons & Brugh, 1994).

Os vírus da influenza são únicos, comparados com os que afetam o sistema respiratório, principalmente no que se refere à variabilidade antigênica, periodicidade e impacto na população em geral (Hayden & Palese, 1997). Os do tipo A, que determinam uma doença respiratória aguda, altamente contagiosa e associada a altas taxas de morbidade e baixas taxas de letalidade, são encontrados na maioria das vezes nos homens, eqüinos, suínos e em diversas espécies de aves. Raras são as ocasiões em que são encontrados em focas, martas e nos bovinos. Os vírus da influenza tipos B e C limitam-se à espécie humana.

Os vírus da influenza tipo A são os únicos que exibem potencial zoonótico sob condições naturais. A melhor evidência deste potencial, dentre os diversos casos conhecidos, é a transmissão esporádica dos vírus da influenza suína aos seres humanos (Slemons & Brugh, 1994). No caso dos eqüinos, apesar dos seres humanos serem freqüentemente expostas a animais infectados pelo vírus da influenza, ainda não existem casos relatados de ocorrência natural da influenza eqüina em humanos. Contudo, justamente devido a este próximo contato entre eqüinos e humanos, aliado à capacidade mutagênica deste vírus, é que a possibilidade dos vírus da influenza eqüina envolverem-se na origem de uma pandemia humana no futuro não pode ser excluída (Chambers, 2002).

A partir da segunda metade do século XX, estudos levaram ao isolamento do vírus responsável pela influenza eqüina (subtipos 1 e 2) (Corrêa & Corrêa, 1992), sendo que atualmente, este agente infeccioso continua a ser a principal causa das doenças de caráter agudo do trato respiratório dos eqüinos (Wilson, 1993) e de ocorrência mundial. O vírus dissemina-se rapidamente, devido à freqüente e violenta tosse e em parte também ao curto período de incubação, passando de animal a animal (eqüinos) pelos aerosóis (Mohanty & Dutta, 1981), podendo causar surtos com alta morbidade e letalidade variada (Higgins & Wright, 1995).

A prevenção da influenza eqüina se faz a partir da vacinação dos eqüinos com vacinas bivalentes, inativadas (Corrêa, 1974; Fenner *et al.*, 1987; Reneger, 1992). Contudo, os potros jovens muitas vezes apresentam uma resposta fraca a esta vacinação, não estando devidamente protegidos contra a doença. Desta forma, os esforços dos cientistas têm se voltado para o desenvolvimento de vacinas de vírus da influenza vivo atenuado que, em comparação com as vacinas de vírus inativado, são melhores indutoras de uma resposta imune forte e duradoura, sem necessidade de revacinação, conferindo aos animais uma proteção completa (Murphy & Chanock, 1990; Reneger, 1992; Palese *et al.*, 1997).

Dentre as novas estratégias disponíveis em biologia molecular, o recente desenvolvimento de sistemas de genética reversa permite a introdução de mudanças direcionadas dentro do genoma do vírus da influenza, proporcionando a produção de vírus recombinantes (Palese *et al.*, 1997). Este sistema tem sido implementado com vírus da influenza humana, não havendo relatos de um sistema que produza mudanças direcionadas no vírus da influenza eqüina. Desta forma, a adaptação do sistema de genética reversa ao vírus da influenza eqüina poderá permitir no futuro, a elaboração de vacinas atenuadas contra este vírus.

Neste contexto, onde os cientistas estão avançando nos conhecimentos em da

Biologia Molecular, conduzindo ao aprimoramento tecnológico na engenharia genética, é que sistemas como o de duplo-híbridos (Fields & Song, 1989), envolvendo os estudos dos domínios de interação específicos de proteínas, a partir de um fator de transcrição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conduziram à introdução do Sistema de Recombinação em Levedura. Esta nova tecnologia de clonagem, verificada no trabalho de Kitagawa & Abdulle (2002), viabiliza a obtenção de plasmídeos recombinantes com certa rapidez e segurança, pela redução do número de falsos positivos.

A partir deste desenvolvimento tecnológico, tanto no campo da Genética Reversa, quanto na Recombinação em levedura, aliada à importância do estudo da influenza eqüina, é que esta tese foi estruturada. Trata-se da primeira vez em que o Sistema de Recombinação em levedura, utilizado para a obtenção de plasmídeos recombinantes, é associado ao Sistema de Genética Reversa, no campo da influenza, mais especificamente da influenza eqüina.

Esta tese, além de provar a funcionalidade destes sistemas em associação, tem por objetivo viabilizar a obtenção de vírus por rearranjos genéticos, com presença de apenas um segmento do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e demais do vírus da influenza humana, A/WSN/33, dando início à avaliação desta interação genética entre influenza humana e eqüina e suas repercussões sobre a replicação viral. Num mesmo contexto, condições são criadas para a obtenção futura do vírus da influenza eqüina recombinante, assim como novas possibilidades genéticas para a aquisição de amostras virais vivas modificadas para a produção de vacinas, contra esta e outras doenças virais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA INFLUENZA

A influenza encontra-se há muito entre os homens, onde o próprio nome refere-se à antiga crença de que era causada por uma influência malígna e sobrenatural (Collier & Oxford, 1996). Os vírus responsáveis por esta doença do trato respiratório, podem causar surtos explosivos que atingem os diferentes grupos etários indiscriminadamente. Muitas vezes, estabelecem um substancial índice de mortalidade, afetando principalmente as pessoas cronicamente doentes ou com idade mais avançada (Hayden & Palese, 1997).

2.1.1 Ocorrência e Hospedeiros

O vírus da influenza possui uma distribuição mundial e ocasiona surtos anuais com intensidades variadas (Hayden & Palese, 1997). A distribuição geográfica da influenza A é bem uniforme entre os homens, onde as comunidades mais isoladas apresentam experiências de surtos esporádicos por influenza e as comunidades mais metropolitanas sofrem surtos periódicos. Nos animais, a distribuição é menos uniforme devido a múltiplos fatores, tais como: localização e densidade das populações hospedeiras, comércio internacional, práticas agrícolas regionais, política da Medicina Veterinária Preventiva, rotas de migração das aves selvagens e costumes religiosos e sociais (Slemons & Brugh, 1994).

A influenza eqüina e suína têm sido relatadas na Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia e África. A influenza aviária tem sido constatada em todos os continentes a exceção da Antártica (Slemons & Brugh, 1994).

A epidemia por influenza apresenta uma sazonalidade distinta, não sendo conhecidos os motivos, mas sugere-se que tenha relação com a reintrodução do vírus a cada estação, assim como fatores comportamentais influenciando a exposição e possivelmente fatores afetando a sobrevivência do vírus no meio ambiente (Hayden & Palese, 1997).

Os vírus da influenza manifestam-se no período de Outubro a Abril no hemisfério norte, mas normalmente com picos entre Dezembro e Março. A influenza no hemisfério sul ocorre tipicamente entre Abril

e Setembro, principalmente nas estações chuvosas. Surtos no verão têm ocorrido em populações semi-fechadas (Hayden & Palese, 1997).

A questão dos hospedeiros do vírus da influenza é outro fator de grande importância quando se estuda a capacidade desses vírus em dessiminarem-se. Os vírus da influenza tipo A possuem uma grande variedade de hospedeiros. Os principais hospedeiros naturais do vírus tipo A são os humanos, suínos, eqüinos e particularmente os patos e outras aves, que abrangem uma variedade de subtipos HA (hemaglutinina) e NA (neuraminidase) (Slemons & Brugh, 1994; Hayden & Palese, 1997). Representantes de cada subtipo conhecido dos vírus da influenza A têm sido isolados de aves aquáticas (Lamb & Krug, 2001).

A influenza nas aves é uma infecção do trato gastro-intestinal, com transmissão predominantemente através das fezes. A persistência das aves em reservatórios de águas pode explicar a transmissão para outras aves e para os mamíferos aquáticos, como as focas e baleias (Zambon, 2001). Possivelmente com a contaminação fecal das águas também ocorra a transmissão para os suínos, eqüinos e outros mamíferos (Webster, 1998).

O fato dos vírus da influenza tipo A infectarem também espécies não humanas determina conseqüências importantes. Primeiro, o rearranjo genético entre os vírus da influenza tipo A humanos e não humanos poderá levar a novos vírus pandêmicos. Segundo, a presença de um reservatório animal permitirá que o vírus continue a circular fora da população humana, dificultando o processo de erradicação (Hayden & Palese, 1997).

Os vírus da influenza B e C são principalmente patógenos de humanos, sendo que o tipo B pode infectar cães, gatos e possivelmente suínos. Contudo, não existe evidência da transmissão animal para animal ou animal para humano do vírus da influenza tipo B. O tipo C ainda é mais restrito aos humanos, sendo que poucos relatos sugerem que este tipo de vírus replica em animais (Hayden & Palese, 1997).

A especulação do potencial zoonótico dos vírus da influenza animal e do possível papel na origem da pandemia humana por vírus da influenza A, foi inicialmente incentivada por pelo menos cinco observações. Primeiro, todos os vírus da influenza animal compartilham da mesma especificidade do tipo A humana de caráter pandêmico. Segundo, muitos vírus da influenza A dos animais compartilham da especificidade de subtipos em comum com os vírus da influenza A humana. Terceiro, investigações epidemiológicas baseadas em dados históricos têm identificado epidemias simultâneas por influenza em humanos e eqüinos durante os séculos XVIII e XIX, assim como o aparecimento da influenza suína coincide com a pandemia por influenza que atingiu os seres humanos em 1918. Quarto, experimentos têm demonstrado que o potencial de alcance dos hospedeiros do vírus da influenza é maior do que o observado na natureza. Quinto, sinais da doença e lesões têm sido similares em humanos e animais (Slemons & Brugh, 1994).

Apesar das pessoas serem frequentemente expostas à eqüinos infectados por influenza, não existe nenhum caso confirmado da ocorrência natural da influenza Eqüina em humanos (Slemons & Brugh, 1994). De qualquer forma, diversos aspectos da biologia da influenza eqüina conectam-se à compreensão da origem das pandemias humanas, tais como a sugestão de que a pandemia humana do século XIX possa ter relação a um vírus semelhante ao da influenza eqüina, assim como o fato de que os eqüinos podem entrar em contato direto com os vírus da influenza aviária, como foi evidenciado no surto de 1989, da influenza aviária nos eqüinos, na Província de Jilin (China) (Chambers, 2002).

Estudos dos últimos incidentes com influenza, como o de Hong Kong, em 1997, envolvendo uma amostra letal (H5N1), demonstraram a ausência de um rearranjo genético, tendo o vírus passado diretamente de aves para humanos. Este fato expõe a

urgência em se pesquisar a natureza das conhecidas barreira de espécies, que previnem que amostras virais da influenza passem de um animal para outro. Se esta barreira for melhor compreendida, os cientistas talvez sejam capazes de selar as "fendas" que nela existam e que atualmente permitem que certas amostras virais de animais passem e causem doenças nos humanos (Laver *et al.*, 1999).

2.1.2 Classificação

Os vírus da influenza tipos A, B e C, assim como o thogotovírus (conhecido também por vírus da influenza D) pertencem à família *Orthomyxoviridae* que se caracteriza por um genoma segmentado RNA fita simples (RNAfs) com polaridade negativa. Os vírus da influenza tipos A e B apresentam oito segmentos RNA, enquanto que os vírus da influenza tipo C, possuem um genoma com apenas sete segmentos RNA (Lamb & Krug, 2001). Estes três tipos de influenza são distinguidos sorologicamente com base nos antígenos da matriz (M) e da nucleoproteína (NP) de cada. Influenza C difere significativamente da A e B e é muito menos importante na infecção humana (Collier & Oxford, 1996).

As glicoproteínas superficiais nos vírus da influenza A (hemaglutinina e neuraminidase) exibem uma maior variabilidade na seqüência de aminoácidos do que os vírus da influenza B. No caso do tipo C, estes vírus apresentam uma única glicoproteína multifuncional (Lamb & Krug, 2001).

Os vírus da influenza A são divididos em subtipos de acordo com a natureza antigênica das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (Lamb & Krug, 2001), onde 15 subtipos distintos de HA e nove subtipos distintos de NA são atualmente conhecidos (Collier & Oxford, 1996; Hayden & Palese, 1997).

As amostras virais são denominadas de acordo com o tipo, localização do isolamento, o número do laboratório, o ano do isolamento e os subtipos de H e N (exemplo: A / Johannesburg / 33 / 94[H3N2]) (Collier & Oxford, 1996; Hayden & Palese, 1997).

2.1.3 Estrutura do Vírion

Os vírions da influenza A e B cultivados em ovos ou cultura de tecidos celulares possuem uma aparência bem regular na microscopia eletrônica, com partículas entre 80 a 120 nm de diâmetro (Lamb & Krug, 2001). Geralmente, os vírus da influenza são esféricos ou ovóides, mas formas filamentosas também podem ser encontradas (Dulbecco & Ginsberg, 1980). Amostras virais isoladas do homem ou de animais e propagadas por uma única passagem em cultura, exibem uma grande heterogeneidade e pleomorfismo (Lamb & Krug, 2001).

Os vírus da influenza apresentam um envelope lipídico e seus segmentos RNA (oito para influenza tipo A e B, sete para o tipo C) são independentemente envolvidos pela NP, formando estruturas helicoidais associadas com o complexo RNA polimerase dependente de RNA, representado pelas três proteínas PB1, PB2 e PA. A partícula subviral consistindo de RNA viral, NP e complexo polimerase é denominada ribonucleoproteína (RNP) (Lamb & Krug, 2001; Han, 2002).

As partículas RNPs são circundadas pela proteína M1 que se encontra localizada abaixo da membrana lipídica viral (Manuguerra & Hannoun, 1999). Esta membrana lipídica é derivada da membrana plasmática da célula infectada, durante o processo de brotamento e se encontra coberta por projeções de glicoproteínas virais, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Um número pequeno de moléculas de proteína M2 também se encontra na membrana da partícula viral (Hayden & Palese, 1997; Manuguerra & Hannoun, 1999) (Figura 1).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

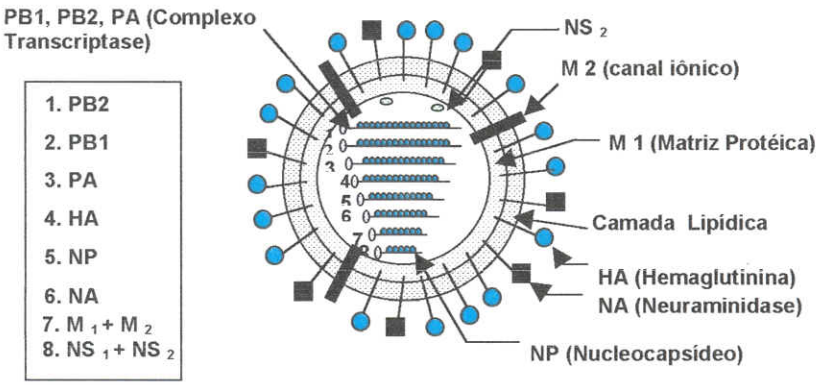


Figura 1. Estrutura do vírus da influenza A (adaptado de Lamb & Krug, 2001).

2.1.4 Organização do Genoma e Proteínas Codificantes

O vírus da influenza A apresenta um genoma composto por oito segmentos RNAfs, onde o segmento 1 codifica para PB2, o 2 para PB1, o 3 para PA, o 4 para HA, o 5 para NP, o 6 para NA, o 7 para M1 e M2 e o segmento 8 para NS (Lamb & Krug, 2001) (Quadro 1).

Quadro 1. Segmentos genômicos do vírus da influenza A e distribuição das características genéticas.

SEGMENTO	NUCLEOTÍDEOS *	POLIPEPTÍDEO CODIFICADO	FUNÇÕES
1	2341	PB2	Reconhece m^7GpppX^m N^m ("cap") do RNA da célula hospedeira; componente do complexo transcriptase de RNA.
2	2341	PB1	Atividade de endonuclease; catalisa a adição de nucleotídeo; componente do complexo transcriptase de RNA e do complexo de replicação.
3	2233	PA	Componente do complexo transcriptase de RNA e do complexo de replicação; função desconhecida.
4	1778	HA	Glicoproteína principal da superfície; receptor (ácido siálico) de ligação; ativação proteolítica de clivagem; pH ácido induz mudanças conformacionais e atividade de fusão; principal determinante antigênico.
5	1565	NP	Monômero que se liga ao RNA para formar RNP; envolvido na permuta de mRNA para RNA molde ("template") e na síntese do RNA do vírion.
6	1413	NA	Glicoproteína de superfície; atividade de neuraminidase; determinante antigênico.
7	1027	M1	Proteína do vírion, localizada abaixo da membrana lipídica; interage com RNPs e NS2.
		M2	Canal iônico essencial para o desnudamento viral; canal inibido pela amantidina.
8	890	NS1	Proteina não-estrutural no citoplasma e no núcleo; inibe a clivagem do terminal 3' do pre-mRNA celular e poliadenilação; inibe a divisão do pre-mRNA; sequestra RNAfd da quinase PKR, reduzindo a resposta do interferon.
		NS2	Menor componente dos vírions; localização citoplasmática e nuclear; interage com M1 e está envolvido na exportação nuclear dos RNPs.

* Número de nucleotídeos baseados na cepa A/PR/8/34 (Adaptado de Lamb & Krug, 2001).

2.1.4.1 As Proteínas Polimerases: PB1, PB2 e PA

O três maiores segmentos genômicos do vírus da influenza codificam para as proteínas PB1, PB2 e PA, que recebem esta denominação por causa das propriedades básica (PB1 e PB2) ou ácida (PA) em géis de focalizaçãoisoelétrico (Lamb & Krug, 2001).

As três proteínas em questão (proteínas P) formam em conjunto um complexo no citoplasma e núcleo celular que é extremamente resistente à dissociação por tampões normais de imunoprecipitação. Após a síntese no citoplasma, as proteínas P são transportadas para o núcleo, possivelmente como complexo (Lamb & Krug, 2001). São responsáveis pela transcrição do RNA mensageiro (mRNA), pela síntese do RNA molde ("template") antigenômico de sentido positivo (cRNA) e pela transcrição dos cRNAs em segmentos genômicos (RNA viral) que são incorporadas à progenie viral (Steinhauer & Skehel, 2002).

2.1.4.2 A Proteína Hemaglutinina: HA

O segmento 4 codifica para a glicoproteína hemaglutinina (HA) (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002) que é uma projeção trimérica com forma de haste, apresentando um terminal carboxi-hidrofóbico ancorado no envelope viral e um terminal hidrofílico projetando-se para fora do vírus. A porção exposta contém sítios antigênicos e sítios de ligação para resíduos de ácidos siálico em receptores das células hospedeiras ou eritrócitos (Hayden & Palese, 1997).

A HA facilita tanto a ligação do vírus ao receptor da célula do hospedeiro, quanto à penetração do vírus. É essencial que a HA seja clivada em duas moléculas HA1 e HA2, por uma protease, para que o vírion seja infectante. A porção HA2 parece ser responsável pela fusão do envelope viral e da membrana celular, enquanto que a porção HA1 contém o sítio de ligação para os receptores da célula hospedeira (Hayden & Palese, 1997). O sítio de ligação de HA é uma depressão localizada em cada subunidade, na porção distal-terminal da molécula. A depressão é inacessível ao anticorpo e os resíduos que formam a depressão são amplamente conservados entre os subtipos (Lamb & Krug, 2001).

A configuração de HA e sua função são conservadas durante a evolução viral, mas substituições freqüentes de aminoácidos ocorrem nos sítios antigênicos (Hayden & Palese, 1997), tendo sido mapeados cinco sítios antigênicos na estrutura tridimensional de HA (Lamb & Krug, 2001). Anticorpos monoclonais para cada um dos cinco sítios antigênicos neutralizam a infectividade do vírus (Hayden & Palese, 1997; Lamb & Krug, 2001).

2.1.4.3 A Proteína do Nucleocapsídeo: NP

A nucleoproteína (NP) é o produto do quinto segmento do vírus da influenza, rica em resíduos de argenina. Após a síntese no citoplasma, as moléculas de NP são transportadas para o núcleo, sendo esta uma propriedade intrínseca da proteína (Lamb & Krug, 2001). Esta proteína encapsula os cRNAs e RNAs virais, o que é necessário para que sejam reconhecidos como moldes para a polimerase viral (Steinhauer & Skehel, 2002).

Numa etapa mais tardia da infecção viral, a NP da influenza A é clivada por uma enzima celular (caspase), mas não se sabe se este fenômeno funciona como um marcador para o início da apoptose em células infectadas ou se tem uma função específica na interação vírus-hospedeiro (Lamb & Krug, 2001).

2.1.4.4 A Neuraminidase: NA

A neuraminidase (NA), codificada pelo segmento 6 da influenza A, é uma glicoproteína que apresenta uma conformação tetrâmera, semelhante ao cogumelo, estando ancorada no envelope lipídico pela terminação amino (Collier & Oxford, 1996).

Diversos conceitos têm sido propostos para o papel da NA na replicação viral. Desta forma, esta enzima pode facilitar o acesso viral às células epiteliais pela degradação dos mucos no trato respiratório. Além disto, também tem demonstrado promover atividade hemaglutinante, através da remoção dos ácidos siálicos dos oligossacarídeos próximos ao receptor de ligação de HA. Finalmente, a partir de diversos estudos empregando anticorpos específicos para NA, inibidores de NA e mutantes com NA defeituosos, tem sido concluído que NA promove a liberação do vírus de células infectadas e previne a auto-agregação mediada pela HA (Wagner, *et al.*, 2002).

2.1.4.5 A Matriz Protéica: M

O segmento 7 do vírus da influenza A codifica para duas proteínas, a matriz protéica (M1), polipeptídeo mais abundante no vírion e a proteína M2 que é o componente minoritário do vírion (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002).

O mRNA M1 é uma transcrição colinear e o produto (M1) tem papel estrutural no vírion, assim como acredita-se representar um papel fundamental na agregação viral. No caso da M2, é uma proteína transmembrana derivada do processamento do mRNA e que funciona como canal iônico, permitndo o fluxo de prótons para dentro do vírion (Neumann & Kawaoka, 2002).

2.1.4.6 A Proteína não estrutural: NS

O segmento 8 do vírus da influenza A codifica para duas proteínas oriundas de uma divisão alternativa (Lamb & Krug, 2001), sendo estas originalmente referidas como NS1 e NS2 porque se acreditava serem não-estruturais. No entanto, NS2 tem demonstrado ser um componente do vírion. A NS1 apresenta diversas funções, tais como a de um regulador do processamento do mRNA e da tradução, além de também representar um papel na modulação das respostas do interferon à infecção viral (Schultz-Cherry *et al.*, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002). A NS2 funciona em mediar a exportação de novos RNPs sintetizados do núcleo e portanto é referida como a proteína de exportação nuclear (NEP, "nuclear export protein") (Steinhauer & Skehel, 2002).

2.1.5 Estádios da Replicação

A replicação viral inicia-se com a entrada do vírus na célula hospedeira através da endocitose mediada por receptor. Após a fusão do endosoma e das membranas virais, os RNPs são liberados no citoplasma e então transportados para o núcleo para a replicação viral. (Whittaker, 2001; Portela & Digard, 2002). Em seqüência à replicação, os RNPs virais deixam o núcleo e direcionam-se para a membrana plasmática, onde serão associados às glicoproteínas virais antes do brotamento e liberação (Whittaker, 2001).

2.1.5.1 Adsorção, Entrada e Desnudamento

Os vírus da influenza ligam-se a uma região específica que contém ácido 5-*N*-acetil neuramínico (ácido siálico) na superfície das células hospedeiras, contudo, em suínos e eqüinos, ácidos *N*-glicolil neuramínico podem ser usados. A ligação ao ácido siálico ocorre através de uma depressão superficial na porção distal, final da glicoproteína HA. Também se tem conhecimento que vírus da influenza eqüina e aviária ligam-se preferencialmente ao terminal dos ácidos siálicos contendo conexões α-(2,3), enquanto os vírus humanos ligam-se às conexões α-(2,6) (Zambon, 2001). Nos suínos, ambas as conexões ocorrem na traquéia, determinando a habilidade destes animais em serem infectados por amostras aviárias e humanas (Whittaker, 2001).

Na seqüência à interação do vírus ao receptor na superfície celular, este é rapidamente internalizado (endocitose) em vesículas formadas pela invaginação da membrana plasmática. Após a internalização, as vesículas se fundem ao endosoma, onde o vírus seguirá via endocítica e no final, através da acidificação do endosoma atingirá um compartimento com pH baixo, aproximadamente 5,5. O desnudamento dos vírions da influenza nos

BIBLIOTECA ESCOLA VETERINARIA UFMG

endosomas é dependente do pH ácido. Conseqüentemente, neste estádio, o mecanismo viral de fusão é desencadeado, levando à liberação dos componentes do interior do vírus (M1 e RNPs) no citoplasma (Lamb & Krug, 2001; Whittaker, 2001).

O canal iônico M2 no envelope viral permite que os componentes no interior do vírus fiquem expostos ao baixo pH do endosoma. Esta exposição ao pH baixo é necessária tanto *in vitro* quanto *in vivo* para que as interações M1-RNP sejam interrompidas e desnude o vírus (Whittaker, 2001).

Embora a acidificação dos RNPs não seja requerida para a importação nuclear, é necessária para o desnudamento completo dos complexos M1-RNP viral, pois caso contrário seriam grande demais para passarem através do complexo de poros nucleares. A importação de RNPs virais ocorre através destes poros nucleares e é mediada pelo sinal de localização nuclear nas NPs (Whittaker, 2001).

2.1.5.2 Síntese do mRNA e Replicação do RNA viral

Os vírus da influenza são um dos poucos vírus RNA que fazem a replicação e transcrição no núcleo das células hospedeiras (Whittaker, 2001; Steinhauer & Skehel,2002). No núcleo, os RNPs virais servem como modelo para a produção de duas formas de RNA de sentido positivo: mRNA viral e RNA complementar (cRNA) (Whittaker, 2001) (Figura 2).

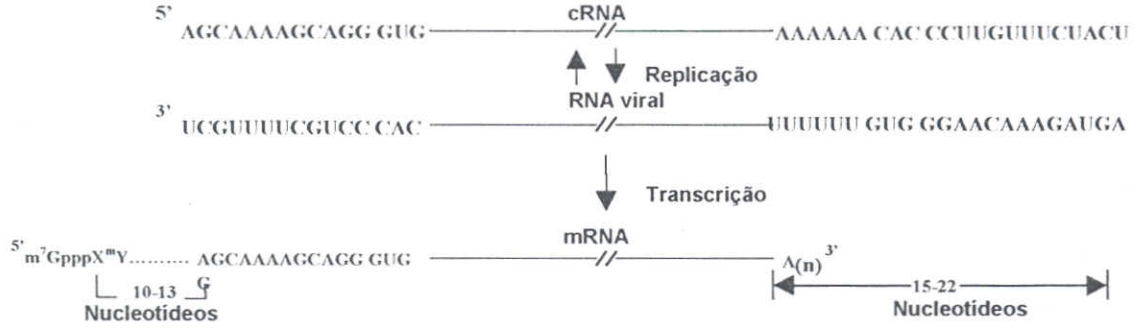


Figura 2. Transcrição e replicação dos RNAs do vírus da influenza (adaptado de Hayden & Palese, 1997; Lamb & Krug, 2001).

A síntese do mRNA dos vírus da Influenza é dependente da função nuclear da célula hospedeira. Uma endonuclease cap-dependente que é intrínseca à polimerase do vírus da influenza, cliva 10 a 13 nucleotídeos do terminal 5' dos RNAs "capped" da célula hospedeira. Os fragmentos de RNAs "capped" (contendo m^7GpppX^m), oriundos da clivagem dos transcritos da RNA polimerase II da célula hospedeira, servem como iniciadores para a síntese do mRNA viral (Lamb & Krug, 2001).

A síntese do mRNA é catalizada pela RNA polimerase dependente de RNA composta por PB1, PB2 e PA, que existe na forma de um complexo, fazendo parte do complexo RNP viral. A proteína PB2 reconhece e liga-se ao "cap" do RNA iniciador e PB1 cataliza a adição de nucleotídeos. No que se refere à PA, ainda não foi encontrada uma função específica desta proteína na síntese do mRNA (Lamb & Krug, 2001).

Após pareamento com os fragmentos de RNA 5' "capped", derivados da célula hospedeira, as cadeias de mRNA são alongadas, copiando o modelo até o ponto em que o trecho de resíduos de uridina é atingido, 15 a 22 nucleotídeos antes do terminal 5' dos RNAs virais. Neste trecho de uridina, nos segmentos de RNA viral, a transcrição termina e resíduos de poliadenilização (poli-A) são adicionados aos mRNAs (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002) (Figura 3).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

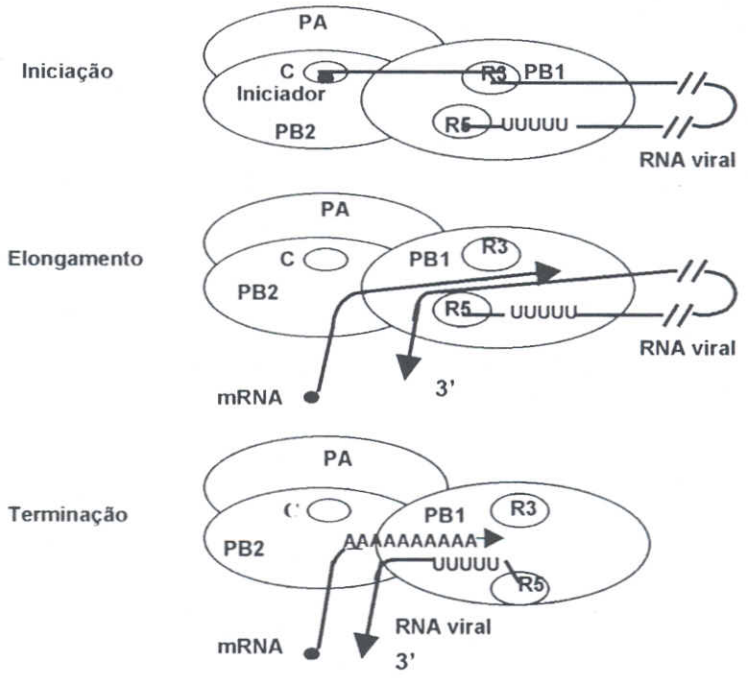


Figura 3. Modelo da síntese do mRNA catalizada pelo complexo RNA polimerase dependente de RNA. A ligação específica do terminal 5' à subunidade PB1 da polimerase persiste durante a síntese do mRNA, para que o RNA viral seja associado ao complexo polimerase, na direção 3' para 5' durante a síntese do mRNA. R3 e R5 são os sítios de PB1 onde os terminais 3' e 5' do RNA viral se ligam. Como conseqüência da ligação de ambos os terminais dos RNAs, a própria polimerase age como uma barreira para a continuidade da síntese do mRNA, seguida da terminação (adaptado de Lamb & Krug, 2001).

No caso da replicação, para que esta ocorra, é requisitado um tipo diferente de transcrição que resulta na produção de cópias do comprimento total dos RNAs virais (RNAs moldes). O início deste processo não requer iniciador e nem término com o sítio de poli-A. O segundo passo na replicação é a cópia dos RNAs moldes em RNAs virais, não sendo também necessário o iniciador. Os três RNAs do vírus, mRNA, RNAs moldes e RNAs virais, são todos sintetizados no núcleo (Lamb & Krug, 2001).

A exportação nuclear do mRNA viral utiliza o mecanismo da célula hospedeira, mas é seletivo, onde a exportação é controlada pela proteína não estrutural NS1. No citoplasma, os mRNAs virais são traduzidos em proteínas virais e, no caso de NP, M1, NS2 e as polimerases, estes são importados para o núcleo para os estágios finais da replicação e para a reunião dos RNPs virais (Whittaker, 2001).

2.1.5.3 Processamento Pós-Transcrição

A maioria dos pre-mRNA em eucariotas mais evoluídos, contém introns que devem ser precisamente removidos para gerar mRNAs funcionais. Os vírus da influenza exploram este mecanismo nuclear da célula hospedeira, que processa pre-mRNAs celulares, para a obtenção de mRNAs NS1 e M1 em formas de mRNAs menores: NS2 e M2, respectivamente. Tanto os mRNAs virais processados e não processados são exportados para o citoplasma (Lamb & Krug, 2001).

2.1.5.4 Mecanismos de Controle da Tradução

Os dois principais mecanismos de controle da tradução no vírus da influenza A são a supressão do bloqueio induzido pelo interferon (IFN) contra a síntese de proteínas e a interrupção da tradução de mRNAs celulares (Lamb & Krug, 2001).

No primeiro mecanismo, caso não houvesse um sistema estabelecido de escape viral, a tradução em células infectadas pelo vírus da influenza acabaria sendo inibida pela produção de RNA fita dupla (RNAfd). O potencial de formação de RNAs fita dupla se deve à presença dos RNAs de sentido positivo e negativo sintetizados no núcleo durante a infecção. Os RNAs fita dupla poderiam ativar a proteína quinase celular PKR ("Protein Kinase R"), assim como induzir o IFN que por sua vez, também induziria à síntese de PKR. PKR levaria à interrupção da síntese protéica através da fosforilação da subunidade α do fator de iniciação eIF-2. Conseqüentemente, o vírus da influenza contém um mecanismo de ataque à PKR, onde NS1 liga-se e seqüestra moléculas de RNAfd para bloquear a ação da PKR, assim como uma proteína celular que inibe PKR é ativada em células infectadas pelo vírus da influenza (Lamb & Krug, 2001).

No caso do mecanismo onde os mRNAs virais são seletivamente traduzidos, em detrimento dos RNAs celulares, este ainda é pouco conhecido. Provavelmente a inibição parcial e não completa da ativação e atividade de PKR, a possibilidade de que um ou mais fatores de iniciação de proteína celular tenha sido modificado na infecção pelo vírus da influenza, podem estar envolvidos ao favorecimento da tradução dos mRNAs virais (Lamb & Krug, 2001).

2.1.5.5 Empacotamento do Genoma durante a Agregação viral

A produção de uma partícula infecciosa do vírus da influenza requer incorporação de pelo menos uma cópia dos oito segmentos genômicos (Lamb & Krug, 2001). Na teoria, o número de possíveis vírus produzidos por rearranjos genéticos, contendo oito segmentos, é de 256, mas na prática isto não é observado. Apesar de existirem inúmeros exemplos onde segmentos genômicos específicos são segregados randomicamente como um resultado de uma infecção mista, imposições de limitações estruturais ou funcionais aos produtos genômicos poucas vezes resultam na co-segregação de dois ou mais segmentos (Steinhauer & Skehel, 2002).

No caso do vírus da influenza, partículas contendo mais de oito segmentos de RNA e menos do que oito segmentos de RNA têm sido obtidas constantemente em empacotamentos randômicos. Contudo, a interferência específica com o empacotamento do segmento 1 de RNA do tipo selvagem, mas não de nenhum outro segmento, através de uma deleção defeituosa interna ao segmento 1, promove de forma efetiva a possibilidade de um mecanismo específico de empacotamento, pelo menos para o segmento 1 (Lamb & Krug, 2001).

Diversos estudos genéticos têm indicado que uma cooperação funcional existe entre as proteínas virais, tais como no complexo polimerase, NP e M e entre HA e NA. No entanto, ainda permanece a questão de como os segmentos genômicos do vírus da influenza são incorporados ao vírion. Hipóteses como a do empacotamento randômico dos segmentos genômicos ou da existência de sinais definidos de empacotamento para uma seleção são as que predominam (Steinhauer & Skehel, 2002).

No que se refere à fase de agregação do vírus na membrana plasmática, compreende-se que é essencial que todos os componentes virais sejam levados ao local físico correto na célula para serem processados de forma adequada. A proteína M1 é central nesta interação, onde as moléculas de M1 irão ligar-se aos RNPs virais, à membrana plasmática e a outras moléculas de M1 para formar um envoltório abaixo do envelope viral. É possível que a ligação de M1 às membranas *in vivo* apoia-se numa combinação de interações

hidrofóbica e eletrostática, assim como as interações de proteínas específicas com as proteínas de envelope (Whittaker, 2001).

Nas células epiteliais polarizadas, o brotamento das partículas do vírus da influenza ocorre exclusivamente na superfície apical. Todas as proteínas de envelope quando expressas individualmente em sistemas heterólogos são transportadas à superfície apical em células polarizadas. Portanto, o transporte apical é uma propriedade intrínseca destas proteínas (Lamb & Krug, 2001; Whittaker, 2001).

2.1.5.6 Brotamento e Liberação viral

Na etapa final do brotamento, foi demonstrado recentemente que os componentes virais encontram-se em regiões específicas da membrana plasmática, que são conhecidas por domínios ricos em glicolipídeos insolúveis em detergentes (DIGs, "detergent insoluble glycolipid-enriched domains"). Estes DIGs são sub-compartimentos especializados da membrana onde os vírus brotam. A formação dos vírus nestes sítios parece apoiar-se na presença da projeção citoplasmática de HA e NA. Estas glicoproteínas, junto com M1, M2 e fatores das células hospedeiras (o citoesqueleto de actina e a natureza polarizada da célula) parecem controlar a morfologia viral e desta forma, determinar a natureza esférica ou filamentosa das partículas resultantes. No conjunto, a fase de agregação viral provavelmente envolve inicialmente a interação de M1 com as membranas, seguida pelas interações específicas das projeções citoplasmáticas de HA e NA em DIGs especializados (Whittaker, 2001).

A liberação final dos vírus a partir da superfície celular está associada à ação da NA viral. NA age como uma enzima de destruição de receptor, através da remoção do ácido siálico da superfície celular. Caso isto não ocorresse, as partículas virais recém formadas imediatamente se religariam ao receptor ácido siálico e não seriam liberadas no espaço extracelular. No entanto, o que realmente ocorre é que estas partículas permanecem associadas às células em grandes agregados. NA é portanto, importante para a liberação eficiente dos vírus (Whittaker, 2001).

O estabelecimento de uma infecção produtiva é dependente de NA e HA. Os resíduos de carboidrato circundando os sítios de HA de ligação de receptores são conhecidos por modularem a afinidade de interação com o ácido siálico. Desta forma, embora o aumento na afinidade de HA pelo ácido siálico possa aumentar a infecção, pode também neutralizar a atividade de destruição de receptor de NA, conseqüentemente reduzindo a liberação viral da superfície celular. Portanto, a liberação viral requer um delicado equilíbrio entre as funções destas duas glicoproteínas (Whittaker, 2001).

2.1.6 Genética dos vírus da influenza

Em adição à produção de uma grande quantidade de material, de caráter evolutivo (mutações), os vírus RNA também possuem mecanismos que em princípio os permite expurgar do genoma o acúmulo de alterações por deleção e de criar ou disseminar de forma eficiente combinações benéficas de mutações (Worobey & Holmes, 1999).

Dois tipos distintos, mas não mutuamente exclusivos de trocas genéticas em vírus RNA, são o rearranjo genético ("reassortment") e a recombinação. O primeiro ocorre somente em vírus segmentado, enquanto que o segundo, ocorre tanto em vírus segmentado ou não (Worobey & Holmes, 1999).

2.1.6.1 Mecanismos de Escape: deslocamento antigênico e mudança antigênica

Os vírus da influenza A têm sido isolados de humanos desde o seu isolamento em 1933. A cada novo isolamento, testes sorológicos com antisoro para todas as outras amostras virais conhecidas da influenza eram realizados. Logo, ficou evidente que os isolamentos mais recentes apresentavam antígenos de HA e NA um pouco diferentes das amostras anteriores (Dimmock &

Primrose, 1998). Em seguida, foi verificado que as amostras "mais antigas" não se encontravam mais presentes e que somente a nova amostra podia ser isolada. Este fenômeno passou a ser conhecido por deslocamento antigênico ("antigenic drift") (Collier & Oxford, 1996; Dimmock & Primrose, 1998).

O deslocamento antigênico basea-se na suposição de que na natureza amostras virais da influenza carregam novos determinantes antigênicos resultantes da seleção natural de mutantes, presentes na população atual do vírus da influenza humana (Dimmock & Primrose, 1998). Quando amostras antigenicamente novas são introduzidas em humanos, estas rapidamente e continuamente desenvolvem-se, possivelmente devido a uma seleção imune e a vários fatores que podem estar associados à adaptação a um novo hospedeiro (Steinhauer & Skehel, 2002).

As glicoproteínas em particular, exibem rápidos índices de evolução. No caso de HA, os índices de evolução aproximam-se de $6,7x10^{-3}$ substituições por nucleotídeo por ano, sendo estas na maioria no domínio de HA1. No que se refere à NA, os índices de evolução são de $3,2x10^{-3}$ substituições por nucleotídeo por ano. Diante destes dados, o deslocamento genético das glicoproteínas necessita de constante vigilância, com monitoração da antigenicidade das amostras circulantes para que as vacinas possam ser atualizadas quando necessário (Steinhauer & Skehel, 2002).

A continuidade dos estudos a partir do exame de cepas isoladas após um período de 50 anos, evidenciou que a evolução do vírus da influenza A não estava associado exclusivamente ao deslocamento antigênico, mas sim entrecortada por misteriosas aparições de novos subtipos, onde um HA ou NA ou ambos não apresentavam qualquer relação com os dos anos anteriores. Tal fato ficou conhecido por mudança antigênica ("antigenic shift"). Em contraste, influenza tipo B sofre somente o deslocamento antigênico (Collier & Oxford, 1996; Dimmock & Primrose, 1998).

Sorologicamente, 15 subtipos de HA e nove de NA têm sido identificados. Todos estes ocorrem em vírus que circulam em aves aquáticas, que servem como reservatório natural para todos os vírus da influenza A (Steinhauer & Skehel, 2002).

As epidemias são prováveis de ocorrerem quando uma variante viral surge, apresentando alterações antigênicas das amostras anteriores e reação cruzada de anticorpos, adquirida por infecção prévia. O monitoramento da variação antigênica no vírus da influenza é o fator chave para antecipar as epidemias e no desenvolvimento de vacinas, onde a cada ano a cepa viral prevalente deve ser incorporada. A responsabilidade em monitorar a variação viral apoia-se na Organização Mundial de Saúde que alem disto, também verifica a incidência e disseminação da infecção (Potter, 2001).

No caso das pandemias, duas condições têm que ser satisfeitas para um surto de influenza ser classificado como pandêmico. Primeiro, o surto infeccioso, emergente numa área geográfica específica, dissemina-se pelo mundo, onde uma alta percentagem de indivíduos é infectada, resultando num elevado índice de letalidade. Segundo, uma pandemia é causada por um novo subtipo do vírus da influenza A, onde a HA não é relacionada as dos vírus da influenza que circularam previamente ao surto e não poderia ter surgido destes vírus por mutação (Potter, 2001).

Até recentemente, somente os vírus H2N2 e H3N2 eram conhecidos por terem circulados em humanos. Em 1918-1919, os vírus H1N1 foram responsáveis pela pandemia da Gripe Espanhola, tendo sido o pior surto de doença infecciosa na história humana. As amostras relacionadas aos vírus de 1918 continuaram a circular em humanos até 1957, quando foram substituídas pela cepa asiática, subtipo H2N2, resultando numa nova pandemia. Em 1968, outro mudança antigênica ocorreu com o surgimento do subtipo H3N2, da Gripe de Hong Kong. Neste caso, HA e não NA, era antigenicamente novo aos humanos (Steinhauer & Skehel, 2002) (Figura 4).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

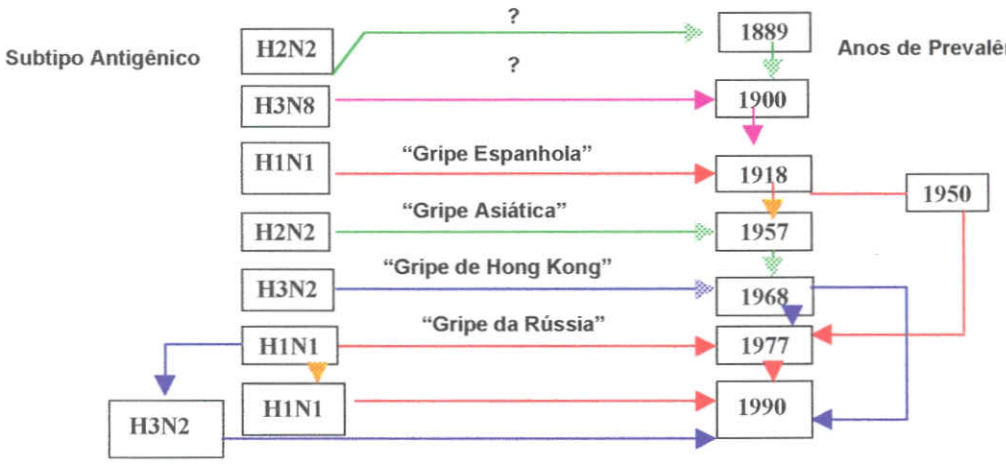


Figura 4. Evolução dos vírus da influenza tipo A, circulando em humanos (adaptado de Collier & Oxford, 1996; Wright & Webster, 2001).

Descendentes destes vírus H3N2 continuaram a circular e em 1977, um vírus com subtipo H1N1, virtualmente idêntico às amostras que previamente circularam em 1950 (re-emergente em humanos), surgiu sem substituir a amostra viral H3N2. Durante os últimos 25 anos, H3N2 e H1N1 têm co-circulado em humanos (Figura 4). Tal fato tem fornecido a oportunidade para que estes diferentes subtipos virais sofram um rearranjo entre si, levando ao isolamento nos últimos anos do subtipo H1N2 em humanos (Steinhauer & Skehel, 2002).

Estas mudanças antigênicas apresentam uma série de características em comum, tais como o súbito aparecimento, a ocorrência inicial na China, a distinta antigenicidade em comparação às cepas dos vírus da Influenza em circulação e o fato de estarem confinados aos subtipos H1, H2 e H3 (Lamb & Krug, 2001).

Contudo, diante da possibilidade dos vírus da influenza aviária serem transmitidos diretamente a humanos, ocorrências como em 1997, quando o subtipo H5N1 atingiu 18 pessoas em Hong Kong, contribuindo para a morte de seis (Laver *et al.*, 1999; Wright & Webster, 2001), em 1999, com o subtipo H9N2 (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002) e atualmente, o caso de uma família de Hong Kong que após visitar o sul da China, teve o filho de nove anos confirmado positivo para o vírus da influenza aviária (H5N1), além do pai que faleceu e posteriormente também foi confirmado positivo (O Globo, 2003a; O Globo, 2003b) foram inicialmente descritas em humanos, confirmando este potencial.

A cautela e os cuidados dos especialistas são mais do que justificáveis, pois caso um vírus tão mortal, como a amostra viral de Hong Kong, atinga as comunidades mundiais, 30% das população terrestre poderá ser considerada morta, em conseqüência da ação do próprio vírus ou pelas infecções bacterianas secundárias, antes que a vacina esteja viável para proteger aqueles que inicialmente escaparam da infecção. Vacinas contra qualquer variante da influenza leva seis meses para ser produzida, testada e distribuída, o que caracteriza tempo demais para enfrentar uma pandemia (Laver *et al.*, 1999).

2.1.6.2 Rearranjo dos segmentos RNA

Os vírus da influenza tipo A, B e C podem formar rearranjos genéticos *in vivo* entre os membros do mesmo tipo viral, mas não entre tipos (Lamb & Krug, 2001). As novas amostras pandêmicas emergentes são geralmente resultados deste rearranjo, que

se caracteriza pela permuta de uma ou mais moléculas de RNA do genoma segmentado (Worobey & Holmes, 1999). A conseqüência disto é o aparecimento de um novo subtipo contendo um novo HA ou NA que é imunologicamente distinto das amostras circulantes previamente (mudança antigênica) (Lamb & Krug, 2001).

O aparecimento de um novo subtipo viral ocorre paralelamente ao desaparecimento do subtipo anterior, sendo pouco provável que a dupla infecção, que originou este rearranjo genético, tenha sido realizada por dois subtipos de influenza humana A (wysiwyg://46/http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/Influenza.htm). Estas amostras híbridas, conseqüentemente apresentam a habilidade de se disseminarem naturalmente a partir de animais infectados para os susceptíveis, ou seja, uma propriedade essencial na evolução de uma nova amostra viral (Slemons & Brugh, 1994; Dimmock & Primrose, 1998).

Vírus que podem ter origem no rearranjo genético entre amostras humanas e de animais (ex.: HA de um animal e NA de uma cepa humana) ou animal e animal, têm sido isolados na natureza. Um destes foi encontrado nas focas da zona portuária, na costa do Maine, EUA, ou seja, uma animal ainda não conhecido como passível de ser infectado pelo vírus da Influenza. O vírus, neste caso, causou uma mortalidade de 20%, leve lembrança da pandemia humana em 1918 que matou mais de 20 milhões de pessoas distribuídas mundialmente (Slemons & Brugh, 1994; Dimmock & Primrose, 1998).

Teoricamente, pode-se esperar que *in vivo*, os oito segmentos de RNA do vírus da influenza A possibilitem a formação de 256 rearranjos genéticos. Contudo, uma segregação randômica não ocorre porque algumas proteínas virais aparentemente necessitam combinar-se com uma proteína, amostra-específica (Lamb & Krug, 2001).

2.1.6.3 Mutações no RNA

Pequenas alterações no caráter antigênico dos vírus da influenza ocorrem como resultados do acúmulo de alterações de aminoácidos devido às mutações. As alterações mais importantes são na HA e na NA. Este processo, conhecido também por deslocamento antigênico, ocorre em vírus da influenza A, B e C, sendo que o tipo A apresenta um número mais elevado de substituições acumulando num padrão seqüencial de tempo (Lamb & Krug, 2001).

Influenza, assim como outros vírus RNA, apresenta uma taxa alta de mutações devido à natureza em predispor erros na polimerase viral, portanto, vírus mutantes são facilmente isolados. Conseqüentemente, diversos estudos têm sido realizados em variantes de ocorrência natural, mutantes espontâneos de laboratório, mutantes induzidos quimicamente ou fisicamente e mutantes selecionados para um fenotipo particular, como hospedeiros, resistência à drogas ou antigenicidade (Steinhauer & Skehel, 2002).

2.1.6.4 Recombinação de RNA

A recombinação de RNA ocorre quando uma seqüência nucleotídica de um "doador" é introduzida numa única, contígua molécula de RNA "receptora", para produzir um novo RNA contendo informação genética de mais de uma fonte (Worobey & Holmes, 1999). Este processo é realizado através dos mecanismos de reação cruzada ou "copy-choice" (Lamb & Krug, 2001).

No caso do vírus da influenza tem sido documentado poucos casos de Recombinação de RNA verdadeira, ao contrário do que ocorre no caso dos rearranjos genéticos (Steinhauer & Skehel,2002). Em alguns casos de Recombinação de RNA viral, a seqüência do doador nitidamente repõe uma região homóloga da seqüência do receptor, ou seja, uma recombinação homóloga. No entanto, isto não é sempre o que ocorre, pois seqüências híbridas resultantes de recombinações homólogas aberrantes, assim como recombinações não homólogas

podem ser observadas (Worobey & Holmes, 1999).

Diversos exemplos de recombinações de RNA têm sido verificados em literatura, tais como: vírus usando recombinação não homóloga para adquirir traços patogênicos relacionados à clivagem de HA, que é requerida para ativar o potencial de fusão da membrana (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002), assim como experimentos laboratoriais aplicando a genética reversa para obtenção de vírus (Steinhauer & Skehel, 2002).

2.1.7 Patogênese

No caso de algumas cepas aviárias com subtipos virais H5 e H7, as propriedades de clivagem apresentadas pela HA são os determinantes mais notáveis da patogenicidade viral (Zambon, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002). Contudo, é também claro que vários, se não todos os oito segmentos genômicos, podem contribuir para o fenótipo patogênico do vírus da influenza, levando-se em consideração o histórico genético do vírus, o hospedeiro e a via de infecção (Steinhauer & Skehel, 2002).

2.1.7.1 Fator determinante da patogenicidade: clivagem de HA

A HA é sintetizada como um polipeptídeo precursor que deve ser clivado em subunidades interligadas HA1 e HA2 para que a função de fusão da membrana seja ativada, assim como a infectividade viral (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002). No caso das HAs dos vírus da influenza A de mamíferos e da maioria das aves, esta etapa de ativação da clivagem ocorre somente após a glicoproteína ter sido transportada para a membrana plasmática. Este fato restringe os sítios de replicação, em animais infectados, a órgãos ou tecidos onde proteases extracelulares estão presentes. Entretanto, existem exemplos de cepas aviárias altamente patogênicas, como os subtipos virais H5 e H7, que podem causar infecções sistêmicas em hospedeiros, como galinhas e perus (Steinhauer & Skehel, 2002).

Na HA precursora, o sítio de clivagem existe como uma estrutura em "loop" que estende-se para fora da superfície da molécula. Nos vírus não patogênicos, a HA geralmente contém um único resíduo de arginina no sítio de clivagem e não são clivados quando se replicam em tecidos de culturas de células. No entanto, estes HAs podem ser clivados pela adição de tripsina exógena (Lamb & Krug, 2001; Steinhauer & Skehel, 2002). As HAs dos vírus altamente patogênicos são caracterizadas pela inserção de resíduos básicos adicionais no sítio de clivagem (sítios multibásicos). As HAs que contém a seqüência R-X-K/R-R no peptídeo de conexão são clivados intracelularmente pela furin, uma protease encontrada no aparato de Golgi (Lamb & Krug, 2001). Os subtipos H5 e H7, altamente patogênicos, são clivados intracelularmente por proteases como furin ou PC6 (Steinhauer & Skehel, 2002).

A proposta de que o sítio de clivagem estaria correlacionado com a virulência do vírus e que as amostras virulentas conteriam a porção de reconhecimento da furin (protease), enquanto que as amostras avirulentas conteriam um único resíduo de arginina, encontrou suporte experimental, a partir dos estudos com vírus da influenza aviária. No entanto, existe uma complexidade nesta simples correlação, onde algumas amostras da influenza H5 avirulentas apresentam o sítio de reconhecimento de furin. Esta amostra H5 avirulenta apresenta uma cadeia de oligossacarídeo, posicionada próximo ao sítio de clivagem, o que se acredita alterar o acesso da protease, enquanto que as amostras H5 virulentas não possuem este oligossacarídeo (Lamb & Krug, 2001).

2.1.7.2 Natureza multifatorial da patogenicidade

A patogenicidade na influenza aviária basicamente correlaciona-se com a estrutura da HA, mas em mamíferos, muitos outros fatores podem estar envolvidos. Análises genéticas de tecidos pulmonares

de um jovem soldado que morreu de influenza em 1918 indicaram que o vírus H1N1 (1918), altamente patogênico, não possuía um sítio de clivagem multibásico no HA. Este achado, assim como por exemplo a constatação que os vírus H5N1 isolados de humanos, na seqüência ao surto de 1997 em Hong Kong, possuíam uma relação próxima dos aminoácidos básicos no sítio de clivagem de HA, mas diferiam na patogenicidade, indicaram que outros genes poderiam estar contribuindo para a patogenicidade da influenza (Zambon, 2001).

O vírus da influenza humana A/WSN/33 (H1N1) é considerado um descendente da amostra responsável pela pandemia de 1918. A amostra A/WSN/33, neurotrópica e altamente patogênica foi oriunda de A/WS/33 através de passagens repetidas em cérebro de camundongo (Zambon, 2001). Trata-se da única amostra viral da influenza humana que pode replicar numa variedade de cultura de células sem a adição de protease exógena (tripsina). A ausência de um sítio de clivagem polibásico sugere um mecanismo único para o sítio de clivagem de HA nesta amostra, provavelmente envolvendo NA. A NA desta amostra viral, liga-se e seqüestra o plasminogênio, precursor da protease responsável pela clivagem de HA. Os altos níveis de proteases ligadas na proximidade da partícula viral, provavelmente permitem a ativação direta da clivagem de HA (Lamb & Krug, 2001; Zambon, 2001).

2.1.8 Aspectos Clínicos e Patológicos

Os sinais clínicos da influenza são similares entre os humanos e os mamíferos inferiores. O período de incubação de um a quatro dias é seguido de febre, tosse, apatia, conjuntivite, rinite, coriza, anorexia, astenia, mialgia, cefaléia e relutância para se movimentar (Slemons & Brugh, 1994; Collier & Oxford, 1996).

A infecção viral, por influenza, do trato respiratório inferior, na forma de pneumonia algumas vezes é acompanhada por um quadro hemorrágico e uma severa traqueobronquite, determinando altos índices de mortalidade. Os casos fatais, podem levar à alterações patológicas em outros órgãos, tais como: encefalite e miocardite (Corrêa & Corrêa, 1992; Hayden & Palese, 1997). A pneumonia é contudo muito devido à infecção bacteriana secundária, onde o *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais freqüente (Hayden & Palese, 1997).

Outras complicações que podem estar associadas à influenza A são a síndrome de Reye, caracterizada pela encefalopatia e a degeneração gorda do fígado, também relacionada à influenza B, Coxsackie B5, echovírus, adenovírus e outros. A infecção por influenza também tem sido correlacionada a uma encefalite aguda viral e à síndrome de Guillain-Barre, onde ocorre uma paresia neuro-motora de baixa difusão (wysiwyg://46/http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/Influenza.htm).

2.1.9 Propagação

No laboratório, os vírus da influenza são tipicamente estudados tanto em ovos embrionados de galinha, quanto em células "Madin-Darby canine kidney" (MDCK), onde ambos suportam o multiciclo de crescimento dos vírus da influenza (Lamb & Krug, 2001; Whittaker, 2001). O cultivo deste vírus em ovos ainda é o sistema de escolha para a produção de vacinas e de grandes quantidades de vírus usados nos estudos laboratoriais. No caso das células MDCK, são geralmente usadas para o isolamento primário dos vírus da influenza (Lamb & Krug, 2001).

Os vírus da influenza irão replicar, causar uma citopatologia e produzir placas em um número de culturas de células primárias, incluindo rim de macaco, rim de bezerro, rim de hamster, rim de galinha e epitélio respiratório humano primário. Contudo, poucos sistemas celulares, além das células primárias de rim, são susceptíveis à formação de placa pelos vírus da influenza, a não ser que tripsina esteja presente para ativar a molécula de HA (Lamb & Krug, 2001). Devido à ampla distribuição de receptores, muitos outros tipos de células podem ser infectados pelo vírus, mas alguns

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA UFMG

somente através de um único ciclo de infecção e sem que ocorra a disseminação de célula à célula (Whittaker, 2001).

No caso da influenza eqüina, estudos envolvendo a viabilidade em culturas de células epiteliais turbinadas nasais de eqüinos e tecido de traquéia, determinaram em ambos os tipos de cultura a replicação produtiva do vírus da influenza eqüina (equi - 2, subtipo H3N8). A morte celular ocorreu através da apoptose seguindo à infecção viral. Desta forma, células do epitélio respiratório primário, de origem eqüina, podem ser alternativas para o estudo da interação dos vírus respiratórios com o hospedeiro eqüino, principalmente nos casos de influenza (Lin *et al.*, 2001).

2.1.10 Prevenção e Controle

A detecção e caracterização dos isolados do vírus da influenza e a identificação de novas variantes emergentes são atividades associadas ao trabalho de monitoração global da Organização Mundial de Saúde. Informações das propriedades antigênicas dos vírus da influenza circulantes, em comparação com as referências e cepas vacinais, são importantes para a formulação de vacinas do vírus da influenza (Ellis & Zambon, 2002).

A imunização, antes da quimioprofilaxia, permanece como o método de escolha para a prevenção. As vacinas inativadas contra a influenza, foram inicialmente introduzidas em 1940, mas eram impuras, reatogênicas e com potência variável. Somente três décadas depois é que se tornaram mais adequadas e com o tempo passaram a ser mais utilizadas contra a influenza (Hayden & Palese, 1997). São vacinas inativadas por formalina ou beta-propiolactona (Collier & Oxford, 1996).

As vacinas vivas, produzidas pela hibridização de vírus que possuem os antígenos HA e NA específicos, com vários tipos de mutantes selecionados tanto pela incapacidade de crescerem a 37°C ou pela adaptação em animais ou embriões de galinha, apresentam vantagens como a indução de uma ampla imunidade que poderá evitar o problema do deslocamento antigênico (Collier & Oxford, 1996). Um exemplo disto, refere-se ao trabalho de Maassab & Bryant (1999), envolvendo a atenuação do vírus da influenza tipo A e B, através da adaptação do crescimento viral a 25°C (adaptação ao frio) por passagens em série, para a produção de amostras "mestres" atenuadas a serem aplicadas em rearranjos genéticos.

De qualquer forma, estes métodos utilizados normalmente para a atenuação, envolvendo as passagens repetidas e a adaptação à temperatura, requerem um período longo para serem completados e provavelmente, longo demais para que a vacina se torne viável para a imunização contra a amostra viral da influenza em vigor (wysiwyg://46/http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/Influenza.htm).

Na busca por contornar os problemas existentes quanto à metodologia clássica para a produção de vacinas vivas atenuadas, principalmente no que se refere ao tempo, é que rearranjos genéticos contendo fragmentos de RNA que codificam para HA e NA da cepa circulante, associados ao restante do material genético que codifica para a amostra "mestre" atenuada estão sendo produzidos pela nova tecnologia de Genética Reversa, e avaliados como amostras vacinais (Maassab & Bryant 1999; wysiwyg://46/http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/Influenza.htm).

No campo da quimioprofilaxia, a Amantidina e Rimantidina (uma análoga da amantidina) são efetivas nos casos das infecções por influenza tipo A, excluindo os casos por influenza tipos B e C. A amantidina foi aprovada para a profilaxia da infecção pelo subtipo H2N2 em 1966, nos EUA e 10 anos depois para o uso contra todas as amostras virais da influenza A (Slemons & Brugh, 1994).

2.2 INFLUENZA EQÜINA

2.2.1 Histórico

A palavra influenza foi utilizada desde a primeira metade do século XIX para

designar doenças agudas, febris e contagiosas dos eqüinos (Ferreira, 1976; Corrêa & Corrêa, 1992).

A influenza foi durante muitos anos confundida com outras doenças e recebeu várias designações. Só em 1880 se iniciaram trabalhos de investigação sobre a sua etiologia e foram considerados seus agentes causais vários microrganismos (Ferreira, 1976). Estabeleceu-se inclusive uma grande confusão entre a Influenza e a Rinopneumonia, até que se conseguiu dissociar os estados agudos respiratórios em pelo menos três enfermidades, isto é, as duas citadas mais a Arterite eqüina (Corrêa & Corrêa, 1992). Desta forma, os dados relativos ao desenvolvimento histórico e a distribuição geográfica da doença no período prévio ao esclarecimento etiológico da mesma, devem ser valorizados com muita prudência (Becker, 1988).

Manninger, em 1947, dizia que "as tentativas para isolar o vírus causador têm sido até hoje infrutuosas", mas logo na segunda metade do século XX, as pesquisas levaram ao isolamento do vírus da influenza eqüina com seus dois subtipos, diferenciando-o dos agentes de outras enfermidades respiratórias e oferecendo bases clínicas e imunológicas para o diagnóstico das enfermidades respiratórias dos eqüinos (Corrêa & Corrêa, 1992).

Epidemias de influenza eqüina foram intensamente estudadas: 1956, na Suécia, Heller e colaboradores verificaram que surtos de uma doença respiratória, em eqüinos, revelavam fixação do complemento positivo para o vírus influenza tipo A; 1958, Sovinora, na Tchecoslováquia, identificou uma amostra de vírus, também de surto de doença respiratória em eqüinos, sem relação antigênica com outros representantes da influenza e denominou então de amostra Influenza A equi 1 (A/Equine/Prague/1/56) (H7N7). Mais tarde, anticorpos para essa amostra de vírus foram detectados na Inglaterra, França, Suécia, Hungria, Romênia, Polônia, Rússia, Quênia, Índia e Paquistão. Em 1961, Doll isolou a amostra Influenza A equi 1, nos EUA e em 1963, Waddell, durante uma epizootia nos EUA, isolou de eqüinos uma amostra de vírus da influenza antigenicamente diferente da A equi 1, denominada então de vírus da influenza A equi 2 (A/Equine/Miami/1/63) (H3N8), que se difundiu pela América do Sul e Canadá (Mayr & Guerreiro, 1981; Acha & Szyfres, 1986; Becker, 1988).

Surtos envolvendo as duas amostras de vírus (subtipos) foram identificadas na Inglaterra, França e Suíça em 1965. No Brasil, em 1969, Wizigmann e colaboradores detectaram anticorpos específicos para as amostras equi 1 e equi 2 em soros de eqüinos de hipódromos do Rio Grande do Sul e em 1970, foi isolado na Guanabara o vírus da influenza A equi 2 (Mayr & Guerreiro, 1981; Becker, 1988).

A continuidade das pesquisas envolvendo o vírus da influenza eqüina tem fornecido elementos para a melhor compreensão da imunidade sistêmica e local da infecção causada pela influenza (Reneger, 1992), assim como a análise de novos surtos de doenças respiratórias em eqüinos, como o ocorrido em março de 1989, na China, causado por um novo vírus H3N8 da influenza eqüina [A/equine/Jilin/1/89 (Eq./Jilin)] (Webster & Thomas, 1993).

O subtipo equi-2 apresenta uma relação antigênica com A/Hong Kong/1/68 (H3N2). Num estudo, voluntários humanos expostos ao A/Equine/Miami/1/63, adoeceram e o vírus pôde ser isolado durante os primeiros seis dias pós-infecção. Quatro das 15 pessoas se recuperaram até o décimo dia. Nos eqüinos expostos ao vírus Hong Kong ("humano"), foi observado uma enfermidade febril e o vírus foi isolado até cinco dias pós-infecção. No entanto, não se pode comprovar se estas infecções cruzadas ocorrem de forma natural (Acha & Szyfres, 1986).

Neste contexto, os cientistas estão voltando seus esforços cada vez mais para o campo das análises de modelos vacinais contra a influenza (Palese *et al.*, 1997), assim como para a melhor compreensão deste agente infeccioso (Perez & Donis, 1995; Perez & Donis, 1998; Neumann *et al.*, 1999). Estudos como estes, estão ampliando as

perspectivas para possíveis soluções no desenvolvimento de melhores formas de proteção contra a influenza, não só aplicáveis aos humanos, mas também metodologias adaptadas às amostras virais dos animais, como os eqüinos.

2.2.2 Etiologia

Os vírus da influenza eqüina pertencem à família *Orthomyxoviridae*, sendo representados pelo gênero *Influenzavirus*, tipo A e subtipos equi 1 (H7N7) e equi 2 (H3N8) (Mayr & Guerreiro, 1981; Odend'hal, 1983; Fenner *et al.*, 1987; Corrêa & Corrêa, 1992). As características virais são as mesmas mencionadas anteriormente (item 2.1.3).

O tipo viral é determinado por fixação de complemento, enquanto o subtipo é caracterizado por provas de hemaglutinação e de inibição da hemaglutinação. Os vírus da influenza, tipo A, ocorrem nos homens, eqüinos, suínos e aves. O vírus da influenza A equi 2 é mais patogênico do que A equi 1 para os eqüídeos (Corrêa & Corrêa, 1992).

2.2.3 Epidemiologia

A influenza eqüina é uma doença altamente contagiosa, na qual os vírus se disseminam rapidamente através de uma tosse persistente e severa dos eqüinos (Carter, 1986; Becker, 1988). São excretados durante o período de incubação, que normalmente é curto, de um a três dias (Mohanty & Dutta, 1981; Fenner *et al.*, 1987) e todos os eqüinos são sensíveis, independente de sexo, idade e raça (Corrêa & Corrêa, 1992).

É necessário o contato dos animais para a transmissão espontânea da doença, pois não há vetores nem transmissores (Becker, 1988; Corrêa & Corrêa, 1992), sendo a via aerógena a forma de se provocar a doença clínica. Por isso ocorre especial perigo às manadas de éguas e às concentrações eqüinas, incluindo os concursos hípicos. Embora as manifestações clínicas da influenza eqüina normalmente iniciem nas estações mais frias, ocorrências epizoóticas são na maioria das vezes vistas durante a duração das estações das principais corridas: entre abril e outubro, no hemisfério Norte (Fenner *et al.*, 1987; Becker, 1988).

A morbidade nas epidemias é muito alta, chegando próximo ou atingindo 100%, porém a letalidade é baixa. A epidemia logo extravasa os limites de onde se originou e afeta os eqüinos de regiões ou países inteiros, às vezes criando pandemias. Não há maior sensibilidade etária, mas os potros parecem ser mais susceptíveis, podendo aumentar o índice de mortalidade (Mayr & Guerreiro, 1981; Corrêa & Corrêa, 1992). Tal fato, provavelmente ocorre porque os outros animais mais idosos já tiveram a doença e onde ela se repete, os animais apresentam imunidade adquirida, reforçada continuamente por reinfecções inaparentes (Ferreira, 1976; Corrêa & Corrêa, 1992).

O vírus da influenza tipo A, que é o mais difundido, suspeita-se que sempre esteve presente em todo mundo, sendo que o subtipo A equi 2, mais virulento, aparece pela primeira vez na Europa nos últimos anos, evidentemente por uma transformação mutante que, desde a Flórida, difundiu-se em vagões, em 1963 (Becker,1988).

2.2.4 Aspectos Clínicos

Os sinais clínicos apresentados pelos dois subtipos do vírus da influenza eqüina são semelhantes, sendo que o subtipo A equi 2 normalmente causa um quadro mais grave (Higgins & Wright, 1995). Estes sinais aparecem já ao fim de dois a três dias, duração do período de incubação (Fenner *et al.*, 1987; Becker, 1988). Os sinais clínicos iniciam-se, às vezes simultaneamente num grupo de animais que apresentam febre elevada, acima de 40°C, sendo que quando há infecção pelo subtipo A equi 2, chega a mais de 41°C. Este período dura de 24 a 36 h, mas pode manter-se por quatro a cinco dias, com ligeiras remissões matinais. A tosse seca e freqüente é o principal sintoma, que se mantem por dois a três dias, seguida de rinite com exsudação seromucosa e logo mucosa, enquanto a tosse se torna mais profunda e úmida, com sinal de tráqueo-

bronquite (Ferreira, 1976; Mayr & Guerreiro, 1981; Becker, 1988).

Há perturbações oculares, onde a conjuntiva adquiri a coloração vermelha com fundo amarelo ("pinkeye"). Estas perturbações vão desde a simples congestão conjuntival até a inflamação catarral e à tumefação das pálpebras, acompanhada de fotofobia e lacrimejamento. Nos casos mais graves, ocorre opacidade do cristalino ou deslocamento da retina e cegueira consecutiva (Hagan & Bruner, 1961; Ferreira, 1976; Fenner *et al.*, 1987).

Os animais podem apresentar depressão nervosa, sonolência, cabeça baixa e astenia, levando-os a apoiarem o corpo alternadamente num dos membros e a vacilarem o terço posterior. Paralisia do pênis e do reto, edemas de pernas e também de abdômen podem ser observados. A preensão dos alimentos e a mastigação fazem-se com lentidão e em casos mais graves, os animais tornam-se anoréxicos (Ferreira, 1976).

No aparelho digestivo, há congestão da mucosa, faringite, constipação seguida de diarréia e às vezes, cólicas. Na urina emitida, também se pode verificar presença de pigmentos biliares, havendo edemas nas regiões do corpo em declive, semelhantes às placas de urticária (Ferreira, 1976). Pode ainda ocorrer aborto em éguas grávidas devido à febre alta, além de casos de miocardite, artrites e sinovites (Higgins & Wright, 1995).

A doença permanece por seis a 14 dias, com uma morbidade alta (50 a 100%) e uma letalidade que não vai além de 10%, sendo que nos casos graves pode prolongar-se por três semanas e quando surgem complicações, o prognóstico é sombrio (Ferreira, 1976; Mayr & Guerreiro, 1981).

2.2.5 Patogenia e Aspectos Patológicos

A porta de entrada do vírus é a respiratória, onde estes agentes ligam-se especificamente às células do epitélio respiratório e às células glandulares mucíparas, que contêm receptores para neuraminidases. Originam a degeneração, lise e descamação do epitélio, com intensa infiltração das vias respiratórias superiores (Becker, 1988; Corrêa & Corrêa, 1992; Higgins & Wright, 1995).

O rápido progresso da infecção pelo epitélio da bifurcação bronquial provoca, já nos primeiros dois a quatro dias da infecção, o aparecimento de sinais clínicos (febre e tosse). A intensa formação de muco produzido pelas glândulas, junta-se ao catarro da descamação epitelial, em volume, seja pela irritação causada pelo vírus ou pelo maior fluxo de sangue da congestão, estabelecendo grave inflamação exsudativa (Becker,1988; Corrêa & Corrêa, 1992).

O vírus da influenza A equi 1 é menos patogênico, geralmente só determinando inflamação nasofaríngea e laringotraqueal. O vírus da influenza A equi 2, mais patogênico, determina a mesma inflamação, mas também bronquite e bronquiolite, além de às vezes, miocardite intersticial e encefalite (Corrêa & Corrêa, 1992).

Animais que não tenham absoluto repouso nos primeiros dias da doença ou que sofram infecção bacteriana secundária, normalmente por estreptococos hemolíticos, podem desenvolver bronquite crônica e enfisema pulmonar (Becker, 1988; Corrêa & Corrêa, 1992).

2.2.6 Diagnóstico

Os sinais clássicos da influenza, como a febre passageira, a tosse seca e constante nos animais e a rápida difusão da doença na criação, são considerados indicações valiosas num diagnóstico clínico. Contudo, para o diagnóstico exato é necessária a análise laboratorial, que consiste dos diagnósticos virológico e sorológico (Becker,1988; Higgins & Wright, 1995).

O diagnóstico virológico pode ser direto e rápido, onde os vírus, os genes ou antígenos virais são revelados diretamente nas amostras. A microscopia eletrônica é um método eficiente quando os espécimes contêm uma grande quantidade viral ou

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

quando a morfologia está claramente evidente. Para o diagnóstico direto, os dois métodos de eleição, pela rapidez e o baixo custo são a imunofluorescência e ELISA (Slemons & Brugh, 1994; Manuguerra & Hannoun, 1999).

Na técnica de Imunofluorescência, como resultado de células infectadas pelo vírus da influenza, a fluorescência pode-se apresentar no citoplasma e no núcleo (Manuguerra & Hannoun, 1999), pois é um vírus que sofre replicação e transcrição no núcleo das células hospedeiras (Whittaker, 2001). Contudo, é a natureza do anticorpo específico que irá viabilizar a detecção e identificação viral (Manuguerra & Hannoun, 1999).

No caso da detecção direta do genoma do vírus da infecção, a reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação do gene, com detecção específica e subtipificação do vírus (Ellis & Zambon, 2002), e o seqüenciamento são utilizados. Contudo, o método aplicado para a detecção e estudo do vírus, quando os espécimes apresentam poucos vírions ou antígenos virais é o isolamento em culturas de células, que apesar de ser mais lento, é eficiente para a amplificação viral (Higgins & Wright, 1995; Manuguerra & Hannoun, 1999).

O isolamento do vírus da influenza em embrião de galinha, foi introduzido nas técnicas virológicas em 1940 (Manuguerra & Hannoun, 1999), utilizando o muco nasal (secreção) no período agudo da infecção e inoculando na cavidade amniótica ou alantóica de embriões de galinha com 10 dias de idade, incubando a 35 - 37°C por três a quatro dias. O vírus é detectado neste caso, pela demonstração da atividade hemaglutinante no fluido amniótico ou alantóico colhidos. A identificação pode ser feita por inibição da hemaglutinação que é um método simples, barato e que viabiliza a determinação do subtipo viral (Fenner *et al.*, 1987; Manuguerra & Hannoun, 1999).

Sistemas de cultura de células são também utilizados para o isolamento do vírus da influenza eqüina, tais como a cultura de células renais de bovino, de hamster e de galinha (Becker,1988), sendo a sensibilidade do vírus averiguada através da titulação viral (Manuguerra & Hannoun, 1999).

O diagnóstico sorológico, que fornece a duração de anticorpos persistentes pós-infecção, especialmente anticorpos inibidores da hemaglutinação, não indica que a presença destes anticorpos está associada a uma infecção recente e não pode excluir a existência de uma infecção inaparente, sem sintomas. Os exames são feitos a partir do soro ou do plasma e envolvem as seguintes técnicas: ELISA, reação de fixação de complemento, soroneutralização, dentre outras (Higgins & Wright, 1995; Manuguerra & Hannoun, 1999).

Através do diagnóstico laboratorial, devem ser excluídas algumas doenças, como as infecções por adenovírus, rinovírus, herpesvírus eqüino 4 e parainfluenzavírus (Fenner *et* al., 1987; Becker, 1988).

2.2.7 Tratamento

O tratamento recomendado nos casos de influenza eqüina envolve um absoluto repouso para os animais doentes: um mês para os animais de trabalho e dois a três meses para os de corrida, assim que aparecer a febre (Corrêa, 1974; Ferreira, 1976; Becker; 1988; Corrêa & Corrêa, 1992). O combate à febre deve ser feito por meio de antipiréticos, mas na fase aguda da doença nenhum medicamento deve influir, com excessão feita ao emprego de soros imunes em potros. A aplicação de sulfamidas e antibióticos pode evitar ou tornar mais leve as infecções bacterianas (Ferreira, 1976; Becker, 1988; Corrêa & Corrêa, 1992; Higgins & Wright, 1995). Depois do desaparecimento dos sinais clínicos, os animais convalescentes devem ficar em observação durante um período de três semanas, com retorno gradual ao trabalho (Becker, 1988).

2.2.8 Profilaxia

A profilaxia, em se tratando da influenza eqüina, envolvem medidas como o isolamento dos animais doentes, com notificação obrigatória às autoridades nacionais e à Organização Mundial de Saúde, assim como a verificação de temperatura regularmente dos eqüinos, desinfecção e o isolamento prolongado dos animais curados (Ferreira, 1976; Acha & Szyfres, 1986; Becker, 1988). A criação afetada permanecerá "interditada", sendo impedida a incorporação de eqüinos e a saída dos mesmos (Becker, 1988).

A proteção profilática dos eqüinos é realizada pela utilização de vacinas convencionais bivalentes, contendo os subtipos A equi 1 e A equi 2 (Mohanty & Dutta, 1981; Fenner *et al.*, 1987; Higgins & Wright, 1995), que são propagados em ovos de galinha embrionados ou cultura de tecidos, concentrados e purificados antes da inativação com agentes como a formalina ou a beta-propiolactona (Office International des Epizooties, 2001). Contudo, a partir de 1999, os especialistas do "Office Internacional des Epizooties" (OIE) e da Organização Mundial de Saúde, recomendaram que o subtipo equi-1 (H7N7) fosse eliminado das vacinas por se acreditar que esteja extinto (Chambers *et al.*, 2001).

2.3. VACINAS ASSOCIADAS À INFLUENZA EQÜINA

2.3.1 Vacinas Inativadas

As vacinas convencionais bivalentes contra a influenza eqüina são administradas pelo menos uma vez ao ano, em duas ou três doses intercaladas por um a três meses na primeira vez e a seguir, pode-se aplicar uma só dose ao ano, ou duas doses intercaladas de três meses (Corrêa & Corrêa, 1992). As éguas devem ser vacinadas nos últimos estádios da gravidez, garantindo um bom suplemento de anticorpos no colostro para os potros (Higgins & Wright, 1995).

As vacinas contra influenza estão disponíveis e são rotineiramente usadas em cavalos de competição na Europa, nas Américas e na Ásia, sendo obrigatória em alguns países onde os cavalos de esportes estão competindo sob as regras das organizações eqüestres. As vacinas não estão amplamente em uso no subcontinente indiano, China ou Austrália (Office International des Epizooties, 2001).

Existem vacinas na Europa e América do Norte que contêm o protótipo do vírus A/equine/Prague/1/56 e A/equine/ Miami/2/63. No entanto, a maioria contêm uma variante de Miami 63 representada pelo A/equine/Fontainbleau/2/79 ou A/equine/ Kentucky/2/81. Alguns especialistas têm atualizado as vacinas para conterem isolados recentes, como A/equine/ Suffolk/2/89. É necessária uma constante vigilância e caracterização dos vírus para que novas variantes antigênicas possam ser incorporadas às vacinas, quando for apropriado (Higgins & Wright, 1995).

Uma vacina contra influenza eqüina deve proteger os eqüinos contra a cepa viral mais recente em circulação. Os vírus da influenza eqüina - 2 (subtipo H3N8) circulam na maioria dos lugares do mundo, causando surtos de doenças respiratórias com características de febre alta, tosse, descarga nasal mucopurulenta e risco de uma pneumonia por infecção secundária. Regularmente os vírus da influenza sofrem deslocamento antigênico através do acúmulo de mutações localizadas (mutações de ponto), levando à mudança na antigenicidade que eventualmente compromete a efetividade da vacina, a não ser que a cepa vacinal seja periodicamente atualizada (Chambers *et al.*, 2001).

Estudos recentes do deslocamento antigênico identificaram duas linhagens divergentes da influenza eqüina-2, a linhagem Americana, que apesar do nome encontra-se amplamente disseminada e a linhagem Eurásia, que permanece comum no Reino Unido, mas foi isolada uma vez no hemisfério ocidental. Desde 1995, os especialistas em influenza eqüina, do OIE e da Organização Mundial de Saúde (OMS) têm recomendado que as vacinas devam proteger contra os vírus de ambas as linhagens. No caso das vacinas

convencionais de vírus mortos, isto requer incorporação de antígenos de vírus representantes de ambas as linhagens. Em adição, as vacinas convencionais do vírus da influenza eqüina tipicamente contêm o vírus representante do equi-1, subtipo (H7N7). Contudo, este subtipo acredita-se que esteja extinto e em 1999, os especialistas da OIE/OMS recomendaram que este subtipo fosse eliminado das vacinas (Chambers *et al.*, 2001).

Historicamente, a eficácia das vacinas convencionais do vírus morto da influenza eqüina tem sido julgada baseada na habilidade em induzir altos títulos de anticorpos no soro após a aplicação primária de duas ou mais doses. Altos títulos de anticorpos séricos são correlacionados com a proteção contra o desafio natural no campo, mas são em geral de curta duração, necessitando freqüentemente de revacinação (Chambers *et al.*, 2001) para a manutenção dos níveis protetores de anticorpos (Office International des Epizooties, 2001).

As vacinas inativadas contra influenza têm sido altamente bem sucedidas na prevenção contra a infecção pelos vírus A/equine/1, mas relatos freqüentes de falha na vacinação ocorrem durante surtos de infecções por A/equine/2. Tal fato tem sido atribuído a um inadequado potencial da vacina, à esquemas inapropriados de vacinação e às espécies ultrapassadas nas vacinas que têm se tornado irrelevantes como um resultado do deslocamento antigênico (Office International des Epizooties, 2001). Desta forma, os cientistas estão buscando novas vacinas contra a influenza eqüina, que possam fornecer uma proteção mais eficiente e duradoura, como é o caso do desenvolvimento de vacinas virais vivas modificadas.

2.3.2 Vacinas Vivas Modificadas: em desenvolvimento

Há muito tempo se tem o conhecimento que a vacina do vírus vivo modificado oferece uma grande vantagem sobre a vacina inativada, principalmente no aspecto de uma proteção mais rápida e uma imunidade de longa duração. Desta forma, a elaboração de novas vacinas, adotando desde o procedimento de atenuação viral, por exemplo através da produção de uma variante adaptada ao frio, assim como a adoção da tecnologia de recombinação, estão em franco desenvolvimento.

Nos EUA, em 1999, foi licenciada uma nova e não convencional vacina do vírus da influenza eqüina modificado. Trata-se da vacina Flu Avert IN que é uma variante adaptada ao frio da cepa Kentucky/91, do vírus da influenza A/equine-2. É administrada através de um aplicador intranasal e uma única dose fornece a proteção contra o vírus selvagem homólogo até três meses, com redução dos sinais clínicos por seis meses ou mais. No entanto, por motivos de segurança, novos testes foram produzidos e publicados posteriormente a 1999. Estes estudos envolveram a análise da estabilidade da atenuação, a habilidade do vírus vacinal em disseminar-se espontaneamente a partir de cavalos vacinados, assim como a eficiência clínica diante do desafio com vírus heterólogos das cepas das linhagens Americana e Eurásia (ambos subtipo equi-2). Os resultados destes estudos foram promissores quanto a eficiência desta vacina, mas ainda existem questões, como a atualização desta vacina que provavelmente poderá ser abordada em futuros testes (Chambers *et al.*, 2001).

Da mesma forma em que estudos têm adotado a produção de uma variante viral adaptada ao frio para o desenvolvimento de uma vacina viral viva modificada, a tecnologia de recombinação viral também encontra-se em franca expansão, fornecendo ferramentas para a produção de cepas vacinais, como é analisado nos trabalhos específicos à influenza humana envolvendo Sistemas de Genética Reversa, assim como também condições para o aprofundamento dos estudos dos vírus, como se constata nesta tese, referente à influenza eqüina.

2.4 INFLUENZA EQÜINA NO BRASIL

No ano de 2001, segundo semestre, ocorreram no Rio de Janeiro e no Paraná surtos de influenza eqüina. Segundo Oliveira *et al.*, (2002), que realizaram o isolamento e caracterização biomolecular do vírus da influenza tipo A (H3N8) em um surto de gripe eqüina no Estado do Rio de Janeiro, foi possível afirmar com base no diagnóstico de 41 soros positivos para o vírus da influenza eqüina e no isolamento de 14 amostras virais que este vírus encontra-se circulante no Estado do Rio de Janeiro, representando um perigo potencial à eqüinocultura brasileira.

Diante da pesquisa epidemiológica do vírus H3N8 numa amostragem de 242 soros, onde 29,7% apresentaram positividade e comparando com os resultados mais recentes de atividades em andamento no Laboratório de Viroses Veterinárias da UFRRJ, Oliveira *et al.*, (2002) estimaram que a porcentagem de animais positivos no Estado do Rio de Janeiro seja ainda maior. Resultados como estes, constatam a difusão do vírus da influenza na população eqüina.

De acordo com o "HANDISTATUS II-Multiannual Animal Disease Status" (Office International des Epizooties, 2003) (Quadro 2) é possível verificar que no ano de 2000 foram 358 casos de influenza eqüina no Brasil, onde 74 foram fatais. No caso, apenas 2457 animais foram vacinados. Contudo, em 2001, ocorreram 874 casos (dois fatais), levando ao aumento no número de animais vacinados, 7719. Tais fatos reforçam a necessidade de um forte sistema de vigilância, uma rotina de diagnóstico sorológico, assim como uma política de vacinação eficiente. Essas medidas são fatores determinantes para o combate da disseminação da influenza eqüina.

Quadro 2. Influenza eqüina no Brasil (1996-2001).

ANO	OCORRÊNCIA	ESPÉCIE	NÚMERO DE			Medidas de Controle	NÚMERO DE		
			Surtos	Casos	Mortes		Destr.	Abate	Vac.
2001	+	equi	128	874	2	* Qf Qi V			7719
2000	+	equi	134	358	74	V			2457
1999	+	equi	180	586	0	V			2543
1998	+	equi	153	511	8	V			2888
1997	+()	equi	172	739	2	V	0	0	2677
1996	+()	equi	102	535	2	Q T V			...

Adaptado do "HANDISTATUS II Multiannual Animal Disease Status" (Office International des Epizooties, 2003).
() = Doenças limitadas à áreas específicas. * Doença notificável. ... = Nenhuma informação disponível.
Qf = Precaução na fronteira. Qi = Controle de movimento dentro do país. V = Vacinação.
Q = Quarentena, controle de movimento e outras precauções na fronteira e dentro do país.
T = Tratamento. Destr. = destruídos Vac. = Vacinados

Atualmente, as vacinas utilizadas no Brasil são as inativadas bivalentes, contendo os subtipos A equi 1 e a equi 2. Segundo o Manual de Produtos Veterinários (2002-2003), existem cinco vacinas disponíveis no Brasil, EQUIFFA, Fluvac EHV 4/1 Plu, Fluvac EWT Plus, Lexington-8 e Nobivac Equenza T.

A EQUIFFA contém os vírus inativados da influenza eqüina, cepas A1 Prageu/56 (H7N7) e A2 Mewmarket/2/93 (H3N8), enquanto que a Fluvac EHV 4/1 Plus, contra rinopneumonite e influenza eqüina, é uma vacina de vírus morto que consiste de herpesvírus eqüino 1 e herpesvírus eqüino 4, e vírus da influenza eqüina tipos A1 e A2 (incluindo Kentucky 92). A Fluvac EWT Plus, contra encefalomielite (Leste e Oeste), influenza e tétano, é uma vacina inativada que consiste de vírus de encefalomielite eqüina, amostras Leste e Oeste, do vírus da influenza eqüina tipos A1 e A2 (incluindo Kentucky 92) e do toxóide tetânico. Lexington-8 atua contra encefalomielite, influenza, rinopneumonite

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA DA UFMG

e tétano do eqüinos, contendo vírus da encefalomielite eqüina tipo Oeste, vírus da influenza eqüina tipo 1 e 2, herpesvírus eqüino e toxóide tetânico, inativados pelo formaldeído e adsorvidos pelo gel de hidróxido de alumínio. No caso da Nobivac Equenza T, vacina líquida de sub-unidade, contendo saponina como adjuvante, esta atua contra influenza eqüina e tétano (Manual de Produtos Veterinários, 2002-2003).

O vírus da influenza eqüina dissemina-se rapidamente, atingindo populações de eqüinos susceptíveis em fazendas e criações distantes do local de origem dos surtos, o que segundo Oliveira *et al.*, (2002), leva à urgência em se implantar medidas eficazes de controle por parte dos Médicos Veterinários para que novos surtos sejam evitados em nosso território.

2.5 SISTEMA DE GENÉTICA REVERSA: HISTÓRICO E PERSPECTIVAS

2.5.1 Considerações Iniciais

O Sistema de Genética Reversa, como o termo é conhecido na Virologia Molecular, descreve a obtenção de vírus processando um genoma derivado de DNAs complementares (cDNA) clonados. Este sistema tem sido estabelecido para produzir artificialmente membros das famílias *Rhabdoviridade*, *Paramyxoviridade*, *Filoviridade*, *Bunyaviridade* e *Orthomyxoviridade*, revolucionando as pesquisas destes vírus (Neumann *et al.*, 2002).

Durante o ano de 1994 foi relatada a produção do vírus infeccioso da raiva, um rhabdovírus, a partir de cDNA clonados. Os plasmídeos codificando o genoma viral, incluindo a nucleoproteína e as polimerases (todas sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase), foram transfectados em células que haviam sido infectadas com o vírus vaccínia recombinante, expressando a T7 RNA polimerase. Esta polimerase transcreveu o RNA da raiva completo, que em seqüência foi replicado e transcrito pelas polimerases e nucleoproteína, dando início ao ciclo de replicação. Desde aí, sistemas similares têm sido descritos para diversos vírus representando as famílias *Rhabdoviridade*, *Paramyxo* e *Filoviridae*, de vírus RNA, com polaridade negativa, não segmentados (Neumann & Kawaoka, 2002).

No caso dos vírus RNA de polaridade negativa segmentados, os genomas sempre foram refratários à reconstituição a partir de cDNAs clonados, muitas vezes devido às dificuldades tecnológicas em fornecer diversos RNPs virais em conjunto com as proteínas polimerases e NP. No entanto, em 1996 foi descrito a obtenção do vírus Bunyamwera (contém três segmentos genômicos) a partir de plasmídeos, determinando a primeira geração de vírus RNA de polaridade negativa, segmentado, sendo obtidos de cDNAs clonados (Neumann & Kawaoka, 2002).

No que se refere ao vírus da influenza, o desafio em obtê-lo através do Sistema de Genética Reversa foi muito maior, devido ao genoma ser constituído de oito segmentos. Nos próximos itens, a evolução deste processo será abordada mais detalhadamente.

2.5.2 Reconstituição de Complexos RNP funcionais

Na busca pela produção do vírus da influenza através do Sistema de Genética Reversa, inicialmente os estudos foram direcionados para reconstituir as RNPs funcionais. Tais complexos podiam ser isolados de vírus tratados com detergente, ou reunidos a partir da NP e polimerases purificadas (Honda *et al.*, 1988), ou ainda de proteínas expressas em células de insetos. Na época, pequenos RNAs sintéticos ou os RNAs virais completos foram transcritos pelos complexos RNP reconstituídos, provando a integridade funcional do complexo polimerase. No entanto, devido às dificuldades tecnológicas, à purificação das proteínas e à associação destas com os RNAs sintéticos para formarem RNPs virais funcionais, esta abordagem não foi adequada para a produção do vírus da

influenza inteiramente de cDNAs clonados (Neumann & Kawaoka, 2002).

Contudo, a verificação de que as três proteínas polimerases e a NP eram suficientes para a transcrição e replicação dos RNAs virais, determinou os estágios iniciais para os subseqüentes avanços no campo da produção do vírus da influenza (Neumann & Kawaoka, 2002).

2.5.3 Sistemas Celulares: estudo da replicação e transcrição do vírus da influenza

Na seqüência à demonstração que RNPs funcionais podiam ser reconstituídas, sistemas de culturas de células foram estabelecidos para o estudo da replicação e transcrição do vírus da influenza. As três polimerases e a NP foram então expressas a partir do vírus vaccínia, em sistemas de expressão SV40, ou em linhagens celulares padronizadas para a expressão das quatro proteínas (Neumann & Kawaoka, 2002), como no caso da linhagem de células de camundongos (clone 76), desenvolvida por Kimura *et al.* (1992). Através desses sistemas, o RNA foi transcrito *in vitro* e associado às polimerases e NP purificadas para formar as RNPs virais, sendo então transfectados em células que expressavam a NP e polimerases (Neumann & Kawaoka, 2002).

Estes sistemas celulares permitiram que as regiões não codificantes dos RNAs virais fossem modificadas, levando à identificação dos elementos do promotor viral e dos sinais de regulação. Da mesma forma, favoreceram a mutagênese das polimerases e da NP, viabilizando os estudos das funções destas proteínas na replicação e transcrição (Neumann & Kawaoka, 2002).

Apesar das possíveis diferenças ao analisar-se as associações das polimerases e NP em células infectadas pelo vírus da influenza, tal fato não desconsiderou o valor dos sistemas em questão, que demonstraram que a replicação e transcrição de RNPs virais, artificialmente produzidos, podiam ser obtidos em células (Neumann & Kawaoka, 2002).

2.5.4 Sistemas com vírus auxiliar

Diante do conhecimento de que RNPs virais funcionais podiam ser reconstituídas e introduzidas em células, iniciavam-se novas etapas para a produção do vírus da influenza, através da introdução em vírions dos RNPs virais, produzidos artificialmente. Conseqüentemente, diversos métodos foram desenvolvidos para alcançar este objetivo, destacando-se os sistemas com vírus auxiliar que estabeleceram uma nova era de vírus recombinantes (Neumann & Kawaoka, 2001).

2.5.4.1 Método de Transfecção da Ribonucleoproteína

Em 1989, foi determinado o primeiro sistema para modificar os vírus RNA de polaridade negativa, utilizando vírus contendo RNA viral proveniente somente de cDNA clonado. Através deste sistema, estes pesquisadores substituíram a região codificante para o gene NS pela região codificante para o gene reporter da acetil cloranfenicol transferase (CAT) e no caso das regiões não codificantes 5' e 3', contendo os elementos promotores do vírus da influenza, estas permaneceram inalteradas (Luytjes *et al.*, 1989; Neumann & Kawaoka, 2002).

O cassete NS-CAT-NS foi flanqueado pelas seqüências promotoras da T7 RNA polimerase e por um sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição para produzir o terminal 3' do transcrito. O plasmídeo resultante foi transcrito *in vitro* e misturado às polimerases e NPs (purificadas dos vírions) para reconstituir os complexos RNP. Na seqüência, estas RNPs virais foram transfectadas em células eucarióticas, anteriormente ou posteriormente à infecção do vírus auxiliar, que forneceu as RNPs restantes (Luytjes *et al.*, 1989; Neumann & Kawaoka, 2002).

A análise da expressão de CAT indicou que uma nova população de vírus continha o

RNA viral NS-CAT-NS, em adição ao requisito de oito RNAs virais. No entanto, a atividade de CAT reduziu-se após três passagens em células, indicando que não houve estabilidade na manutenção do segmento CAT (Neumann & Kawaoka, 2002).

Enami *et al.*, (1990), seguindo a metodologia de transfecção de RNP (Figura 5), realizou a primeira substituição de um segmento genômico viral pelo respectivo mutante homólogo, proveniente de cDNA clonado. Contudo, devido a grande presença do vírus auxiliar do tipo selvagem, este sistema requeria a seleção do vírus mutante. A adoção de métodos de seleção por restrição de crescimento mediada por anticorpo, pela sensibilidade à temperatura, pela restrição à gama de hospedeiro ou pela resistência às drogas, constituiu-se em possibilidades estabelecidas na época, para seis dos oito segmentos do vírus da influenza A. No entanto, eram tecnicamente dispendiosas e potencialmente limitadas (Neumann & Kawaoka, 2001). Desta forma, novos passos foram dados, aprimorando esta metodologia e almejando a aquisição do conhecimento necessário para a aplicação plena do Sistema de Genética Reversa.

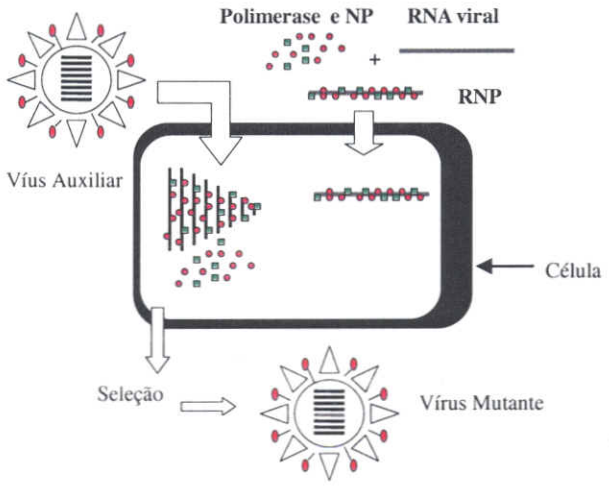


Figura 5. Método da transfecção da ribonucleoproteína (RNP). RNPs virais funcionais foram reconstituídas *in vitro*, através de RNA viral sintetizado e misturado à NP purificada e proteínas polimerases, e transfectados em células eucaróticas. As sete demais RNPs virais foram proporcionados pela infecção com o vírus auxiliar. Os sistemas de seleção foram então aplicados para a identificação do vírus recombinante (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001).

2.5.4.2 Método RNA polimerase I

Na busca pela tecnologia para a aplicação do Sistema de Genética Reversa e diante dos conhecimentos adquiridos pelo método de transfecção da Ribonucleoproteína, Newmann *et al.* (1994) estabeleceram um sistema alternativo para a produção do vírus da influenza, o método RNA polimerase I (Figura 6).

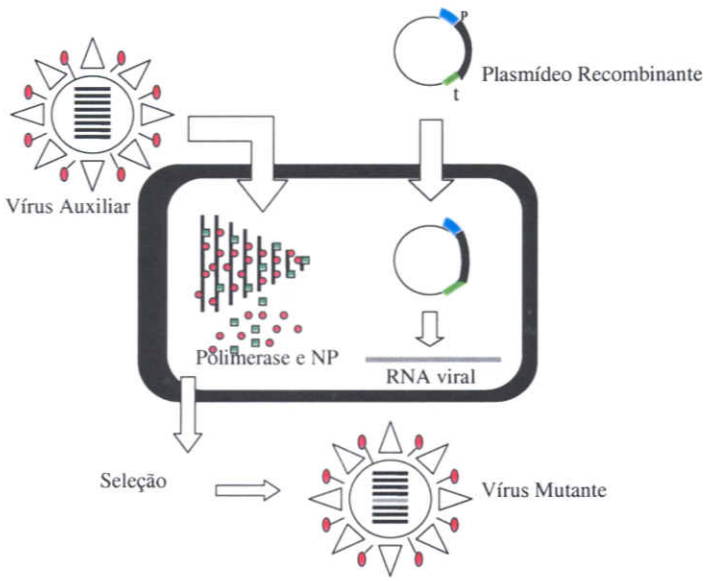


Figura 6. Método RNA Polimerase I (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001).

No método RNA polimerase I, ao contrário do método anterior, não era necessária a transcrição *in vitro* do RNA, a purificação das proteínas e nem a transfecção *in vitro* da RNP reconstituída. No caso, foi utilizada a RNA polimerase I para a síntese intracelular do RNA do vírus da influenza. Esta enzima nuclear transcreve RNA ribosomal, que assim como o RNA do vírus da influenza, não contém estruturas 5'-cap ou 3'-poli(A), além de localizar o sítio de replicação do vírus da influenza. Neste contexto, o cDNA codificando CAT foi inserido entre as regiões não codificantes 5' e 3' de um cDNA da influenza e este cassete foi então fusionado na orientação negativa às seqüências promotora e terminadora da RNA polimerase I. O plasmídeo recombinante, resultante deste processo, foi transfectado em células infectadas pelo vírus da influenza (fornecedor dos RNPs virais restantes), levando à síntese do RNA viral (contendo o gene para CAT) através da RNA polimerase I (Neumann & Kawaoka, 2002).

2.5.4.3 Avanços para o Sistema de Genética Reversa

O método RNA polimerase I, apesar de ter-se constituído num sistema mais conveniente que o método da transfecção da Ribonucleoproteína, não sendo necessária a transcrição *in vitro*, a purificação das proteínas e a transfecção de RNPs reconstituídas, também determinou uma baixa eficiência na produção de vírus da influenza não defeituosos (Neumann & Kawaoka, 2001).

Contudo, ambos os sistemas, dependentes de vírus auxiliar, viabilizaram pesquisas para a produção do vírus da influenza contendo tanto mutações em um segmento genômico, quanto a adição de um segmento (Enami *et al.*, 1991). Da mesma forma, forneceram condições para a continuidade das análises mutagênicas, através do desenvolvimento de novos sistemas. Um exemplo foi o sistema estruturado por Enami, 1997, onde os RNPs purificados eram incubados com c DNA hibridizando para o segmento genômico alvo, permitindo a alteração de qualquer segmento viral, sem ser necessário o uso dos métodos de seleção do vírus recombinante.

2.5.5 Obtenção do vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados

Os métodos de transfecção da Ribonucleoproteína e RNA polimerase I

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

que utilizavam um vírus auxiliar, necessitavam também de um sistema de seleção do vírus recombinante, limitando a aplicação destes. Conseqüentemente, buscava-se superar estas dificuldades técnicas, eliminando ao longo dos anos de pesquisas, os obstáculos para a síntese do vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados. Finalmente, uma década após o início dos estudos da reversão genética para o vírus da influenza Neumann *et al.*, (1999) conseguiram produzir o vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados.

2.5.5.1 Sistema RNA polimerase I: sentido negativo e sentido positivo de abordagens

Neumann *et al.* (1999) clonaram cDNAs codificantes dos oito segmentos RNA do vírus A/WSN/33 entre as seqüências promotora RNA polimerase I humana e terminadora RNA polimerase I de camundongo. Após a transfecção dos plasmídeos construídos em células eucarióticas 293T (rim embriônico de humano), a transcrição pela RNA polimerase I celular levou à síntese dos oito RNAs virais (Figura 7). Nos experimentos iniciais, as células eram também cotransfectadas com plasmídeos expressando todas as nove proteínas estruturais, ou seja, cDNAs do vírus da influenza clonados entre as seqüências promotora da RNA polimerase II e o sinal de poliadenilização. Apesar da introdução de 17 plasmídeos (oito para a síntese dos segmentos de RNA e nove para a expressão das proteínas), mais de 10^7 vírus infectantes por mL de sobrenadante eram obtidos.

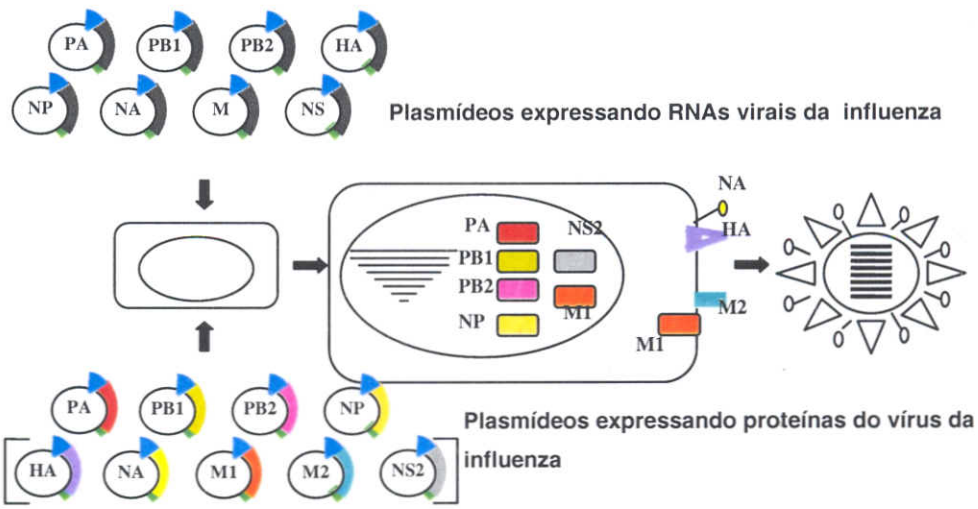


Figura 7. Obtenção do vírus da influenza inteiramente de cDNAs clonados. Oito plasmídeos que contêm a região codificante para um dos segmentos virais, flanqueada pelas seqüências promotora e terminadora da RNA polimerase I, são transfectados em células eucarióticas para a síntese do RNA viral pela RNA polimerase I. Nove plasmídeos para a expressão de todas as proteínas estruturais ou apenas quatro plasmídeos para as proteínas virais são necessários para a replicação e transcrição do RNA viral, sendo fornecidos pela co-transfecção de células com construções de expressão de proteínas (adaptado de Newmann & Kawaoka, 2002).

O aperfeiçoamento deste sistema levou à utilização de apenas quatro proteínas (PA, PB1, PB2 e NP) para a transcrição e replicação do RNA viral e conseqüentemente um total de 12 plasmídeos transfectados para a produção do vírus da influenza. Apesar deste grande número de plasmídeos, o sistema RNA polimerase I continua a ser um dos mais

eficientes para a produção do vírus RNA de sentido negativo (Pekosz *et al.*, 1999).

Outro aspecto analisado foi a produção do vírus da influenza a partir do RNA antigenômico de sentido positivo, realizada através da clonagem de cDNA (codificando todos os oito cRNAs) entre as seqüências promotora e terminadora RNA polimerase I. A transfecção destes plasmídeos levou à síntese de cRNA pela RNA polimerase I. Em contraste aos vírus RNA de sentido negativo, não segmentados, o vírus da Influenza pôde ser produzido com uma elevada eficiência, tanto pelo RNA genômico (RNA viral), quanto pelo RNA antigenômico (cRNA), sendo que o RNA viral de sentido negativo, como modelo, foi superior ao cRNA na produção viral (Neumann & Kawaoka, 2001).

2.5.5.2 Sistema RNA polimerase I/II: unidirecional e bidirecional

O sistema RNA polimerase I para a produção do vírus da influenza A, que continha os promotores pol I e pol II com os cDNAs do vírus da influenza em diferentes plasmídeos, necessitava da construção de 12-17 plasmídeos para a recuperação eficiente do vírus. A transfecção de células com tantos plasmídeos podia vir a limitar o uso deste sistema em linhagens de células que apresentavam uma alta eficiência de transfecção. Diante disto, Hoffmann *et al.* (2000a, b), visando diminuir o número de plasmídeos requeridos no Sistema de Genética Reversa, descreveram a construção e transfecção de plasmídeos contendo ambos os promotores pol I e pol II num mesmo plasmídeo, levando à produção do vírus da influenza a partir de apenas oito plasmídeos (Figura 8). Portanto, este sistema não permite a produção de partículas virais com ausência de um dos segmentos ou mutações letais num dos segmentos genômicos (Neumann & Kawaoka, 2001).

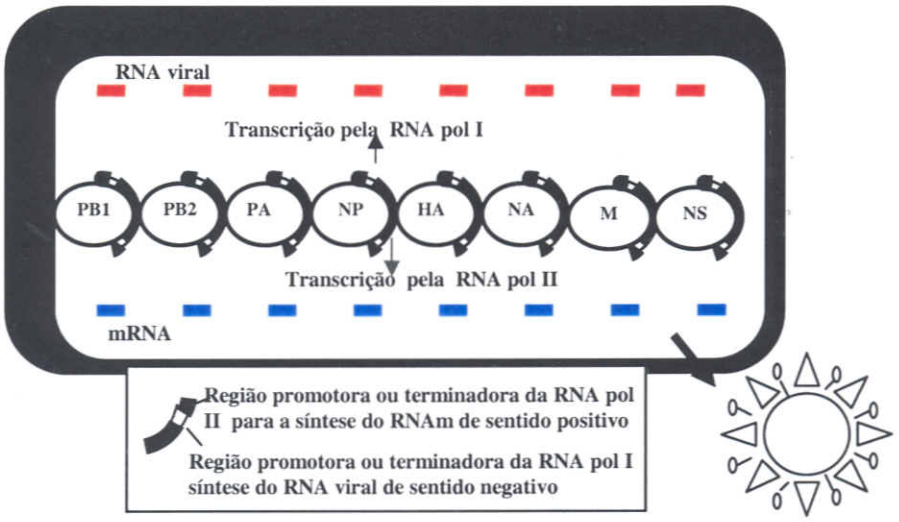


Figura 8. Diagrama esquemático do sistema RNA polimerase I/II, com síntese de mRNA e RNA viral, utilizado para a produção do vírus da influenza a partir de apenas oito plasmídeos (adaptado de Neumann & Kawaoka, 2001).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

O sistema RNA polimerase I/II pode apresentar dois tipos de transcrição, unidirecional ou bidirecional. O sistema bidirecional (Figura 9B) corresponde à clonagem do cDNA codificando para o RNA viral, numa orientação de sentido negativo entre as seqüências promotora (p_{Ih}) e terminadora (t_I) RNA polimerase I e em seguida, a clonagem deste cassete na orientação de sentido positivo entre as seqüências promotora RNA pol II (proveniente do citomegalovírus, p_{IICMV}) e de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (a_{IIbgh}). A transcrição pela RNA pol I resultava em RNA viral de sentido negativo, enquanto que a transcrição pela RNA pol II sintetizava mRNA de sentido positivo, produzidos a partir de um mesmo molde (Hoffmann & Webster, 2000).

No caso do sistema unidirecional (Figura 9A), o cDNA viral é inserido no sentido positivo de orientação entre as seqüências promotora e terminadora RNA polimerase I e toda esta unidade de transcrição é inserida no sentido positivo entre a seqüência promotora RNA pol II e o sítio de poliadenilização. Ao contrário do RNA viral de sentido negativo e o mRNA de sentido positivo, obtidos no sistema bidirecional, dois tipos de RNA de sentido positivo foram sintetizados, o cRNA e o mRNA (Hoffmann & Webster, 2000).

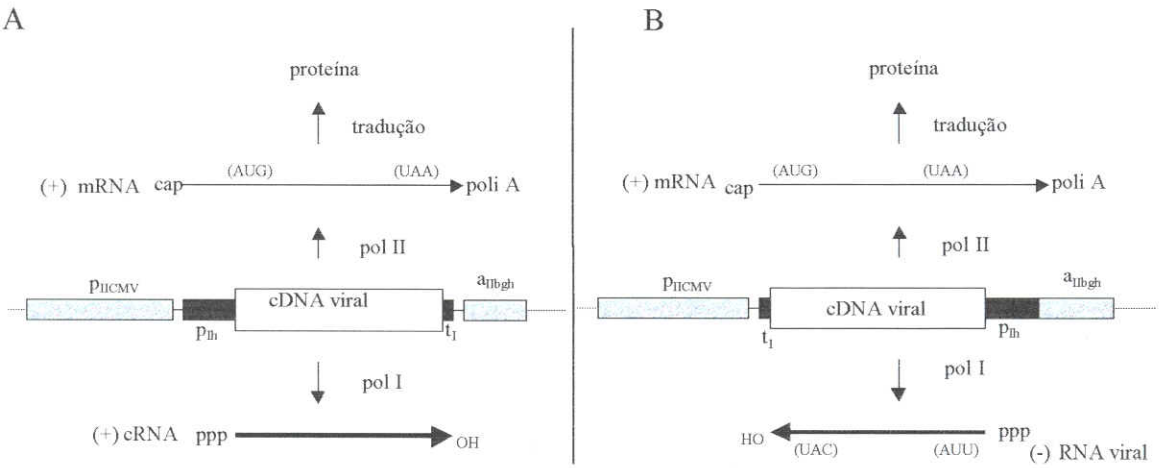


Figura 9. Sistemas de transcrição RNA polimerase I/II: unidirecional (A) e bidirecional (B) (adaptado de Hoffmann & Webster, 2000).

Estudos desenvolvidos por Hoffmann & Webster (2000) constataram que a produção de vírus obtidos a partir do sistema unidirecional foi mais baixa do que os obtidos no sistema bidirecional, indicando a associação com a diferente polaridade dos transcritos pol I. O sistema bidirecional inicia-se com a síntese intracelular do RNA viral, onde este serve como modelo para a síntese de cRNA e mRNA, enquanto que no sistema unidirecional os RNPs complementares correspondem à primeira unidade de replicação competente produzida. Para a produção de mRNAs, os cRNAs têm que ser replicados em RNAs virais e os RNPsv são por fim agregados em partículas virais. Devido às reações adicionais para a produção dos RNP viral a partir dos RNPs complementares, a formação viral no sistema unidirecional ocorre mais tardiamente que no sistema bidirecional, podendo vir a explicar os diferentes índices de produção viral destes sistemas.

2.5.6 Aplicações Futuras

As vacinas inativadas reduzem a severidade de complicações associadas à influenza, mas não previnem a infecção. A vacina viva atenuada, adaptada ao frio, desenvolvida por Maassab & Bryant (1999) e atualmente sob testes clínicos, proporciona uma melhor proteção para crianças do que as vacinas inativadas convencionalmente. No entanto, no caso dos adultos, os resultados são comparáveis às vacinas convencionalmente inativadas. Além disto, contém somente um número limitado de substituições de aminoácidos, sugerindo um risco em potencial para o aparecimento de um vírus revertendo à condição do tipo selvagem (Newmann & Kawaoka, 2001). A mesma questão sobre a possibilidade do vírus reverter ao tipo selvagem deve ser cuidadosamente observada no caso do desenvolvimento de vacinas do vírus da influenza atenuado, adaptado ao frio, para os animais.

Atualmente, diante da genética reversa através do sistema RNA polimerase I e do aprimoramento deste, com a obtenção do sistema RNA polimerase I/II, existem ferramentas para o estudo do ciclo viral em nível molecular, assim como a possibilidade de explorar o vírus da influenza como vetor e de desenvolver vacinas do vírus vivo atenuado (Newmann & Kawaoka, 2002) com um maior controle genético.

O Sistema de Genética Reversa veio proporcionar pela primeira vez condições para a modificação do genoma do vírus da influenza envolvendo mínimas dificuldades técnicas. Conseqüentemente, além de ter viabilizado a síntese e o estudo do vírus da influenza tipo A de humanos (Hoffmann *et al.*, 2000b) e o desenvolvimento de métodos para a produção de partículas incompetentes para a replicação (VLPs, "virus-like particles") (Mena *et al.*, 1996; Gómez-Puertas, *et al.*, 1999) estabeleceu também condições para a obtenção de rearranjos genéticos, visando análises inclusive no campo da Medicina Veterinária, como no caso da tese aqui apresentada.

O método clássico de rearranjo genético em uso, requer uma série de procedimentos de seleção do vírus de interesse, o que não é necessário através da técnica de Genética Reversa. Uma vez que a coleção de plasmídeos esteja disponível, principalmente diante do aprimoramento da amplificação dos segmentos genômicos do vírus da influenza pela RT-PCR (Transcriptase Reversa - PCR), a produção de rearranjos genéticos pelo Sistema de Genética Reversa poderá ser rapidamente obtida, reduzindo em dois meses os procedimentos entre a identificação de uma nova amostra e a produção da vacina. As vacinas poderiam então, encontrar-se viáveis em quatro a cinco meses (Hoffmann *et al.*, 2002a).

Da mesma forma que o Sistema de Genética Reversa propiciou a obtenção dos vírus recombinantes da influenza humana tipos A (Hoffmann *et al.*, 2000b) e B (Hoffmann *et al.*, 2002b), assim como os estudos sobre rearranjos genéticos, futuramente esta técnica poderá ser aplicada ao tipo C e a outras famílias virais (*Bunyaviridae* e *Aeranaviridae*), cujos membros, ao contrário do vírus da influenza, replicam no citoplasma (Newmann & Kawaoka, 2002).

2.6 RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA

2.6.1 Sistema de Duplo-híbridos em levedura

Muitos processos biológicos dependem de interação macromoleculares, como as interações proteína-proteína e DNA-proteína. Tradicionalmente, as interações entre duas proteínas têm sido estudadas utilizando-se técnicas bioquímicas como o "cross linking", a co-imunoprecipitação e o co-fracionamento pela cromatografia (Vidal *et al.*, 1996). Contudo, após os estudos de Brent & Ptashne (1985) que demonstraram que o domínio de ativação da proteína GAL4, um fator de transcrição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, poderia ser unido ao domínio de ligação do DNA da *Escherichia coli* LexA para criar um ativador de transcrição funcional, Fields & Song (1989) descreveram um novo método

genético conhecido como sistema de duplo-híbridos.

O sistema de duplo-híbridos parte do princípio de que as interações protéicas podem ser detectadas se duas proteínas com potencial de interação forem expressas como quimeras. Utilizando a proteína GAL4 que contém tanto o domínio de ligação, quanto o de ativação, sendo um potente ativador de transcrição quando a levedura é cultivada em meio com galactose, foi possível estruturar este sistema. O domínio de ligação da GAL4 foi fusionado com uma proteína "X" e o domínio de ativação com uma proteína "Y". Se "X" e "Y" interagissem, então a proteína GAL4 funcional era reconstituída e a ativação transcripcional poderia ser detectada (Origene Technologies, 1998).

A introdução do sistema de duplo-híbridos viabilizou o mapeamento de domínios de interação específicos de proteínas, responsáveis pela formação de complexos protéicos. Um exemplo disto foi o trabalho de Perez & Donis (1995) que através do uso deste sistema, adaptado às células de mamíferos (CV-1), mapearam a região de PB1, suficiente para a interação com PA, do vírus da influenza tipo A.

Atualmente, através do Manual versão 2.7 (Origene Technologies, 1998) existe uma versão do sistema de duplo-híbridos em levedura, conhecido como DupLEX-A™. Este sistema utiliza os mesmos princípios que o de dois-híbridos, sendo que a proteína de ligação é a proteína *E. coli* LexA, enquanto que a proteína de ativação é o domínio B42. Desta forma, vantagens como a redução do número de falsos positivos pelo uso de proteínas procarióticas (LexA e B42) do que eucarióticas (Gal4), são obtidas.

2.6.2 Sistema de Recombinação homóloga em levedura: aprimoramento e novas aplicações

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* de ligação, devido à habilidade em ser transformada por DNA externo, ao seu sistema de recombinação homóloga de alta eficiência e ao seu índice de crescimento relativamente rápido, é bem receptiva às metodologias genética e de biologia molecular. Enquanto *E. coli* produz uma geração em 30-45 min, a maioria das cepas de levedura podem dobrar em 90-120 min. Da mesma forma que a *E. coli*, a levedura também pode crescer em placas ou cultura líquida. Contudo, antibióticos que funcionam com *E coli*, não funcionam para levedura, determinando uma boa técnica de esterilização quando se trabalha com levedura. A temperatura ideal de crescimento da levedura é de 28-32°C (Origene Technologies, 1998).

A partir dos conhecimentos adquiridos desde o desenvolvimento do sistema de dois-híbridos e a introdução do sistema de recombinação homólogo em levedura, foi possível adaptar esta tecnologia de clonagem para novas pesquisas. Exemplos disto estão associados a obtenção de plasmídeos recombinantes a partir da transformação direta de células de levedura, com os produtos de PCR e o plasmídeo linearizado, trabalho desenvolvido por Kitagawa & Abdulle (2002), envolvendo o estudo da mutagênese sítio-dirigida, assim como também na presente tese. Nessa, foi utilizado pela primeira vez o Sistema de Recombinação em levedura como metodologia de clonagem dos segmentos genômicos do vírus da influenza, aplicando-os ao Sistema de Genética Reversa para a obtenção de vírus por rearranjo genético.

2.7 SISTEMA DE REPLICAÇÃO DE UM MINIGENOMA (P5): ANÁLISE DOS CLONES PB1, PB2, PA E NP

2.7.1 Análise da Expressão Genética

O procedimento mais comum para a análise da expressão genética de mamíferos *in vivo* é através da transfecção. Inicialmente, os estudos da expressão genética baseavam-se na criação de linhagens de células de clonagem que continham o promotor de interesse. Este processo consumia muito tempo e além disto, foi descoberto que a localização do cromossoma poderia ter efeitos significantes na expressão genética. Desta forma, estas considerações levaram a

adoção de protocolos em que a expressão genética fosse medida dentro de 48 horas após a introdução do DNA. A expressão então, poderia ser medida através da introdução do gene de interesse intacto e do nível de RNA produzido a partir deste gene. Contudo, este método de análise direta não é muito sensível, nem fácil de ser realizado, além de consumir muito tempo (Ausubel *et al.*, 1990).

Muitos experimentos, portanto, utilizam sistemas de ensaios transitórios, que são baseados no uso de genes fusionados. Estes sistemas consistem no promotor de interesse direcionado à síntese de uma molécula de expressão. Conseqüentemente, a quantidade de proteína de expressão sintetizada sob várias condições, presume-se refletir a habilidade do promotor em direcionar a transcrição. O objetivo é que este sistema seja baseado na síntese de uma proteína de expressão de fácil ensaio e que apresente pouco ou nenhum efeito na fisiologia da célula transfectada (Ausubel *et al.*, 1990).

Neste contexto, três sistemas de expressão preenchem todos os requerimentos, sendo estes os sistemas de ensaio do cloranfenicol acetil transferase (CAT) e da enzima luciferase, assim como o do radioimunoensaio do hormônio de crescimento humano (hGH, "human growth hormone"). Além destes, o gene da β-galactosidase também tem sido utilizado como um sistema de expressão em células eucarióticas, mas é menos sensível que os outros (Ausubel *et al.*, 1990).

No caso do CAT, este sistema de expressão constitui-se no mais utilizado e aceito para a medição da atividade do promotor, sendo de fácil aplicação e seguro. No entanto, por um motivo ainda não totalmente compreendido, o mRNA CAT acumula-se em níveis muito baixos e conseqüentemente isto pode dificultar a demonstração de que o promotor de interesse está iniciando a transcrição na posição apropriada (Ausubel *et al.*, 1990).

O ensaio da luciferase é muito mais rápido e sensível que o ensaio de CAT, não sendo necessário o uso de radioatividade. O aumento da sensibilidade é particularmente útil se a linhagem celular de interesse é difícil de ser transfectada ou se o promotor de interesse é muito rápido. No entanto, este ensaio requer um equipamento caro para medir a atividade enzimática (Ausubel *et al.*, 1990).

Diferente dos dois ensaios enzimáticos, o sistema de expressão hGH é baseado imunologicamente, empregando kits de radioiminoensaio comercialmente disponíveis e que são rápidos e convenientes em uso (Ausubel *et al.*, 1990).

2.7.2 Sistema de Expressão utilizando Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)

Cloranfenicol acetil transferase (CAT) é uma enzima bacteriana codificada por um gene de resistência à droga. Este gene não é encontrado em eucariotos e portanto, células eucarióticas não apresentam antecedentes e atividade de CAT (Promega Corporation, 2000).

CAT inativa cloranfenicol, acetilando a droga em um ou ambos os grupos hidroxil, ou seja, cataliza a transferência do grupo acil (do acetil CoA) ao cloranfenicol (Ausubel *et al.*, 1990; Promega Corporation, 2000). Esta característica, em conjunto com facilidade e sensibilidade deste ensaio para a atividade de CAT, tornou o gene para CAT um dos primeiros a ser utilizado para estudar a expressão genética de mamíferos (Promega Corporation, 2000).

A atividade de CAT pode ser monitorada no Sistema de Ensaio da enzima CAT, através de dois métodos alternativos. O mais rápido, sensível e conveniente é o método baseado no contador de cintilação líqüida (LSC, "liquid scintillation counter") dos produtos da reação de CAT. O outro método, a cromatografia de camada fina (TLC, "thin layer chromatography"), apesar de permitir a confirmação visual dos dados, leva mais tempo para ser realizado (Promega Corporation, 2000).

No sistema de ensaio de CAT, os extratos celulares são incubados numa reação contendo ^{14}C- ou ^{3}H- marcando

cloranfenicol e n-Butiril Coenzima A (N-Butiril CoA). CAT transfere o n-butiril do cofator para o cloranfenicol. No caso do ensaio de LSC, os produtos da reação são extraídos com um pequeno volume de xileno. A divisão do n-butiril cloranfenicol permanece principalmente na fase do xileno. Esta fase é misturada ao cintilante e o produto radioativo é medido com o contador de cintilação (Promega Corporation, 2000).

2.7.3 Sistema P5

O Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), descrito por Perez & Donis (1998), apresenta um plasmídeo com uma unidade de transcrição consistindo de um modelo de sistema de expressão do genoma do vírus da influenza ("reporter genome", RG), codificando para CAT (p2HHCATHdR), no sentido complementar. Os demais quatro plasmídeos, possuem unidades de transcrição que codificam para as polimerases e a NP do vírus da influenza (pcDNA774/PB1, pcDNA762/PB2, pcDNA787/PA e pcDNA693/NP).

Estes cinco plasmídeos, p2HHCATHdR, pcDNA774/PB1, pcDNA762/PB2, pcDNA787/PA e pcDNA693/NP, apresentam suas unidades de transcrição sob o controle da região promotora T7 de bacteriófago, assim como também pela região promotora RNA pol II do citomegalovírus. Desta forma, este sistema P5 pode ser transfectado em células infectadas pelo vírus vaccínia recombinante, codificando T7 RNA polimerase, que irá sintetizar as unidades de transcrição, ou sem o vírus vaccínia recombinante e neste caso, a RNA polimerase II celular irá realizar a atividade de síntese destas unidades de transcrição.

Os transcritos, precursores de RG, sintetizados no citoplasma pelo vírus vaccínia, codificando T7 RNA polimerase, sofrem um processo de clivagem, onde os RNAs resultantes (RG maduros) são idênticos ao segmento ito genômico do vírus da influenza (gene NS), flanqueando o gene para CAT (NS-CAT-NS). A transfecção dos cinco plasmídeos (P5) é necessária e suficiente para a expressão da atividade de CAT nas células, onde as atividades da transcriptase e replicase do vírus da influenza são suplementados como requisito para a produção de CAT mRNA. Conseqüentemente, a omissão dos plasmídeos, codificando para qualquer uma das quatro proteínas resulta na não expressão de CAT (Perez & Donis, 1998).

Quarenta e oito horas após a transfecção deste sistema P5, em células CV-1 (infectadas ou não pelo vírus vaccínia codificando T7 RNA polimerase) ou numa co-cultura de 293T com MDCK, o Sistema de Ensaio da enzima CAT é então aplicado (item 2.7.2), podendo a monitoração da expressão de CAT ser feita por LSC ou TLC. Desta forma, este sistema P5 é então utilizado como padrão para avaliar possíveis clones criados referentes às polimerases e NP do vírus da influenza.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais que apoiaram esta tese foram:

a) Aplicar o Sistema de Recombinação em levedura como um novo modelo de clonagem para o genoma do vírus da influenza eqüina;
b) Interagir os sistemas de Recombinação em levedura e de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000a,b) e comprovar a funcionalidade desta associação (rearranjos genéticos), visando estabelecer novas possibilidades para a obtenção da coleção de plasmídeos (Recombinação em levedura) em condições para a produção futura do vírus da influenza eqüina recombinante e de amostras vacinais (Genética Reversa);
c) Ampliar os conhecimentos sobre as características genéticas do vírus da influenza eqüina, assim como obter resultados referentes à interação genética entre os vírus da influenza humana e eqüina (rearranjos genéticos), determinando a repercussão desta na replicação viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos que direcionaram este trabalho foram:

a) Aplicar o Sistema de Recombinação em levedura, como sistema de clonagem do genoma viral, mais especificamente do vírus da influenza eqüina, para a obtenção dos plasmídeos recombinantes contendo o cDNA correspondente a cada um dos oito segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86;
b) Construir um vetor que viabilize sua utilização tanto no Sistema de Recombinação em levedura, quanto no Sistema de Genética Reversa;
c) Determinar as condições para a avaliação dos clones referentes a PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, obtidos na recombinação em levedura, principalmente quanto à expressão gênica;
d) Aplicar o Sistema de Genética Reversa, interagindo os vírus da influenza humana e eqüina, com obtenção de vírus por rearranjos genéticos, através da introdução dos plasmídeos recombinantes (diversos clones dos segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/8), obtidos pelo sistema de recombinação em levedura, e demais referentes ao vírus humano A/WSN/33, comprovando a funcionalidade da associação destes dois sistemas, inclusive para a obtenção futura do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 recombinante;
e) Iniciar os estudos sobre a interação genética entre os vírus da influenza humana e eqüina, e conseqüentemente desta sobre a replicação viral, a partir dos vírus obtidos por rearranjos genéticos, caracterizando-os quanto ao crescimento em células MDCK ("Madin-Darby canine kidney") e a morfologia de placa, em comparação com a amostra original humana, A/WSN/33.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Diante da complexidade das diversas etapas desenvolvidas nesta tese, foi estruturado um esquema seqüencial da metodologia aqui adotada, estando este presente no Anexo 8.2.

4.1 VÍRUS E CULTURA DE CÉLULAS

O vírus da influenza humana, A/WSN/33 (H1N1) recombinante, foi produzido a partir de oito plasmídeos contendo o genoma completo deste vírus (item 4.8.1), apresentando no Ensaio de Placa (item 4.9.1) título de $2x10^7$ PFU/mL. O vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (H3N8) foi obtido do estoque do laboratório do Dr. Ruben Donis (Department of Veterinary and Biomedical Sciences, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, EUA), apresentando título de $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/mL através da titulação prévia pelo método de Reed & Muench (1938).

As células MDCK ("Madin-Darby canine kidney") e 293T (rim embriônico humano), utilizadas por Hoffmann *et at.* (2000 b) numa co-cultura para garantir excelentes condições para a transfecção de DNA (células 293T) e para a replicação (células MDCK) dos vírus influenza A, também foram aqui cultivadas para a formação do estoque de trabalho desta tese, principalmente para os experimentos com transfecções. Desta forma, tanto as células MDCK, quanto as 293T foram mantidas em Meio Mínimo Essencial (MEM, "minimal essencial medium") (Nova-Tech, Inc., Grand Island, NE), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nova-Tech, Inc., Grand Island, NE) e 1% antibiótico (penicilina e estreptomicina). Inicialmente, foram cultivadas em garrafas de 150 cm^2 para a formação do estoque celular de trabalho, e incubadas a 37°C em estufas de CO_2.

Nos experimentos envolvendo as transfecções, as células 293T foram passadas em Opti-MEM I (Gibco/Invitrogen Corporation, Grand Island, NY), contendo 5% de SFB, sendo no dia seguinte preparadas em conjunto com as células

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA UFMG

MDCK para a formação da co-cultura (detalhes no item 4.8).

4.2 PRODUÇÃO VIRAL

A produção viral foi realizada conforme técnicas rotineiras do laboratório no Department of Veterinary and Biomedical Sciences, do Institute of Agriculture and Natural Resources, na University of Nebraska- Lincoln, EUA, sob orientação do Dr. Ruben Donis, descritas a seguir.

As monocamadas de células MDCK, em garrafas de 25 cm^2, contendo MEM suplementado com 10% de SFB e antibiótico, foram lavadas duas vezes com PBS (Tampão Salina Fosfato) e posteriormente inoculadas com 1 mL das amostras virais, vírus A/WSN/33 recombinante ($2x10^7$ PFU/mL) e vírus A/Equine/Kentucky/2/86 ($10^{5,5}$ $TCID_{50}$/mL).

Após o período de adsorção de 1 hora a 37°C em estufas de CO_2, o inóculo foi removido e MEM, contendo 0,3% de soro de albumina bovina (BSA, "bovine serum albumin") (Gibco/Invitrogen Corporation, Grand Island, NY), solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 4μg/mL de tripsina tratada com TPCK ("tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone") (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO), foi adicionado às células MDCK, seguido de uma nova incubação a 37°C. Após monitoração das células (48 - 72 horas pós-infecção), quando mais de 25% de efeito citopático foi observado, o meio foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 1,000 x g, sendo o sobrenadante aliquotado e armazenado a -80°C para a formação do estoque viral de trabalho.

4.3 ISOLAMENTO DE RNA

O isolamento de RNA foi realizado a partir de monocamadas de células MDCK (em garrafas de 25 cm^2), infectadas pelas amostras virais sob as mesmas condições anteriormente descritas (item 4.2). Ao apresentarem o efeito citopático na fase inicial (aproximadamente 25%), as células foram lisadas diretamente pela adição do reagente Trizol^R (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) (1 mL por 10 cm^2) e processadas de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As células lisadas foram então ressuspendidas diversas vezes, distribuídas em tubos e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, foram adicionados em cada tubo 0,2 mL de Clorofórmio (sem álcool isoamílico) para cada mL de Trizol utilizado, homogeneizando-os vigorosamente por 15 segundos e posteriormente incubando-os à temperatura ambiente por 2-3 minutos. Após este período, estes tubos foram então centrifugados por 15 minutos a 12,000 x g a 4°C. A fase aquosa obtida, foi transferida para um novo tubo para iniciar a etapa de precipitação do RNA

Isopropanol, na quantia de 0,5 mL para cada mL de Trizol utilizado inicialmente, foi misturado à fase aquosa e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, para a precipitação do RNA. Após nova centrifugação de 10 minutos a 12,000 x g a 4°C, o RNA tornou-se visível na lateral de cada um dos tubos. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos lavados com 1 mL de etanol 75%, para cada mL de Trizol utilizado. Na seqüência, cada tubo foi centrifugado a 7,500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido.

O RNA de cada amostra viral já seco, após 5-10 minutos à temperatura ambiente, foi então ressuspenso em 20 μL de 1 X TE e utilizado na RT-PCR

4.4 RT-PCR

A etapa da RT-PCR foi representada por duas fases de trabalho. A primeira fase envolveu o trabalho com os oito segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M e NS), enquanto que a segunda fase envolveu novas aplicações de RT-PCRs apenas para os segmentos PB1, PB2 e PA, com utilização de novos iniciadores através da colaboração do Dr. Daniel Perez (Assistant Professor, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, University of Maryland, EUA). O

objetivo neste caso foi o de obter novos produtos de PCRs referentes a PB1, PB2 e PA a serem aplicados na Recombinação em levedura, resultando em clones mais eficientes que os obtidos com os produtos de PCRs destes segmentos da primeira fase do trabalho.

A metodologia da RT-PCR (Hoffmann *et al.*, 2001), envolveu inicialmente a transcrição do RNA em cDNA pelo uso da Transcriptase Reversa AMV (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) e do iniciador senso, correspondente ao segmento de interesse. A reação de RT foi realizada a 42°C por 60 minutos e 1 µL desta foi utilizado para cada reação de PCR As PCRs para a amplificação do cDNA foram realizadas com 5µL 10X Tampão Taq Polimerase; 5µL 25mM $MgCl_2$; 1 µL da reação de RT; 2µL dos iniciadores senso e antisenso específicos a cada segmento (5pmoles/µL); 0,5µL Taq Polimerase (2,5U/µL) (Promega); água esterelizada completando o volume até 50µL. O primeiro ciclo do programa de amplificação consistia de um período de 4 minutos a 94ºC, seguido de 30 ciclos nas seguintes condições: 94ºC por 30 segundos, 53ºC por 20 segundos e 72ºC por 4 minutos. O programa terminava com um ciclo a 72ºC por 10 minutos.

Na primeira fase do trabalho, os segmentos PB1 (2341 nucleotídeos), PB2 (2341 nucleotídeos) e NA (aproximadamente 1413 nucleotídeos), do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, tiveram suas seqüências representadas por dois produtos de PCRs (Figura 10 e Quadro 3A).

Os "Iniciadores Universais", descritos anteriormente por Hoffmann *et al.* (2001), que são segmento-específicos para o vírus da influenza A, foram testados para os segmentos PB1 e NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, não fornecendo resultados nas respectivas PCRs. As seqüências de PB1 e NA não existem no "Los Alamos Influenza database" (http://www.flu.lanl.gov), conseqüentemente dois pares de iniciadores foram desenhados para cada segmento (PB1/ Anexo 8.1.1 a 8.1.6; NA/ Anexo 8.1.38 a 8.1.43) a partir da seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 (H7N7) (número de acesso no Genebank, M25928) e da seqüência de NA do vírus A/Equine/Tennessee/5/86 (H3N8) (número de acesso no Genebank, L06583), respectivamente. No caso de NA, o iniciador senso BA-NA-1-F-II (Anexo 8.1.38) é praticamente idêntico ao "Iniciador Universal", com a diferença no acréscimo de seis nucleotídeos ao terminal 3'.

Os dois pares de iniciadores utilizados para PB2 (Anexo 8.1.9 a 8.1.14), foram desenhados de acordo com uma pesquisa BLAST da seqüência específica deste gene do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, presente em "Los Alamos Influenza database" (números de acesso no Genebank, M73526).

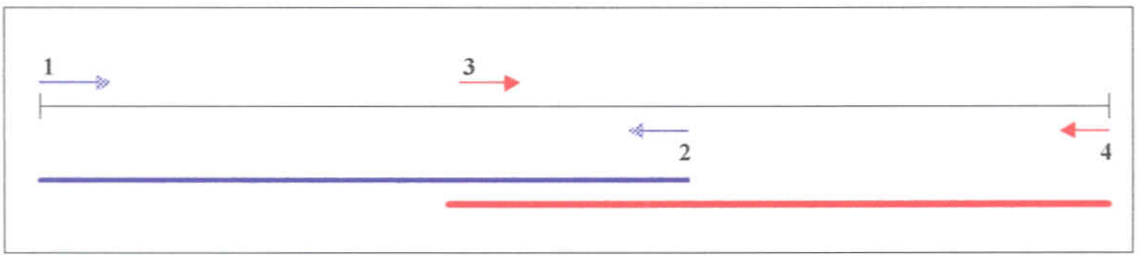


Figura 10. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PB1, PB2 e NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. Os números 1 e 3, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2 e 4, representam os iniciadores anti-senso (contidos no Quadro 3A).

Quadro 3A. Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PB1, PB2 e NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

	Amplificação do RNA viral- cDNA em duas partes			Re-amplificação da Primeira PCR: adição da seqüência para a Recombinação em levedura		
Gen	**Seqüência (PCR/produto)**	**Iniciador senso**	**Iniciador anti-senso**	**Seqüência (com HW) (PCR/produto)**	**Iniciador senso**	**Iniciador anti-senso**
PB1	K/PB1-f. ext. (1230 + 14 pb)	1)BM-PB1-1-F •	2) PB1-1230-R	K/PB1-f. ext. (1230 + 23 pb)	1) **HW**-PB1-1-F **	2) PB1-1230-R
	K/PB1-f. mid. (1200 + 15 pb)	3) PB1-1141-F	4) BM-PB1-2341-R •	K/PB1-f. mid. (1200 + 25 pb)	3) PB1-1141-F	4) **HW**-PB1-2341-R **
PB2	K/PB2-f. ext. (1193 + 14 pb)	1)BM-PB2-1-F •	2) PB2-1193-R	K/PB2-f. ext. (1193 + 23 pb)	1) **HW**-PB2-1-F **	2) PB2-1193-R
	K/PB2-f. mid. (1200 + 15 pb)	3) PB2-1111-F	4) BM-PB2-2341-R •	K/PB2-f. mid. (1200 + 25 pb)	3) PB2-1111-F	4) **HW**-PB2-2341-R **
NA	K/NA-f. ext. (840 + 14 pb)	1)BA-NA-1-F-II•	2) NA-840-R	K/NA-f. ext. (840 + 23 pb)	1) **HW**-NA-1-F **	2) NA-840-R
	K/NA-f. mid. (662 + 15 pb)	3) NA-751-F	4)BA-NA-1413-R •	K/NA-f. mid. (662 + 25 pb)	3) NA-751-F	4) **HW**-NA-1413-R **

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.1 a 8.1.6 /PB1; 8.1.9 a 8.1.14 /PB2; 8.1.38 a 8.1.43 /NA).

**HW: corresponde a cada iniciador contendo um fragmento do vetor pJG2000 (item 4.5) (23 nucleotídeos para os iniciadores senso e 25 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso), utilizado na Recombinação em levedura.

• Iniciadores com seqüências de reconhecimento para *Bsm*BI (BM) ou *Bsa*I (BA) (14 nucleotídeos para os iniciadores senso e 15 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso).

No caso dos segmentos PA (2233 nucleotídeos) e HA (1762 nucleotídeos) do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, cuja seqüência de PA não existe no "Los Alamos Influenza database" e de HA está presente (números de acesso no Genebank, M24727), o processo para a obtenção de resultados nas PCRs correspondentes a estes segmentos foi um pouco mais trabalhoso. Inicialmente, foram testados para ambos os segmentos os "Iniciadores Universais" (Hoffmann *et al.*, 2001), sem que nenhuma das respectivas reações fornecessem resultados. Posteriormente foi desenhado mais um par de iniciadores, baseado na seqüência de PA do vírus A/Equine/Tennessee/5/86 (H3N8) (número de acesso no Genebank, M26082) e do próprio gene HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, respectivamente, a serem utilizados com o par de "Iniciadores Universais" para a obtenção de dois produtos de PCRs correspondentes a estes segmentos. Novamente os resultados foram negativos e desta forma, quatro pares de iniciadores foram desenhados para cada segmento, num total de oito iniciadores para PA (Anexo 8.1.17 a 8.1.24) e HA (Anexo 8.1.27 a 8.1.33), resultando em 4 produtos de PCRs correspondentes a cada um destes segmentos (Figura 11 e Quadro 3B).

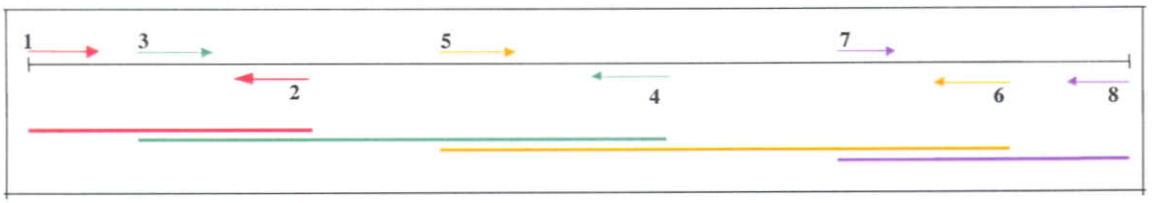


Figura 11. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PA e HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. Os números 1, 3, 5 e 7, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2, 4, 6 e 8 representam os iniciadores anti-senso (contidos na Tabela 3B).

Quadro 3B. Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PA e HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

	Amplificação do RNA viral-cDNA em quatro partes		
Gen	**Seqüência (PCR/produto)**	**Iniciador senso**	**Iniciador anti-senso**
PA	K/PA F. HW-1 (127 + 23 pb)	1) **HW**-PA-1-F-II **	2) EqPA-127-R
	K/PA F. 64 (1118 pb)	3) PA-64-F	4) PA- 1182-R
	K/PA F. 1111 (1045 pb)	5) PA-1111-F	6) PA-2134-R
	K/PA F. 2110 (123 + 25 pb)	7) EqPA-2110-F	8) **HW**-PA-2233-R **
HA	K/HA F. HW-1 (120 + 23 pb)	1) **HW**-HA-1-F **	2) KyH3HA-120-R
	K/HA F. 69 (889 pb)	3) HA-69-F	4) HA-958-R
	K/HA F. 869 (834 pb)	5) HA-869-F	6) HA-1703-R
	K/HA F. 1642 (120 + 25 pb)	7) KyHAHA-1642-F	8) **HW**-NS-890-R • **

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.17 a 8.1.24 /PA; 8.1.27 a 8.1.33 /HA).

** **HW**: corresponde a cada iniciador contendo um fragmento do vetor pJG2000 (item 4.5) (23 nucleotídeos para os iniciadores senso e 25 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso), utilizado na Recombinação em levedura.

• O iniciador anti-senso para a seqüência K/HA F.1642, é idêntico ao anti-senso do segmento NS.

No caso dos segmentos NP (1565 nucleotídeos), M (1027 nucleotídeos) e NS (890 nucleotídeos) do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, estes foram representados por apenas um produto de PCR (Figura 12 e Quadro 3C). Os iniciadores utilizados tanto para NP (Anexo 8.1.34 e 8. 1.35), quanto para M (Anexo 8.1.44 e 8.1.45) e NS (Anexo 8.1.48 e 8.1.49) foram os "Iniciadores Universais" (Hoffmann *et al.*, 2001), apesar da seqüência do segmento NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 não existir em "Los Alamos Influenza database", ao contrário das seqüências de NP (número de acesso no Genebank, M30751) e M (número de acesso no Genebank, M63540).



Figura 12. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos NP, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na primeira fase do trabalho. O número 1 corresponde ao iniciador senso, enquanto que o número 2 representa o iniciador anti-senso (contidos na Quadro 3C).

Quadro 3C. Iniciadores* utilizados na primeira fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos NP, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

	Amplificação do RNA viral-cDNA em uma parte			Re-amplificação da Primeira PCR: adição da seqüência para a Recombinação em levedura		
Gen	**Seqüência (PCR/produto)**	**Iniciador senso •**	**Iniciador anti-senso •**	**Seqüência (com HW) (PCR/produto)**	**Iniciador senso ****	**Iniciador anti-senso ****
NP	K/NP (1565 + 29 pb)	1)BM-NP-1-F°	2) BM-NP-1565-R °	K/NP (1565 + 45 pb)	1) **HW**-NP-1-F	2) **HW**-NP-1565-R
M	K/M (1027 + 29 pb)	1)BM-M-1-F °	2) BM-M-1027-R °	K/M (1027 + 45 pb)	1) **HW**-M-1-F	2) **HW**-M-1027-R
NS	K/NS (890 + 29 pb)	1)BM-NS-1-F°	2) BM-NS-890-R °	K/NS (890 + 45 pb)	1) **HW**-NS-1-F	2) **HW**-NS - 890-R

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.34 a 8.1.37 /NP; 8.1.44 a 8.1.47 /M; 8.1.48 a 8.1.51 /NS).

****HW**: corresponde a cada iniciador contendo um fragmento do vetor pJG2000 (item 4.5) (23 nucleotídeos para os iniciadores senso e 25 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso), utilizado na Recombinação em levedura.

• Iniciadores com seqüências de reconhecimento para *Bsm*BI (BM) (14 nucleotídeos para os iniciadores senso e 15 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso). ° (Hoffmann *et al.*, 2001).

Na seqüência, ainda dentro da primeira fase do trabalho, a partir dos resultados das PCRs dos oito segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, um segundo PCR foi realizado para os segmentos PB1, PB2, NP, NA, M e NS, utilizando os produtos das PCRs iniciais como moldes, assim como os iniciadores respectivos a estes segmentos, contendo um fragmento do vetor pJG2000 correspondente à uma seqüência idêntica a 23 ou 25 pb distante do sítio de clonagem nesse vetor (identificados pelo HW na nomenclatura de cada iniciador, presentes nos Quadros 3A e 3C). Desta forma, estes novos produtos de PCRs puderam ser aplicados à Recombinação em levedura com o vetor pJG2000, por apresentarem um fragmento deste vetor. No caso dos quatro produtos das PCRs iniciais de PA e HA, estes já tinham sido obtidos a partir de iniciadores contendo um fragmento do vetor pJG2000 (Quadro 3B).

A não utilização de iniciadores já contendo o fragmento do vetor pJG2000, nas PCRs iniciais, mas sim de iniciadores contendo a seqüência da enzima *Bsa*I ou *Bsm*BI, viabilizava a possibilidade em aplicar a técnica de ligação no lugar da Recombinação em levedura, caso fosse necessário.

Na segunda fase do trabalho, os segmentos PB1, PB2 e PA foram novamente estudados e trabalhados em RT-PCRs com diferentes iniciadores ou a partir de novos isolamentos de RNA, através da colaboração do Dr. Daniel Perez. Todos os três segmentos tiveram suas seqüências representadas por dois produtos de PCRs (Figura 13).

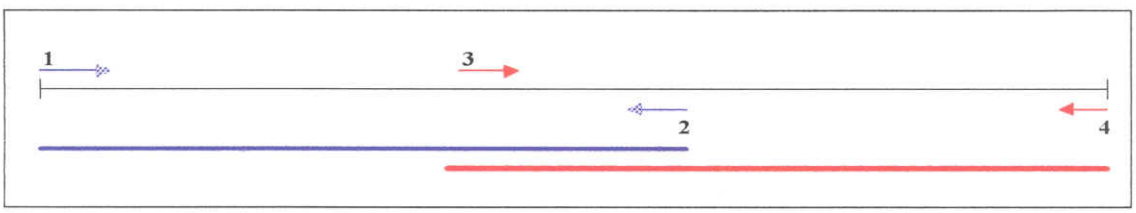


Figura 13. Representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção dos segmentos PB1, PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, na segunda fase do trabalho. Os números 1 e 3, correspondem aos iniciadores senso, enquanto que os números 2 e 4, representam os iniciadores anti-senso (contidos nos Quadros 4A e 4B).

No caso do segmento PB1 do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, a obtenção destes dois produtos de PCRs foi feita de duas formas distintas: Grupo A) através da utilização de dois pares de iniciadores para PB1, onde cada par apresentava um iniciador com um fragmento do vetor pJG2000 (Anexo 8.1.3 e 8.1.6) e um iniciador desenhado pelo Dr. Daniel Perez (Anexo 8.1.7 e 8.1.8); Grupo B) a partir de um novo isolamento de RNA e RT-PCR, com aplicação dos mesmos iniciadores utilizados na primeira fase para PB1, já contendo um fragmento do vetor pJG2000 (Anexo 8.1.2 a 8. 1.4 e 8. 1.6) (Quadro 4A).

Quadro 4A. Iniciadores* utilizados na segunda fase do trabalho, para RT-PCR do segmento PB1 do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, em dois grupos distintos.

	Amplificação do RNA viral-cDNA em duas partes			
Gen	**Seqüência (PCR/produto)**	**Clones**	**Iniciador senso**	**Iniciador anti-senso**
PB1 (Grupo A)	PB1.1EqR (inferior a 2 kb)	----	1) **HW**-PB1-1-F **	2) BmPB1EqKyR •°
	PB1EqF2341 (inferior a 2 kb)	----	3) BmPB1EqKyF •°	4) **HW**-PB1-2341-R **
PB1 (Grupo B)	K/PB1-f. ext. (inferior a 2 kb)	----	1) **HW**-PB1-1-F **	2) PB1-1230-R
	K/PB1-f. mid. (inferior a 2 kb)	----	3) PB1-1141-F	4) **HW**-PB1-2341-R **

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.3 e 8.1.6 a 8.1.8 / Grupo A; 8.1.2 a 8.1.4 e 8.1.6 / Grupo B).

**HW: corresponde a cada iniciador contendo um fragmento do vetor pJG2000 (item 4.5) (23 nucleotídeos para os iniciadores senso e 25 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso), utilizado na Recombinação em levedura.

° Iniciadores fornecidos pelo Dr. Daniel Perez.

• Iniciadores com seqüências de reconhecimento para *Bsm*BI (BM) (14 nucleotídeos para os iniciadores senso e 15 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso).

No caso de PB2, que também teve a seqüência representada por dois produtos de PCRs (Figura 13) (PB2.1EqR e PB2EqF2341), dois clones (3 e 5) referentes à seqüência PB2EqF2341 foram obtidos através do Quick Ligation Kit (New England BioLabs Inc., Beverly, MA), ligando a PCR desta seqüência digerido com a enzima *Bsa*I, com o vetor pDP2002 digerido com *Bsm*BI (material fornecido pelo Dr. Daniel Perez). Conseqüentemente, ambos os clones foram purificados através do QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAprep Miniprep Handbook 10/2001, QIAGEN) e apenas o clone 5 purificado foi utilizado como modelo para um novo PCR, a ser utilizado na recombinação em levedura, enquanto que o clone 3 foi armazenado a -80°C.

A PCR da seqüência PB2EqF2341 (clone 5), foi então realizado através da utilização dos iniciadores senso (Anexo 8.1.15) (fornecido pelo Dr. Daniel Perez) e anti-senso, contendo um fragmento do vetor pJG2000 (Anexo 8.1.14), ambos referentes ao segmento PB2, sendo o produto deste PCR viável à aplicação na Recombinação em Levedura, em conjunto com o vetor pJG2000 e o produto de PCR correspondente ao restante da seqüência do segmento PB2 (PB2.1EqR). A seqüência PB2.1EqR não foi obtida a partir de um clone (molde), mas sim a partir do isolamento de RNA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e aplicação de RT-PCR. Foram utilizados um iniciador senso, contendo um fragmento do vetor pJG2000 (Anexo 8.1.11) e um iniciador anti-senso, fornecido pelo pelo Dr. Daniel Perez (Anexo 8.1.16) (Quadro 4B).

O segmento PA, nesta segunda fase, foi representado apenas por dois produtos de PCRs (diferente da primeira fase), onde a seqüência PAEq1 correspondeu ao clone 9 e a seqüência PAEqF2233, aos clones 6 e

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA DA UFMG

13. Estes clones foram obtidos através do Quick Ligation Kit, ligando as respectivas seqüência com o vetor pDP2002 (após digeridos com *Bsm*BI), com a colaboração do Dr. Daniel Perez. Consequentemente, para serem utilizados na Recombinação em levedura, os clones 9 (PAEq1) e 13 (PAEqF2233) foram purificados e aplicados como modelos para as respectivas PCRs, através de iniciadores para estas seqüências (Anexo 8.1.25 e 8.1.26) associados aos iniciadores contendo um fragmento do vetor pJG2000 (Anexo 8.1.17 e 8. 1.24) (Quadro 4B).

Quadro 4B. Iniciadores* utilizados na segunda fase do trabalho, para RT-PCR dos segmentos PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

	Amplificação do RNA viral-cDNA em duas partes			
Gen	**Seqüência (PCR/produto)**	**Clones**	**Iniciador senso**	**Iniciador anti-senso**
PB2	PB2.1EqR (1789 + 23 + 15 pb)	----	1) **HW**-PB2-1-F **	2) BaPB2EqKyR ••
	PB2EqF2341 (1460 + 14 + 25 pb)	a) 3 **b) 5**	3) BaPB2EqKyF ••	4) **HW**-PB2-2341-R **
PA	PA.1EqR (inferior a 2 kb)	**a) 9**	1) **HW**-PA-1-F-II **	2) BmPAEqKyR ••
	PAEqF2233 (inferior a 2 kb)	a) 6 **b) 13**	3) BmPAEqKyF ••	4) **HW**-PA-2233-R **

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.11 e 8.1.14 a 8.1. 16 /PB2; 8.1.17 e 8.1.24 a 8.1.26 / PA) • Iniciadores fornecidos pelo Dr. Daniel Perez.

** **HW**: corresponde a cada iniciador contendo um fragmento do vetor pJG2000 item 4.5) (23 nucleotídeos para os iniciadores senso e 25 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso), utilizado na Recombinação em levedura.

• Iniciadores com seqüências de reconhecimento para *Bsm*BI (BM) (14 nucleotídeos para os iniciadores senso e 15 nucleotídeos para os iniciadores anti-senso).

No caso específico do segmento NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, que além de ter sido trabalhado na primeira fase das RT-PCRs, também foi novamente trabalhado pelos mesmos motivos que os segmentos PB1, PB2 e PA (obtenção de novos produtos de PCRs para a construção de clones mais eficientes), a exceção foi que o produto de PCR de NP não foi submetido à recombinação em levedura, mas sim ao processo de ligação. O Dr. Daniel Perez gentilmente forneceu os clones deste segmento (pDP2002-NPEq) para serem diretamente avaliados nesta tese através do Sistema de Genética Reversa (item 4.8.2).

Conforme informações fornecidas pelo Dr. Daniel Perez, esta seqüência de NP foi também obtida a partir dos "iniciadores universais" para NP (Hoffmann *et al.*, 2001), sendo então digerida com *Bsm*BI e submetida ao Quick Ligation Kit (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) com um vetor denominado pDP2002, desenvolvido pelo próprio Dr. Daniel Perez para a construção dos clones. Este vetor é semelhante ao vetor pHW2000 (2980 pb) (Hoffmann *et al.*, 2000b), que será mencionado de forma mais detalhada no próximo item, possuindo um número maior de pares de bases entre os dois sítios de *Bsm*BI para facilitar os procedimentos de digestão com esta enzima.

4.5 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pJG2000

Diante da necessidade de um vetor que pudesse ser aplicado tanto no sistema de Recombinação em levedura, quanto no sistema de Genética Reversa, o vetor pJG2000 foi construído. Este processo requisitou a seleção de dois vetores, o plasmídeo pHW2000 (2980 pb), fornecido pelo Dr. Erich Hoffmann do Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, EUA (Hoffmann *et al.*, 2000b) e plasmídeo pJG4.5 (6449 pb) (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD).

O vetor pHW2000 apresentava a estrutura para o sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II (Figura 14), viabilizando a fusão precisa do cDNA viral na orientação de sentido negativo entre regiões promotora (p_{Ih}) e terminadora de pol I (t_I). Neste plasmídeo, dois sítios *Bsm*BI, para inserção do cDNA, estavam flanqueados pelas regiões promotora (225 pb) e terminadora (33 pb) de pol I, estando esta unidade de transcrição pol I numa orientação de sentido positivo entre as seqüências promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (p_{IICMV}) e pelo sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (a_{IIbgh}). Esta construção teria que estar presente no novo vetor pJG2000 para que este pudesse ser aplicado ao sistema de Genética Reversa, produzindo RNA viral e mRNA, mediante inserção do cDNA viral.

Da mesma forma, o vetor pJG4.5 apresentava o marcador triptofano e o gene de resistência à ampicilina, que viabilizavam tanto a propagação em levedura em meio sem triptofano, quanto em *Escherichia coli* em meio de Luria - Berlani com ampicilina (LB + Amp), respectivamente, necessários ao pJG2000 para ser aplicado ao Sistema de Recombinação em levedura.

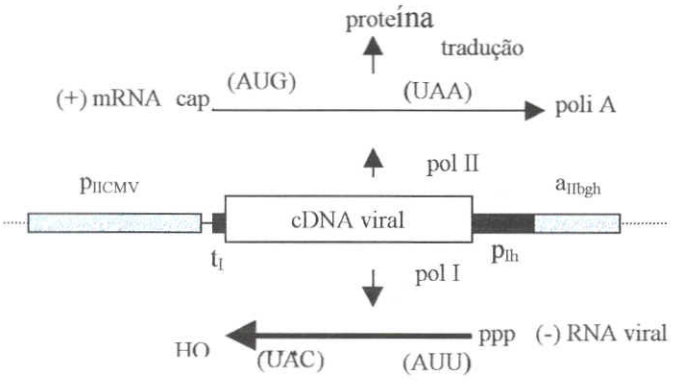


Figura 14. Representação esquemática do sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II, com produção de RNA viral e mRNA (adaptado de Hoffmann & Webster, 2000). O cDNA viral é inserido numa orientação de sentido negativo entre as seqüências promotora (p_{Ih}) e terminadora de pol I (t_I), estando esta unidade inteira de transcrição pol I numa orientação de sentido positivo entre a região promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (p_{IICMV}) e o sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (a_{IIbgh}).

Neste contexto, o vetor pHW2000 foi digerido com as enzimas de restrição *Ssp*I e *Afl*II (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) (Figura 15A) e pJG4.5 com *Pvu*II (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) e *Afl*II (Figura 15B). A digestão de pJG4.5 foi tratada com fosfatase alcalina (CIAP) (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) por 1 hora a 37°C.

Os fragmento de pHW2000-*Ssp*I/*Afl*II (1285 pb), contendo a estrutura para o sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II, e o de pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*II (6271 pb), contendo o marcador triptofano e o gene de resistência à ampicilina, foram purificados através do procedimento de "Gene Clean" (www.bio101.com) e ligados a 15°C durante à noite, com T4 DNA Ligase (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) (Figura 15B). Eletroporação foi utilizada para transformar *Escherichia coli* (amostra DH10B) com a ligação, sendo posteriormente plaqueada em LB + Amp e incubada a 37°C durante a noite. As colônias obtidas foram purificadas (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol,

QIAGEN) e testadas, através da digestão com *Bsm*BI (New England BioLabs Inc., Beverly, MA) e análise por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, confirmando a construção do vetor pJG2000 (7556 pb) (Figura 15C).

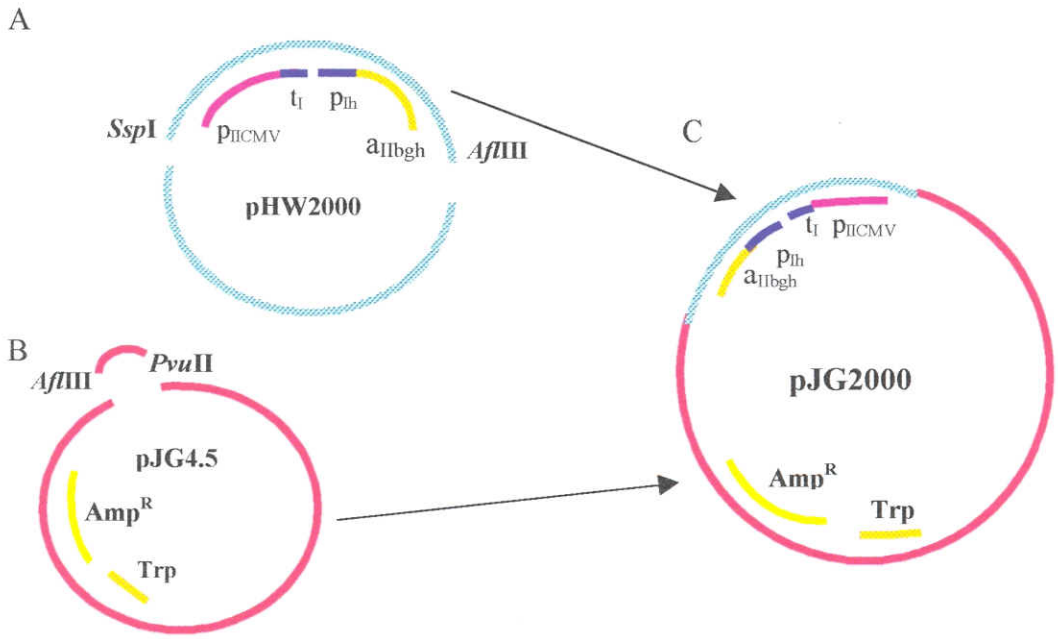


Figura 15. Representação esquemática da construção do vetor de clonagem pJG2000. (A) Vetor pHW2000 digerido com as enzimas de restrição *Ssp*I e *Afl*III; (B) Vetor pJG4.5 digerido com as enzimas de restrição *Afl*III e *Pvu*II. (C) Fragmentos, pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III (1285 pb), contendo a estrutura para o sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II e pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III (6271 pb), contendo o marcador triptofano (Trp) e o gene de resistência à ampicilina (Amp^R) ligados, originando o vetor pJG2000.

4.6 SISTEMA DE CLONAGEM: RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA

O sistema de clonagem através da Recombinação em levedura, segundo protocolo desenvolvido por Delin Liang, Pós-doutorando no laboratório do Department of Veterinary and Biomedical Sciences, do Institute of Agriculture and Natural Resources, na University of Nebraska- Lincoln, EUA, sob orientação do Dr. Ruben Donis, a partir dos conhecimentos sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o seu potencial de recombinação homóloga, como é verificado no Manual versão 2.7 (Origene Technologies, 1998), foi aplicado ao vetor pJG2000 linearizado, em conjunto com os produtos de PCRs (Figura 16 A, B, C e D), tanto da primeira fase do trabalho (Quadro 5), quanto da segunda fase (Quadro 6), que continham um fragmento de pJG2000.

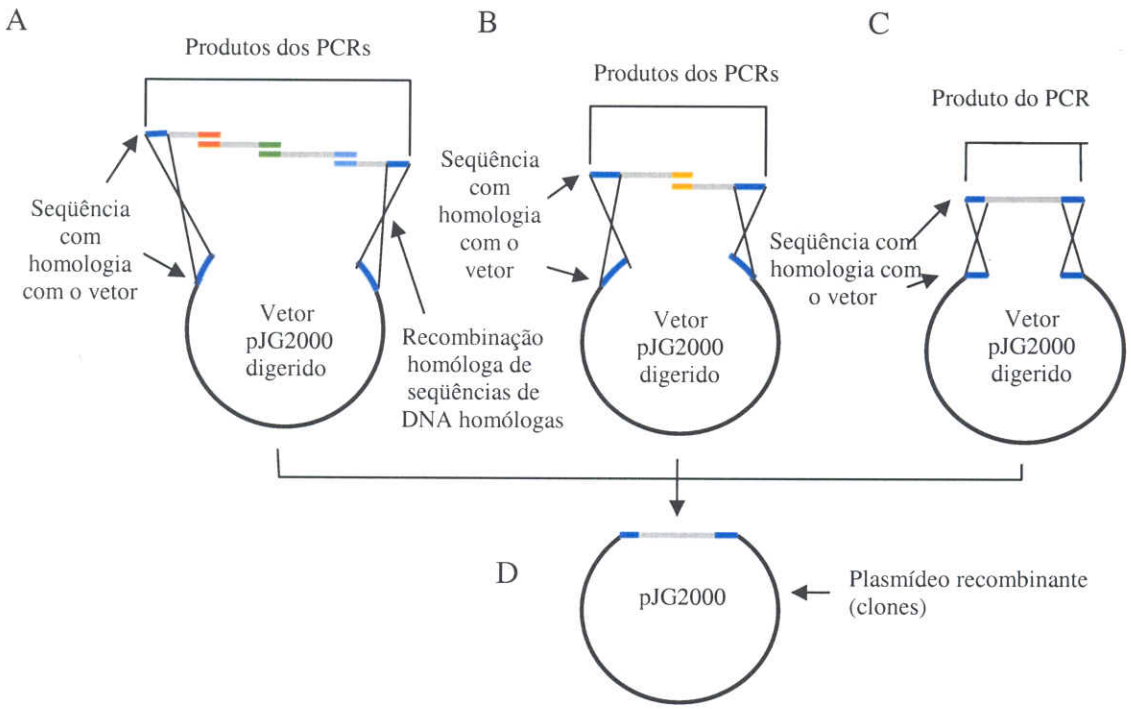


Figura 16. Representação esquemática do sistema de clonagem através da Recombinação em levedura. (A) Quatro produtos de PCRs, correspondentes aos segmentos PA (primeira fase do trabalho) ou HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura com o vetor pJG2000 digerido com *Bsm*BI (linearizado) e tratado com fosfatase alcalina (CIAP). (B) Dois produtos de PCRs, correspondentes aos segmentos PB1, PB2, PA (segunda fase do trabalho) ou NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura. (C) Um produto de PCR, correspondente aos segmentos NP, M ou NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, aplicados ao sistema de Recombinação em levedura. (D) Vetor pJG2000 com presença do cDNA correspondente a um dos oito segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, que através da Recombinação em levedura resulta em diversos clones.

Quadro 5. Seqüências representantes dos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (primeira fase do trabalho), utilizadas na recombinação em levedura.

GENE	SEQÜÊNCIAS (Produtos das PCRs)	GENE	SEQÜÊNCIAS (Produtos das PCRs)
PB1	K/PB1-f. ext. *	PB2	K/PB2-f. ext. *
	K/PB1-f. mid. *		K/PB2-f. mid. *
PA	K/PA F. 64	HA	K/HA F. 69
	K/PA F. 1111		K/HA F. 869
	K/PA F. HW-1 *		K/HA F. HW-1 *
	K/PA F. 2110 *		K/HA F. 1642 *
NA	K/NA-f. ext. *	NP	K/NP *
	K/NA-f. mid. *	M	K/M *
		NS	K/NS *

* Todas estas seqüências apresentam um fragmento do vetor pjg2000, para a Recombinação em levedura.

Quadro 6. Seqüências* representantes dos segmentos PB1 (Grupos A e B), PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (segunda fase do trabalho), utilizadas na recombinação em levedura. Todas estas seqüências apresentam um fragmento do vetor pJG2000, para a Recombinação em levedura.

GENE	SEQÜÊNCIAS (Produtos das PCRs)	GENE	SEQÜÊNCIAS (Produtos das PCRs)
PB1 (Grupo A)	PB1.1EqR	PB1 (Grupo B)	K/PB1-f. ext.
	PB1EqF2341		K/PB1-f. mid.
PB2	PB2.1EqR	PA	PA.1EqR
	PB2EqF2341		PAEqF2233

* Todas estas seqüências apresentam um fragmento do vetor pjg2000, para a Recombinação em levedura.

Inicialmente, os produtos dos PCRs representantes dos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, foram purificados através do "Gene Clean", conforme rotina laboratorial, e o vetor pJG2000, foi digerido com a enzima *Bsm*BI, tratado com CIAP e purificado pela extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol.

A levedura, RFY206 (MATa *trpΔ::hisG his3Δ200 ura3-52 lys2Δ201 leu2-3*) (OriGene Technologies, Inc., MD), foi cultivada em 5 mL de meio de crescimento para levedura, contendo peptona e glucose (YPD), a 30°C, num misturador, durante a noite. A partir da cultura de 5 mL, 20 mL de YPD foram inoculados a OD_{600} = 0,1. Após 5,5-6 horas de nova incubação e já apresentando OD_{600} = 0,55, as células foram sedimentadas, lavadas com água esterilizada e ressuspendidas em 1 mL de 1 X TE / LiOAc. Em seguida, o material foi rapidamente centrifugado (microcentrífuga) e o sobrenadante removido, estando então a levedura pronta para receber o vetor e os respectivos produtos dos PCRs.

O vetor pJG2000 linearizado (100 - 300 ng) foi misturado com DNA carreador ("Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type III from Salmon Tests", Sigma D1626), 10 X TE, 10 X LiOAc e o(s) respectivo(s) fragmento(s) de PCR(s) (1-10 vezes mais que pJG2000), referente(s) a um dos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Este DNA misturado foi então adicionado ao sedimento da levedura em conjunto com 1 X TE / LiOAc / "Polyethylene glycol" (PEG 3350 50%) e incubado por 30 minutos a 30°C. Ao término deste período, dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) foi adicionado e após uma incubação de 20 minutos a 42°C, seguida de uma rápida centrifugação (microcentrífuga), o sedimento final foi obtido.

Uma solução contendo 100X leucina, histidina e uracil foi utilizada para ressuspender o sedimento e espalha-lo em placas com meio de crescimento seletivo de levedura (YNB) que contém glucose e base nitrogenada para levedura, com aminoácidos, exceto triptofano (Glu - Trp).

Após 2-3 dias de incubação a 30°C, as colônias presentes nas placas passaram pela etapa de recuperação do plasmídeo, conforme instruções contidas no DupLEX-A™, Manual versão 2.7 (Origene Technologies, 1998) e posteriormente foram submetidas à transformação em *E. coli* (DH10B), através do eletroporador (BTX Genetronics ECM 600). Após cada amostra ser plaqueada em LB+Amp e incubada durante à noite a 37°C, as novas colônias obtidas foram então purificadas e cada clone avaliado (item 4.7)

4.7 AVALIAÇÃO DOS CLONES

Todos os clones obtidos pela Recombinação em levedura foram purificados e submetidos inicialmente a testes envolvendo digestões, com análise dos resultados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (item 4.7.1). No caso dos clones referentes aos segmentos PB1, PB2, PA e NP (primeira fase do trabalho), esses após os testes iniciais, apresentando resultados positivos, foram avaliados a partir da aplicação no Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), com análise da atividade de CAT (item 4.7.2). Na seqüência, dois clones referentes à PB1 e NP foram sequenciados pelo "Genomics Core Research Facility" (http://greengene.unl.edu/) para a obtenção de informações complementares aos resultados verificados no Ensaio com CAT.

Os clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS, após as análises das digestões (testes iniciais) foram aplicados ao Sistema de Genética Reversa para a obtenção dos vírus por rearranjos genéticos.

Os clones representantes dos segmentos NP, fornecidos pelo Dr Daniel Perez (item 4.4), PB2 e PB1/ Grupo A (todos da segunda fase do trabalho), avaliados inicialmente em digestões, foram aplicados ao Sistema de Genética Reversa (rearranjos genéticos), enquanto que os clones desta mesma fase do trabalho, correspondentes a PB1/ Grupo B e PA foram estocados a -80°C, para futuras pesquisas.

4.7.1 Avaliações iniciais: digestões e análise da eletroforese em gel de agarose

A avaliação inicial dos clones purificados para identificação daquele contendo a seqüência do segmento genômico de interesse, foi realizada através da comparação entre os resultados da digestão do vetor pJG2000, com a enzima de restrição *Eco*RV (New England BioLabs Inc., Beverly, MA), e o das digestões dos respectivos clones com a mesma enzima. Através da análise dos tamanhos moleculares dos fragmentos apresentados na eletroforese em gel de 1% agarose corado com brometo de etídio, foi possível identificar o(s) clone(s) inicialmente considerado(s) positivo(s), uma vez que o vetor pJG2000 apresentava dois sítios de restrição para *Eco*RV e consequentemente pela digestão, indicaria a presença ou não do segmento de interesse.

4.7.2 Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5) e Ensaio de CAT

Os clones correspondentes aos segmentos PB1, PB2, PA e NP (primeira fase do trabalho), obtidos pela Recombinação em levedura e após terem sido considerados como positivos pela análise das digestões com *Eco*RV, foram aplicados ao Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), utilizando os plasmídeos pcDNA774/PB1, pcDNA762/PB2, pcDNA787/PA, pcDNA693/NP e p2HHCATHdR (PEREZ & DONIS, 1998), provenientes do estoque do laboratório do Dr. Ruben Donis (Department of Veterinary and Biomedical Sciences).

No caso, pcDNA774/PB1, pcDNA762/PB2, pcDNA787/PA, pcDNA693/NP e p2HHCATHdR, foram transfectados numa co-cultura de células 293T e MDCK, na presença de Lipofectamina (Invitrogen), sendo esta transfecção utilizada como controle positivo (P5). Da mesma forma, a transfecção dos mesmos plasmídeos, sem o pcDNA762/PB2, foi utilizado como controle negativo (P4), enquanto que simultaneamente eram realizadas as transfecções alternadas de cada clone (referentes aos segmentos PB1, PB2, PA e NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86) a ser testado com os quatro demais plasmídeos, incluindo sempre o p2HHCATHdR, deste Sistema P5.

Quarenta e oito horas pós-transfecções, iniciaram-se os procedimentos para a avaliação da expressão genética, monitorando a atividade de CAT, através do Ensaio de CAT (Promega Corporation, 2000). Desta forma, as células (transfectadas) foram incubadas com o tampão TEN (40 Mm Tris-HCl pH 7,5, 1 mM Na_2EDTA, 150 Mm NaCl), no gelo e após serem lisadas, foram rapidamente centrifugadas e ressuspendidas em 80 μL

de 0,25M Tris-HCl (pH 7,5). Na seqüência, passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento e então uma alíquota de 35 μL foi removida, sendo o restante armazenado a - 80°C.

Os 35 μL de extrato celular foram incubados em 90 μL de uma reação contendo 5 μL de n-Butiril CoA (5mg/mL) (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO), 3 μL de [^{14}C]-Cloranfenicol (0,05 mCi/mL) (ICN Biomedicals, Inc., Los Angeles, CA) e 0,25M Tris-HCl (pH 7,5) por 1 hora a 37°C. Os produtos desta reação foram extraídos com 300 μL de uma solução de xilenos (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) para o Ensaio de LSC, conforme Promega Corporation, 2000.

O substrato residual foi extraído duas vezes da fase orgânica, utilizando-se 100 μL de 0,25M Tris-HCl (pH 8,0), para uma maior sensibilidade. A fase com xileno foi então misturada com o fluido de cintilação (MICROSCINT^{TM} 20; Packard Instruments Company, Inc., Meriden, CT) e o produto radioativo medido através do contador de cintilação.

4.8 SISTEMA DE GENÉTICA REVERSA

A metodologia do Sistema de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000a,b), apresentando uma transcrição bidirecional (Hoffmann & Webster, 2000), foi adotada para produção do vírus A/WSN/33 recombinante, utilizado como controle positivo nos experimentos por já ter sido obtido anteriormente (Hoffmann *et al.*, 2000b), assim como para a análise dos clones referentes aos segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (recombinação em levedura), ao interagirem com demais segmentos do vírus A/WSN/33, para a obtenção de vírus por rearranjos genéticos.

Inicialmente, uma cultura de células MDCK, mantidas em MEM suplementado com 10% SFB, e células 293T, crescidas em OptiMEM I, contendo 5% SFB, foi preparada. No dia anterior à transfecção, as células MDCK e 293T confluentes em garrafas de 75 cm^2, foram tripsinizadas e 10% de cada linhagem celular foi misturado a 18 mL de OptiMEM I, sendo 3 mL desta suspensão colocados em um poço (35 mm) de placa de 6-poços. Esta co-cultura de células MDCK e 293T (0,2 - 1 x 10^6 células por poço) foi então utilizada para os experimentos de transfecção.

Na etapa seguinte, 1μg de cada um dos plasmídeos contendo os cDNAs representantes dos segmentos genômicos do vírus da Influenza foram misturados à Lipofectamina (2μL por μg de DNA) e incubados por 45 minutos, sendo posteriormente adicionados às células. Seis horas após a incubação das células a 37°C, a mistura de transfecção de DNA foi substituída pelo OptiMEM I, contendo 0,3% de BSA e antibiótico (penicilina e estreptomicina), sendo realizada uma nova incubação a 37°C por 30 horas. Na seqüência, 1mL de OptiMEM I, contendo tripsina tratada com TPCK (4μg/mL) para facilitar a ligação ao receptor celular e à penetração viral (ativação da molécula de HA), foi adicionado às células e então, estas foram monitoradas, 48-72 horas (tempo após adicionar às células a reação de transfecção), para a detecção de efeito citopático.

4.8.1 Vírus A/WSN/33 recombinante

O vírus A/WSN/33 recombinante foi obtido através do Sistema de Genética Reversa, transfectando-se numa co-cultura de células MDCK e 293T, os oito plasmídeos contendo os cDNAs do vírus A/WSN/33, pHW181-PB2, pHW182-PB1, pHW183-PA, pHW184-HA, pHW185-NP, pHW186-NA, pHW187-M e pHW188-NS (Figura 17), gentilmente fornecidos pelo Dr. Erich Hoffmann do Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, EUA (Hoffmann *et al.*, 2000b).

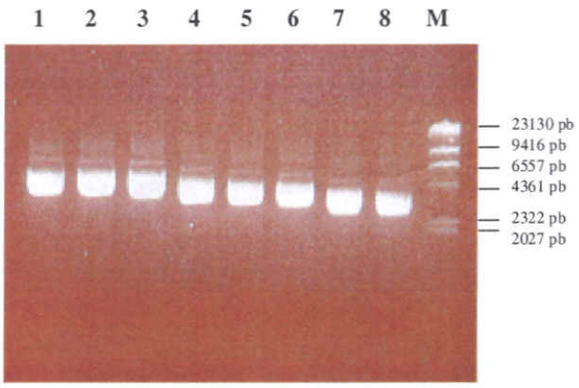


Figura 17. Plasmídeos purificados, contendo os cDNAs do vírus A/WSN/33 (Hoffmann *et al.*, 2000b). Linhas 1, pHW181-PB2; 2, pHW182-PB1; 3, pHW183-PA; 4, pHW184-HA; 5, pHW185-NP; 6, pHW186-NA; 7, pHW187-M; 8, pHW188-NS. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III.

4.8.2 Rearranjos Genéticos

A metodologia do Sistema de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000 a, b) foi utilizada tanto para a avaliação direta dos clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS, como dos clones correspondentes à PB1/ Grupo A, PB2 e NP (segunda fase do trabalho) do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, possibilitando no final a obtenção de seis vírus por rearranjos genéticos. Estes vírus foram produzidos pela transfecção de um plasmídeo contendo o cDNA do segmento PB2, HA, NP, NA, M ou NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e sete plasmídeos, contendo os cDNAs dos demais segmentos genômicos do vírus A/WSN/33 (sistema 1 + 7), em uma co-cultura de células MDCK e 293T (Figura 18).

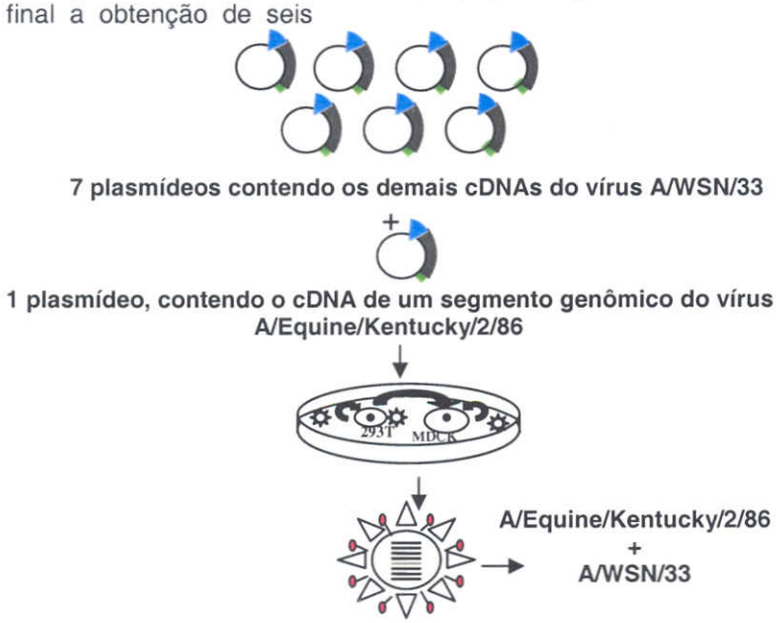


Figura 18. Sistema de Genética Reversa, para a obtenção dos vírus por rearranjos genéticos (ilustração adaptada de Hoffmann *et al.*, 2002a).

Na busca por mais informações a respeito dos clones obtidos na recombinação em levedura e a capacidade destes em interagirem em conjunto, num sistema de 4 + 4, uma nova transfecção foi realizada. Nesta, através da metodologia do Sistema de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000a, b), foram utilizados os quatro plasmídeos, contendo o cDNA dos segmentos HA, NA, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, em conjunto com os plasmídeos representantes dos demais segmentos do vírus A/WSN/33.

4.9 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS OBTIDOS POR REARRANJOS GENÉTICOS

Os vírus obtidos através do rearranjo genético entre A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33 (sistema 1 + 7), foram caracterizados através do Ensaio de Placa e da Imunofluorescência Indireta.

4.9.1 Ensaio de Placa

Inicialmente para o Ensaio de Placa dos vírus obtidos por rearranjo genético, células MDCK foram colocadas em placas de seis poços ($2x10^5$ células por poço de 35 mm) e mantidas até apresentarem uma confluência de 80%, quando então, cada placa foi infectada com diluições decimais, dos vírus obtidos por rearranjos genéticos, assim como pelos vírus A/WSN/33 recombinante e A/Equine/Kentucky/2/86 (controles). Após 1 hora de incubação a 37°C, os inóculos virais foram removidos, as células lavadas uma vez com PBS e cobertas com agarose 1% em MEM, contendo 0,3% de BSA, antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 4 μg/mL de tripsina tratada com TPCK.

Três dias após incubação a 37°C, as placas foram formadas nas monocamadas de células e na seqüência, fixadas e coradas com 1% cristal violeta (Sigma) em formalina 0,05%, por 15 minutos. Cada Ensaio de Placa foi repetido pelo menos duas vezes.

4.9.2 Imunofluorescência Indireta

A técnica de Imunofluorescência Indireta seguiu a metodologia adotada no laboratório do Dr. Ruben Donis. Neste contexto, as células MDCK (~$2x10^5$ células, concentração inicial), cultivadas sobre lamínulas de vidro redondas e esterilizadas (Fisher), em placas de cultura de tecidos de seis poços (diâmetro de 35 mm), ao apresentarem uma monocamada confluente, foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com um dos vírus obtidos por rearranjos genéticos, e os controles, A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33 (vírus recombinante).

Após 1 hora de incubação a 37°C, MEM, suplementado com 0,3% de BSA, antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 4μg/mL de tripsina tratada com TPCK, foi adicionado em cada poço da placa, contendo uma lamínula. No final de um ciclo de 8 horas pós-infecção, as lamínulas foram removidas e as células nestas foram fixadas com metanol/acetona (1:1) por 15 minutos.

Na seqüência, as células foram incubadas com o anticorpo policlonal primário (diluição 1:400) contra proteínas do vírus da influenza humana, A/Aichi/68 (H3N2), ou monoclonal anti-NP (diluição 1:500) do vírus da influenza humana, provenientes do estoque laboratorial do Dr. Ruben Donis, por 1 hora a 37°C. Subseqüentemente, as células foram lavadas em PBS e incubadas com o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de coelho (H + L) (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) (diluição 1:100), para o caso do uso do policlonal, e com o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de camundongo (presente no estoque laboratorial) (diluição1:200), para o caso do uso do monoclonal, novamente por 1 hora a 37°C. Após a lavagem final com PBS, as células foram então observadas em um microscópio de fluorescência.

4.10 CONFIRMAÇÃO DO SEGMENTO ESPECÍFICO DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86: REARRANJOS GENÉTICOS

Os procedimentos para a confirmação da presença do segmento HA, NP ou M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, nos vírus obtidos por rearranjos genéticos, respectivos a estes segmentos, envolveram

uma metodologia semelhante à adotada por Hoffmann *et al.* (2000b), ou seja, a aplicação de RT-PCR com iniciadores específicos aos segmentos de interesse.

Inicialmente, o RNA dos vírus obtidos por rearranjos genéticos foi isolado, assim como do vírus A/WSN/33 recombinante, utilizado como controle. Na seqüência, RT-PCRs foram realizadas, a partir de iniciadores específicos ao segmento a ser confirmado (Quadro 7) nos vírus obtidos por rearranjos genéticos, sendo que no caso do segmento HA, foram utilizados iniciadores específicos a este segmento do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (amostra-específicos). Os produtos destes PCRs foram purificados ("Gene Clean", conforme rotina laboratorial) e então digeridos com enzimas cujo os sítios de restrição encontravam-se nos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e não nos respectivos segmentos do vírus A/WSN/33. Tanto os produtos das PCRs, quanto das digestões, foram submetidos à eletroforese em gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.

Quadro 7. Confirmação dos segmentos HA, NP e M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 nos respectivos vírus obtidos por rearranjos genéticos: iniciadores e enzimas utilizados.

GENE	SEQÜÊNCIA	INICIADORES		ENZIMAS
		SENSO	ANTI-SENSO	
HA	K/HA F. 69	1) HA-69-F	2) HA-958-R	*Eco*RV
	K/HA F. 869	3) HA-869-F	4) HA-1703-R	
NP	K/NP	1) BM-NP-1-F °	2) BM-NP-1565-R °	*Xho*I
M	K/M	1) BM-M-1-F °	2) BM-M-1027-R °	*Afl*III

° (HOFFMANN *et al.*, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pJG2000

A aplicação do Sistema de Recombinação em levedura, para a obtenção dos plasmídeos recombinantes e na seqüência, a utilização destes no Sistema de Genética Reversa para a obtenção de vírus por rearranjos genéticos, implicava na construção de um vetor que apresentasse os promotores pol I e pol II num mesmo plasmídeo, conforme Hoffmann *et al.* (2000a, b) e que viabilizasse a propagação deste, tanto em *E. coli* (meio de LB + Amp), quanto em levedura (meio sem triptofano). Desta forma, as digestões dos vetores pHW2000 (2980 pb)-*Ssp*I/*Afl*III e pJG4.5 (6449 pb)-*Pvu*II/*Afl*III (Figura 19), com purificação dos respectivos fragmentos, 1285 pb e 6271 pb (Figura 20) e posterior ligação destes, resultaram na construção do vetor pJG2000 (7556 pb) (Figura 21).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

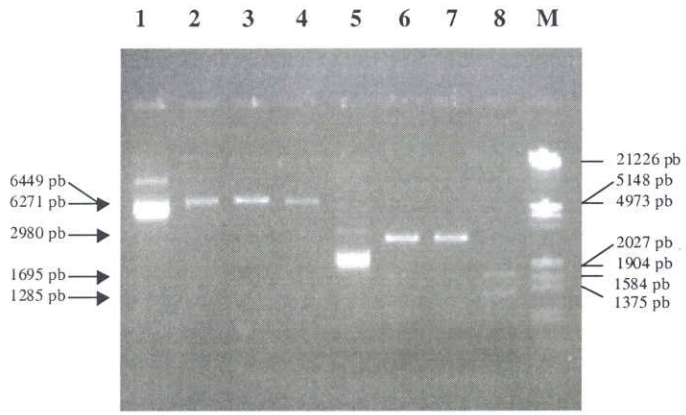


Figura 19. Vetores pHW2000 e pJG4.5 purificados e digeridos. Linhas 1, pJG4.5 purificado; 2, pJG4.5-*Pvu*II; 3, pJG4.5-*Afl*III; 4, pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III; 5, pHW2000 purificado; 6, pHW2000-*Ssp*I; 7, pHW2000-*Afl*III; 8, pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III.

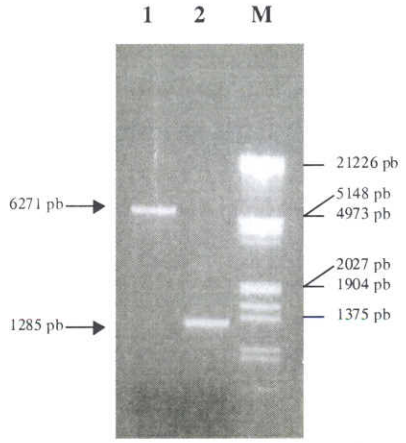


Figura 20. Purificação ("Gene Clean") dos fragmentos 6271 pb (linha 1) e 1285 pb (linha 2) das digestões pJG4.5-*Pvu*II/*Afl*III e pHW2000-*Ssp*I/*Afl*III, respectivamente. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III.

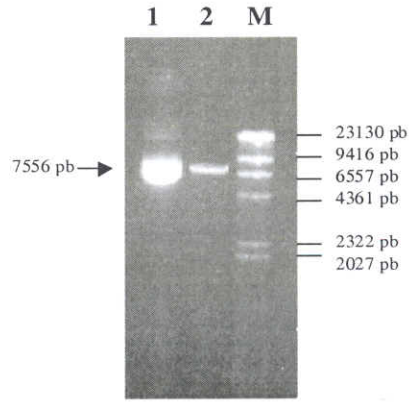


Figura 21. Vetor pJG2000 purificado (linha 1) e digerido pela enzima de restrição *Bsm*BI (linha 2). Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III.

A partir do fragmento do vetor pHW2000 (Hoffmann *et al.*, 2000b), o pJG2000 adquiriu a estrutura para o sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II, viabilizando a fusão precisa do cDNA viral e a produção de RNA viral de sentido negativo pela transcrição da RNA pol I, e mRNA de sentido positivo, sintetizado pela RNA pol II (Hoffmann & Webster, 2000). As seqüências promotora e terminadora RNA polimerase I, estão separadas por dois sítios *Bsm*BI (6763 pb e 6773 pb). A seqüência promotora da pol I (p_{Ih}) está flanqueada pelo sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (a_{IIbgh}), enquanto que o elemento terminador (t_I) está flanqueado pela região promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (p_{IICMV}). Do vetor pJG4.5, conforme carcterísticas apresentadas no manual DupLEX-A™, 2.7 (Origene Technologies, 1998), o pJG2000 recebeu o gene de resistência à ampicilina (Amp^R) e o marcador triptofano (Trp), possibilitando tanto a propagação em *Escherichia coli* (DH10B) (meio de LB + Amp), quanto em levedura (RFY206) (meio sem triptofano), respectivamente (Figura 22).

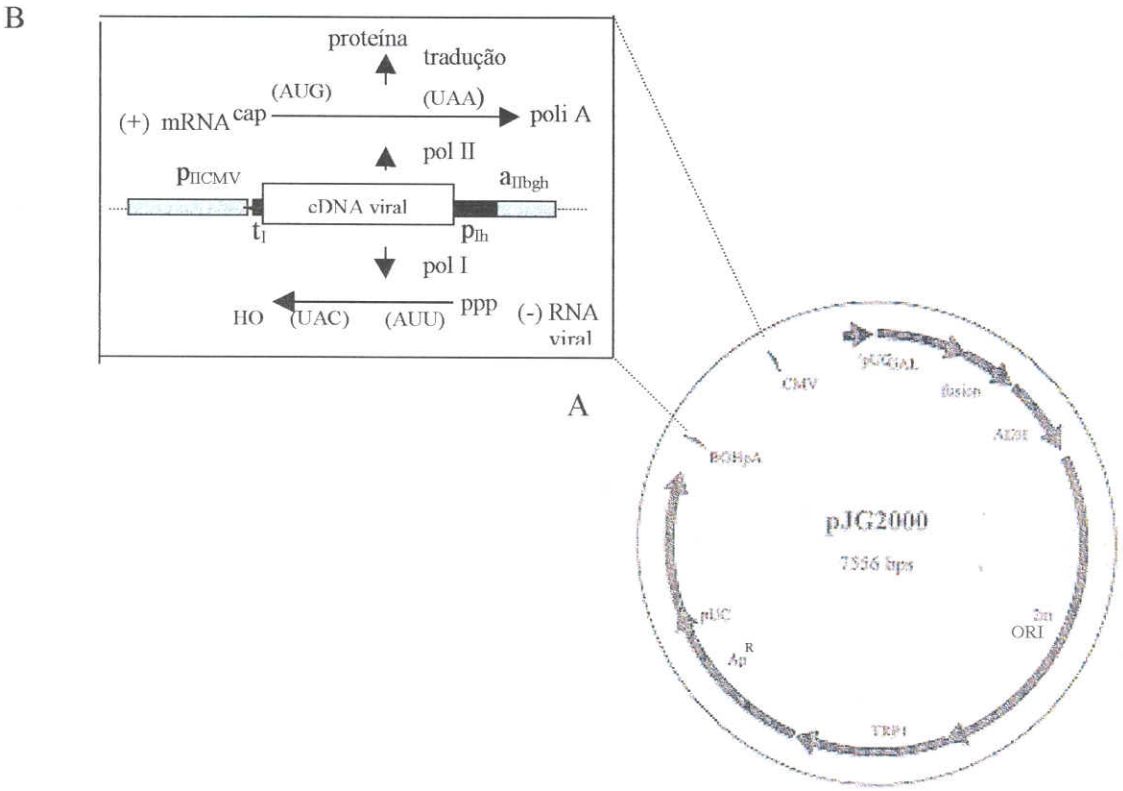


Figura 22. (A) Vetor de clonagem pJG2000, com presença do gene de resistência à ampicilina (Ap^R) e o marcador triptofano (Trp), assim como a região promotora RNA polimerase II do citomegalovírus humano (CMV) e o sinal de poliadenilização do gene codificante do hormônio de crescimento bovino (BGHpA). (B) Projeção esquemática do sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II (Hoffmann & Webster, 2000), cuja estrutura viabiliza a fusão precisa do cDNA viral na orientação de sentido negativo entre as regiões promotora (p_{Ih}) terminador (t_I) da pol I, presente no pJG2000.

5.2 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES, CONTENDO OS SEGMENTOS GENÔMICOS DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86

Desde os estudos iniciais, envolvendo um fator de transcrição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (proteína GAL4) (Brent & Ptashne, 1985) e o desenvolvimento do sistema de dois-híbridos (Fields & Song, 1989), assim como de novas versões destes, ficou claro o potencial desta levedura em ser transformada por DNA externo, além de seu alto índice de crescimento e da eficiência de seu sistema de recombinação homóloga, conforme é confirmado no DupLEX-A™, Manual versão 2.7 (Origene Technologies, 1998).

Na literatura, não existem referências da utilização do Sistema de Recombinação em levedura como sistema de clonagem do material genético do vírus da influenza. Desta forma, pela primeira vez este sistema está sendo utilizado para a clonagem dos segmentos genômicos desse vírus, mais especificamente do vírus da influenza eqüina. A rapidez dos procedimentos desta técnica, incluindo a obtenção das colônias (2-3 dias de incubação a 30°C) e a seleção dos plasmídeos recombinantes, poderão garantir uma forma mais rápida e eficaz na obtenção da coleção de plasmídeos a serem utilizados para a produção de uma amostra vacinal.

O sistema de recombinação em levedura, adotado nesta tese, viabilizou a produção de diversos clones correspondentes a cada um dos oito segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Apesar das dificuldades encontradas para o "design" dos iniciadores específicos para determinados segmentos deste vírus, por causa da ausência das seqüências destes em "Los Alamos Influenza database" (exemplo: PB1, PA e NA), ou pela não adequação dos "Iniciadores Universais" (Hoffmann *et al.*, 2001) (exemplo: PB1, PA e HA), uma vez resolvida esta etapa, as PCRs forneceram resultados satisfatórios para a aplicação destes no sistema de recombinação.

Neste contexto, a partir do Sistema de Recombinação em levedura, com aplicação do vetor pJG2000 linearizado, em conjunto com o(s) produto(s) de PCR(s) (cDNAs) referentes a cada um dos respectivos segmentos genômicos do vírus em questão, contendo estes um fragmento do vetor pJG2000 nas extremidades 5' e/ou 3', foi possível no final obter os plasmídeos recombinantes, tanto da primeira fase do trabalho (Quadro 8), quanto da segunda fase (Quadro 9).

Quadro 8. Recombinação em levedura (primeira fase): plasmídeos contendo os cDNAs correspondentes aos oito segmentos genômico do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

GENE	SEQÜÊNCIAS APLICADAS À RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA	PLASMÍDEOS RECOMBINANTES
PB1	K/PB1-f. ext.; K/PB1-f. mid.	pJG2000-K/PB1
PB2	K/PB2-f. ext. ; K/PB2-f. mid.	pJG2000-K/PB2
PA	K/PA F. HW-1; K/PA F. 64; K/PA F. 1111; K/PA F. 2110	pJG2000-K/PA
HA	K/HA F. HW-1; K/HA F. 69; K/HA F. 869; K/HA F. 1642	pJG2000-K/HA
NP	K/NP	pJG2000-K/NP
NA	K/NA-f. ext. ; K/NA-f. mid.	pJG2000-K/NA
M	K/M	pJG2000-K/M
NS	K/NS	pJG2000-K/NS

Quadro 9. Recombinação em levedura (segunda fase): plasmídeos contendo os cDNAs correspondentes aos segmentos PB1, PB2 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86

GENE	SEQÜÊNCIAS APLICADAS À RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA	PLASMÍDEOS RECOMBINANTES
PB1	PB1.1EqR; PB1EqF2341	pJG2000-K/PB1 (Grupo A)
PB1	K/PB1-f. ext.; K/PB1-f. mid.	pJG2000-K/PB1 (Grupo B)
PB2	PB2.1EqR; PB2EqF2341	pJG2000-K/PB2
PA	PA.1EqR; PAEqF2233	pJG2000-PAEq

5.3 AVALIAÇÃO DOS CLONES REPRESENTANTES DOS SEGMENTOS DO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86

A digestão com a enzima *Eco*RV dos clones obtidos através da Recombinação em levedura, representantes dos segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, em comparação à digestão do vetor pJG2000 com a mesma enzima, garantiu uma avaliação inicial destes.

A enzima de restrição *Eco*RV apresentava dois sítios de restrição na seqüência do vetor pJG2000 e nenhum nas seqüências disponíveis dos segmentos PB2, NP e M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 em "Los Alamos Influenza database" (http://www.flu.lanl.gov). Pela análise comparativa dos tamanhos moleculares apresentados pela digestão do pJG2000 (3221 e 4335 pbs), aqueles clones referentes a pJG2000-K/PB2, pJG2000-K/NP e pJG2000-K/M que apresentavam o fragmento 3221 pb e o de 4335 pb, acrescido do número de pb correspondentes à seqüência do segmento genômico em estudo, eram considerados a princípio positivos.

No caso dos clones referentes a pJG2000-K/HA, contendo o segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, já era esperada como resultado da digestão com *Eco*RV a obtenção de quatro fragmentos (clones considerados positivos), pois a seqüência de HA informava a presença de dois sítios de restrição de *Eco*RV, além dos dois sítios de pJG2000.

Os clones referentes a pJG2000-K/PB1, pJG2000-K/PA e pJG2000-K/NS, cuja seqüências de PB1, PA e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 não existem no "Los Alamos Influenza database", apresentaram na digestão com o fragmento 3221 pb e o de 4335 pb acrescido do valor em pb do respectivo segmento genômico, *Eco*RV como os clones dos segmentos PB2, NP e M.

No caso dos clones correspondentes a pJG2000-K/NA, cuja seqüência de NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 também não existe no "Los Alamos Influenza database", apresentaram três fragmentos na digestão com *Eco*RV. A espectativa deste resultado já existia, pois de acordo com a seqüência incompleta de NA do vírus A/Equine/1/81 (H3N8), existia um sítio de restrição de *Eco*RV. Conseqüentemente, apesar de não se tratar da seqüência de NA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, foi possível fazer uma avaliação inicial dos prováveis clones positivos de pJG2000-K/NA, considerando um total de três sítios de restrição de *Eco*RV (um na seqüência de NA e dois na seqüência de pJG2000).

Diante dos resultados obtidos das digestões dos clones da primeira fase do trabalho (Quadro 10), a etapa seguinte requeria uma análise mais direta dos clones considerados como positivos, avaliando-os quanto à expressão gênica. Desta forma, os clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS foram aplicados diretamente ao Sistema de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000a,b), enquanto que os clones dos segmentos PB1, PB2, PA e NP (primeira fase) foram aplicados ao Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), desenvolvido por Perez & Donis (1998), e os resultados avaliados no Ensaio de CAT (Promega Corporation, 2000) (Quadro 11).

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA DA UFMG

Quadro 10. Avaliação inicial: digestões com *Eco*RV dos clones obtidos na primeira fase do trabalho, após a Recombinação em levedura.

PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	CLONES TESTADOS	RESULTADOS
pJG2000-K/PB1	46 clones	35 clones positivos
pJG2000-K/PB2	18 clones	12 clones positivos
pJG2000-K/PA	11 clones	8 clones positivos
pJG2000-K/HA	14 clones	14 clones positivos
pJG2000-K/NP	48 clones	27 clones positivos
pJG2000-K/NA	23 clones	22 clones positivos
pJG2000-K/M	4 clones	4 clones positivos
pJG2000-K/NS	3 clones	3 clones positivos

Quadro 11. Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5), aplicado aos clones dos segmentos PB1, PB2, PA e NP, da primeira fase do trabalho, com avaliação da expressão gênica através do Ensaio de CAT.

PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	CLONES TESTADOS (1:P4)	RESULTADOS (Ensaio de CAT)
pJG2000-K/**PB1**	22 clones	Clone número **42**, positivo (expressão bem inferior ao controle positivo P5)
pJG2000-K/**PB2**	8 clones	Clones números **13**, **15** e **18**, positivos (expressão bem inferior ao controle positivo P5)
pJG2000-K/**PA**	4 clones	Clones números **17**, **19** e **22**, positivos (expressão eqüivalente ao controle positivo P5)
pJG2000-K/**NP**	23 clones	Clone número **9**, positivo (expressão bem inferior ao controle positivo P5)

O Sistema P5 viabilizou a análise individual dos clones referentes aos plasmídeos recombinantes, pJG2000-K/PB1, pJG2000-K/PB2, pJG2000-K/PA e pJG2000-K/NP, em conjunto com os quatro demais plasmídeos deste sistema, incluindo o p2HHCATHdR, codificando para CAT. Desta forma, a atividade de CAT pôde ser monitorada (LSC), avaliando a expressão gênica dos clones de interesse, em comparação aos controles positivo (P5) e negativo (P4) (exemplificação nos Quadros 12, 13 e 14).

Quadro 12. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica dos clones 42 / pJG2000-K/PB1 e 9 / pJG2000-K/NP. K/PB1 e 9 / pJG2000-K/NP.

AMOSTRAS	Tempo	CPM°	^{3}H_DPM	^{14}C_DPM	^{3}H_Ef.%	^{14}C_ Ef.%	SaQuM
pJG2000-K/PB1 (clone número **42**)	60	**10417.7**	0.00	11537.3	0.00	91.61	0
pJG2000-K/NP (clone número **9**)	60	**1316.8**	0.00	1363.5	0.00	91.57	0
P5 (controle positivo)	60	**117860.5**	0.00	131658.2	0.00	91.52	0
P4 (controle negativo•)	60	312.7	0.00	222.3	0.00	91.74	0
"MOCK"	60	304.2	0.00	233.6	0.00	91.58	0

• Sem pcDNA762/PB2. ° Contagem por minutos.

Quadro 13. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica do clone 15 / pJG2000-K/PB2.

AMOSTRAS	Tempo	CPM°	^{3}H_DPM	^{14}C_DPM	^{3}H_Ef.%	^{14}C_ Ef.%	SaQuM
pJG2000-K/PB2 (clone número **15**)	60	**10637.3**	0.00	11816.4	0.00	91.62	0
P5 (controle positivo)	60	**252263.6**	0.00	280916.9	0.00	91.77	0
P4 (controle negativo•)	60	303.0	0.00	236.9	0.00	91.10	0
"MOCK"	60	270.3	0.00	199.5	0.00	91.69	0

• Sem pcDNA762/PB2. ° Contagem por minutos.

Quadro 14. Avaliação, pelo Ensaio de CAT, da expressão gênica do clone 19 / pJG2000-K/PA.

AMOSTRAS	Tempo	CPM°	^{3}H_DPM	^{14}C_DPM	^{3}H_Ef.%	^{14}C_ Ef.%	SaQuM
pJG2000-K/PA (clone número **19**)	60	**253471.2**	0.00	284802.1	0.00	90.79	0
P4 (controle negativo 1*)	60	298.4	0.00	253.5	0.00	90.85	0
P5 (controle positivo)	60	**291520.1**	0.00	327086.5	0.00	90.91	0
P4 (controle negativo 2•)	60	299.5	0.00	248.3	0.00	91.14	0
"MOCK"	60	340.4	0.00	303.3	0.00	91.34	0

* Sem pJG2000-K/PA, clone número 19. ° Contagem por minutos. • Sem pcDNA762/PB2.

Diante dos resultados negativos ou de baixa atividade de CAT, verificados principalmente no caso dos segmentos PB1 e NP (Quadro 11), foi necessário investigar a possibilidade da presença de mutações nas seqüências destes segmentos. Neste contexto, mesmo diante da dificuldade em não se ter a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, dois clones (1 e 3) do pJG2000-K/PB1 foram sequenciados e comparados à seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73 (Quadro 15) e da mesma forma, dois clones (26 e 32) do pJG2000-K/NP foram sequenciados e comparados à seqüência de NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (Quadro 16).

Quadro 15. Seqüenciamento*: clones 1 e 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73.

			MUTAÇÕES	
PLASMÍDEO RECOMBINANTE	INICIADOR*	CLONES	NUCLEOTÍDEOS	AMINOÁCIDOS
pJG2000-K/**PB1** (2341 pb)	BM-PB1-1-F (senso)	Clone número **1** sequenciado (626 pb)	15 mutações	4 mutações
		Clone número **3** sequenciado (739 pb)	15 mutações	6 mutações
	PB1-1230-R (anti-senso)	Clone número **1** sequenciado (sem resultados)	----------	----------
		Clone número **3** sequenciado (775 pb)	19 mutações	2 mutações

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.1 e 8.1.2).
* Seqüenciamentos: clones 1 e 3 encontram-se no Anexo (8.3.1, 8.3.2 e 8.3.3)

Quadro 16. Seqüenciamento: clones 26 e 32 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

			MUTAÇÕES	
PLASMÍDEO RECOMBINANTE	INICIADOR	CLONES	NUCLEOTÍDEOS	AMINOÁCIDOS
pJG2000-K/**NP** (1565 pb)	BM-NP-1-F (senso)	Clone número **26** sequenciado (674 pb)	1 mutação	Nenhuma mutação presente
		Clone número **32** não foi sequenciado	----------	----------
	NP-581-F (senso)	Clone número **26** sequenciado (736 pb)	5 mutações	4 mutações
		Clone número **32** sequenciado (938 pb)	3 mutações	3 mutações

* A seqüência nucleotídica correspondente a cada iniciador, encontra-se no Anexo (8.1.34 e 8.1.52).
* Seqüenciamentos: clones 26 e 32 encontram-se no Anexo (8.3.4, 8.3.5 e 8.3.6)

A presença das possíveis mutações constadas nestes clones, tornaram evidente a necessidade de realizar um novo isolamento de RNA, RT-PCR e recombinações em levedura para a obtenção de novos clones para os respectivos segmentos, assim como para PB2 e PA. Conseqüentemente, durante o desenvolvimento destes novos testes, o Dr. Daniel Perez passou a colaborar com a

pesquisa (segunda fase do trabalho) e desta forma, novos clones foram obtidos principalmente para PB1, PB2 e PA, e na seqüência, testados pela digestão com *Eco*RV (Quadro 17).

Quadro 17. Avaliação inicial: digestões com *Eco*RV dos clones obtidos na segunda fase do trabalho, após a Recombinação em levedura.

PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	CLONES TESTADOS	RESULTADOS
pJG2000-K/**PB1** (**Grupo A**)	8 clones	8 clones positivos (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24)
pJG2000-K/**PB1** (**Grupo B**)	8 clones	7 clones positivos (1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7)
pJG2000-K/**PB2**	8 clones	7 clones positivos (42, 43, 44, 45, 46, 47 e 48)
pJG2000-**PAEq**	8 clones	7 clones positivos (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8)

Após os testes com *Eco*RV, os clones referentes a PB1/ Grupo A e PB2 da segunda fase do trabalho, assim como os clones fornecidos pelo Dr. Daniel Perez, correspondentes ao segmento NP, também da segunda fase (item 4.4), foram aplicados diretamente ao Sistema de Genética Reversa. Os clones referentes a PB1/ Grupo B e PA, desta mesma fase, foram estocados a -80°C para futuros trabalhos.

5.4 REARRANJO GENÉTICO ENTRE OS VÍRUS DA INFLUENZA EQÜINA E HUMANA: SISTEMA 1 + 7 PARA PRODUÇÃO VIRAL

A utilização da Genética Reversa a partir do Sistema de transcrição bidirecional RNA pol I-pol II (Hoffmann & Webster, 2000), possibilitou inicialmente a avaliação de diversos clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS (Quadro 18) e aos segmentos PB1, PB2 e NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, da segunda fase do trabalho (Quadro 19), tendo estes já passado pela análise da digestão com *Eco*RV.

Quadro 18. Transfecção dos clones referentes aos segmentos HA, NA, M ou NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, num sistema 1 + 7, com os demais clones do vírus A/WSN/33: obtenção de vírus e análise pela Imunofluorescência Indireta.

PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	CLONES TESTADOS (sistema 1+ 7)	RESULTADOS (Vírus / Imunofluorescência Indireta)
pJG2000-K/HA	6 clones	Clone número 4 positivo
pJG2000-K/NA	4 clones	Clone número 6 positivo
pJG2000-K/M	1 clone (duas vezes)	Clone número 41 positivo
pJG2000-K/NS	1 clone (duas vezes)	Clone número 6 positivo

Quadro 19. Transfecção dos clones referentes aos segmentos PB1, PB2 e NP (segunda fase do trabalho) do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, num sistema 1 + 7, com os demais clones do vírus A/WSN/33: obtenção de vírus e análise pela Imunofluorescência Indireta.

PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	CLONES TESTADOS (sistema 1+ 7)	RESULTADOS (Vírus/Imunofluorescência Indireta)
pJG2000-K/PB1 (Grupo A)	1 clone	Clone número 24 negativo
pJG2000-K/PB2	1 clone	Clone número 42 positivo
pDP2002-NPEq	5 clones (1, 5, 6 e 9)*	Clone número 5 positivo

*Clones fornecidos pelo Dr Daniel Perez.

Durante a aplicação do Sistema de Genética Reversa às transfecções combinadas com um plasmídeo, contendo o cDNA de um segmento genômico do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, e sete plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33 (sistema 1 + 7) (Tabela 1), foi possível também obter os vírus por rearranjos genéticos (Transfecções A a F/ Quadro 20).

Tabela 1. Sistema de Genética Reversa (rearranjos genéticos): sistema 1 + 7 de transfecções com um plasmídeo contendo o cDNA de um segmento genômico do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e sete plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33.

Transfecção A	Transfecção B	Transfecção C	Transfecção D	Transfecção E	Transfecção F	Transfecção G
pJG2000-K/PB2 (clone 42 eqüino)	pHW181 (PB2)	pHW181 (PB2)	pHW181 (PB2)	pHW181 (PB2)	pHW181 (PB2)	pHW181 (PB2)
pHW182 (PB1)	pHW182 (PB1)	pHW182 (PB1)	pHW182 (PB1)	pHW182 (PB1)	pHW182 (PB1)	pJG2000-K/PB1 Grupo A (clone 24 eqüino)
pHW183 (PA)	pHW183 (PA)	pHW183 (PA)	pHW183 (PA)	pHW183 (PA)	pHW183 (PA)	pHW183 (PA)
pHW184 (HA)	pHW184 (HA)	pJG2000-K/HA (clone 4 eqüino)	pHW184 (HA)	pHW184 (HA)	pHW184 (HA)	pHW184 (HA)
pHW185 (NP)	pDP2002-NPEq (clone 5 eqüino)	pHW185 (NP)	pHW185 (NP)	pHW185 (NP)	pHW185 (NP)	pHW185 (NP)
pHW186 (NA)	pHW186 (NA)	pHW186 (NA)	pJG2000-K/NA (clone 6 eqüino)	pHW186 (NA)	pHW186 (NA)	pHW186 (NA)
pHW187 (M)	pHW187 (M)	pHW187 (M)	pHW187 (M)	pJG2000-K/M (clone 41 eqüino)	pHW187 (M)	pHW187 (M)
pHW188 (NS)	pHW188 (NS)	pHW188 (NS)	pHW188 (NS)	pHW188 (NS)	pJG2000-K/NS (clone 6 eqüino)	pHW188 (NS)

Num sistema de transfecção 4 + 4 (Tabela 2), os clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS, que inicialmente forneceram vírus (Quadro 20), foram avaliados em conjunto com os quatro plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33. Neste, a ausência na obtenção de um vírus (Transfecção H), indicou a presença de algum defeito genético, como uma ou mais mutações na seqüência de um dos segmentos, afetando a genética reversa. O Sistema de Genética Reversa não permite a produção de partículas virais com ausência de um dos segmentos ou com mutações letais num dos segmentos genômicos (Newmann & Kawaoka, 2001). Possivelmente trata-se do clone 6 / NA, cujos resultados e informações serão considerados no item 5.5.2.

Tabela 2. Sistema de Genética Reversa (rearranjos genéticos): sistema 4 + 4 de transfecções com quatro plasmídeos contendo o cDNA de HA, NA, M e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e quatro plasmídeos contendo os demais cDNAs do vírus A/WSN/33.

TRANSFECÇÃO H
pHW181 (PB2)
pHW182 (PB1)
pHW183 (PA)
pJG2000-K/**HA** / clone número **4** (eqüino)
pHW185 (NP)
pJG2000-K/**NA** / clone número **6** (eqüino)
pJG2000-K/**M** / clone número **41** (eqüino)
pJG2000-K/**NS** / clone número **6** (eqüino)

Quadro 20. Sistema de Genética Reversa: vírus resultantes dos rearranjos genéticos entre o vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e o vírus A/WSN/33.

TRANSFECÇÕES	**RESULTADO: obtenção de vírus**
A	pJG2000-K/PB2-WSN
B	pJG2000-K/HA-WSN
C	pDP2002-NPEq-WSN
D	pJG2000-K/NA-WSN
E	pJG2000-K/M-WSN
F	pJG2000-K/NS-WSN
G	-------
H	-------

A obtenção dos vírus por rearranjos genéticos (Transfecções A a F/ Quadro 20), além de confirmar a possibilidade em se adotar o Sistema de Genética Reversa (Hoffmann *et al.*, 2000a,b) ao vírus A/Equine/Kentucky/2/86, futuramente para a produção deste vírus recombinante, também constatou a capacidade dos clones dos segmentos genômicos PB2, HA, NP, NA, M e NS, obtidos pela recombinação em levedura, em interagirem num sistema 1 + 7 com o vírus da influenza humana e produzirem vírus. Estes rearranjos estabeleceram um nôvo campo de estudos da interação genética entre os vírus da influenza humana e eqüina, com implicações na replicação viral como será abordado nos próximos itens.

Apesar de num sistema 4 + 4, onde os segmentos HA, NA, M e NS do vírus Kentucky com os demais segmentos do vírus A/WSN/33 não terem fornecido vírus, acredita-se que diante de uma maior disponibilidade de tempo, sequenciando o clone suspeito e detectando a possível mutação, a correção poderá ser realizada e o vírus então obtido. Contudo, devido ao fator tempo, foi necessário direcionar os estudos finais desta tese para uma caracterização inicial dos vírus obtidos, assim como para a confirmação dos segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 presentes nestes.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

5.5 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS OBTIDOS POR REARRANJOS GENÉTICOS

A detecção e a caracterização dos vírus obtidos por rearranjos genéticos foram realizadas a partir da análise inicial dos resultados verificados na Imunofluorescência Indireta e no Ensaio de Placa.

5.5.1 Avaliação por Imunofluorescência Indireta

A partir da Imunofluorescência Indireta, utilizando o anticorpo monoclonal anti-NP do vírus da influenza humana e subseqüentemente, o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de camundongo, em células infectadas pelos controles negativo ("MOCK") e positivos (A/Equine/ Kentucky/2/86 e A/WSN/33), assim como pelos vírus obtidos por rearranjos genéticos (pJG2000-K/PB2-WSN, pJG2000-K/HA-WSN, pJG2000-K/NA-WSN, pJG2000-K/M-WSN e pJG2000-K/NS-WSN), foi possível detectar diretamente a proteína NP dos respectivos vírus (Figuras 23 A, B, C, D, E, F, G e H).

O mesmo processo, só que utilizando o anticorpo policlonal primário contra proteínas do vírus da influenza humana, A/Aichi/68 (H3N2), e subseqüentemente o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de coelho, em células infectadas pelo mesmos controles anteriormente mencionados e pelo vírus pDP2002-NPEq-WSN, garantiu também resultados positivos na Imunofluorescência Indireta (Figuras 24 A, B, C e D).

No caso do vírus pJG2000-K/HA-WSN, poucas células apresentaram-se fluorescentes, sendo este mesmo fato constatado de forma ainda mais pronunciada com o vírus pDP2002-NPEq-WSN.

Na técnica de Imunofluorescência, como resultado de células infectadas pelo vírus da influenza, a fluorescência pode-se apresentar tanto no citoplasma, quanto no núcleo (Manuguerra & Hannoun, 1999), conforme foi observado nos resultados aqui apresentados. Tal fato deve-se ao vírus sofrer a replicação e transcrição no núcleo das células hospedeiras e tradução no citoplasma, de onde a NP, M1, NS2 e as polimerases são importados para o núcleo para os estádios finais da replicação e para a reunião dos RNPs virais (Whittaker, 2001).

Contudo, é a natureza do anticorpo específico que irá viabilizar a detecção e identificação viral (Manuguerra & Hannoun, 1999). No caso, não foi utilizado um anticorpo específico ao vírus A/Equine/Kentucky/2/86.

Conseqüentemente, a detecção da NP nas células infectadas pelos vírus pJG2000-K/PB2-WSN, pJG2000-K/HA-WSN, pJG2000-K/NA-WSN, pJG2000-K/M-WSN e pJG2000-K/NS-WSN (uso do anticorpo monoclonal), assim como a detecção de proteínas do vírus da influenza nas células infectadas por pDP2002-NPEq-WSN (uso do anticorpo policlonal), não são resultados que podem ser utilizados como uma fonte de confirmação das proteínas referentes aos segmentos do vírus da influenza eqüina, presentes nestes rearranjos genéticos. A aplicação destes anticorpos apenas confirma a presença de proteína(s) do vírus da influenza A, sendo necessário estabelecer condições para a confirmação dos respectivos segmentos de A/Equine/Kentucky/2/86 nestes vírus, como será abordado no item 5.6.

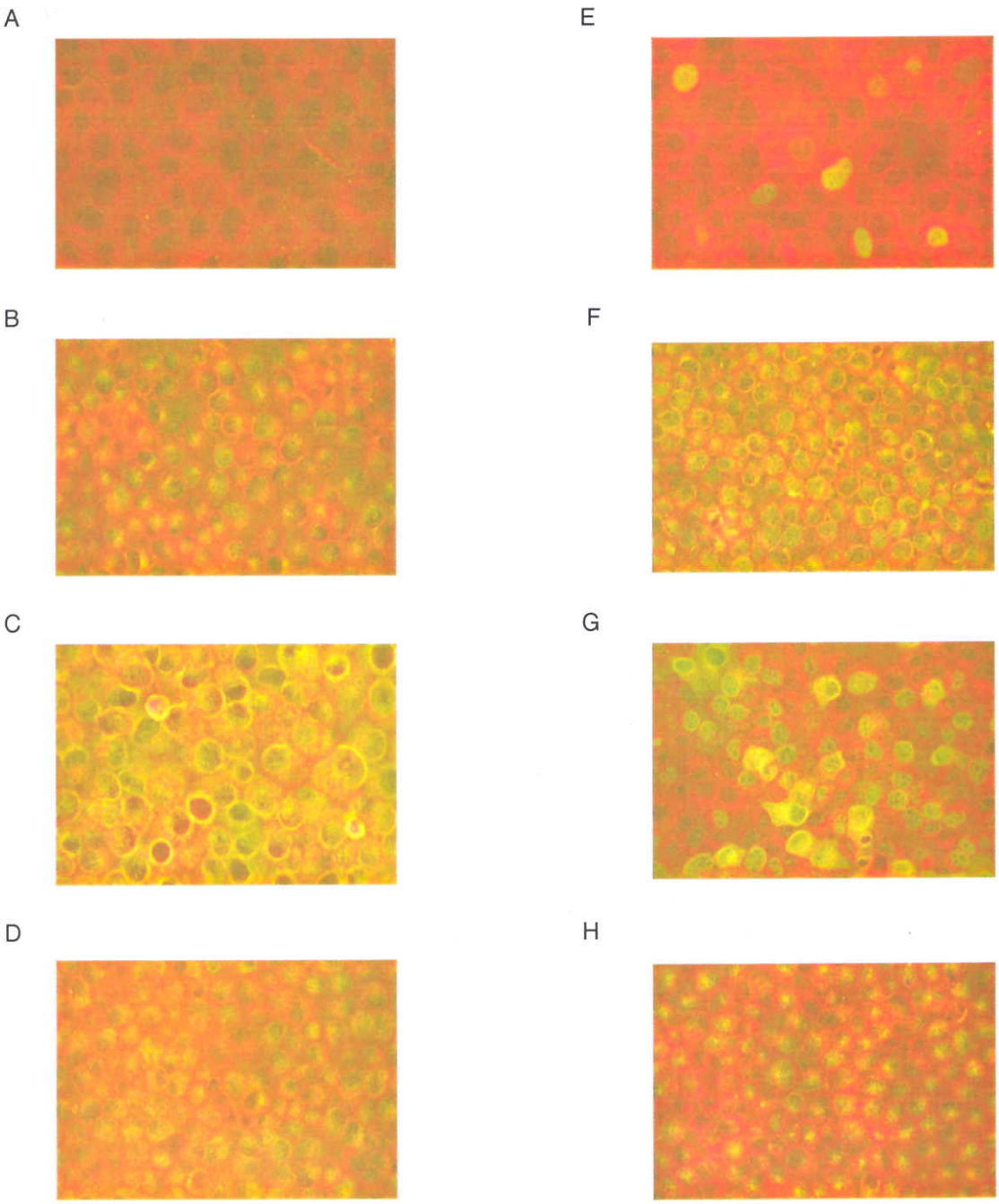


Figura 23. Detecção da proteína NP do vírus da influenza pela Imunofluorescência Indireta, utilizando anticorpo monoclonal anti-NP do vírus da influenza humana e subseqüentemente, o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de camundongo, em células infectadas pelos controles negativo ("MOCK") (A) e positivos, A/Equine/Kentucky/2/86 (B) e A/WSN/33 (C), assim como pelos vírus obtidos por rearranjos genéticos: pJG2000-K/PB2-WSN (D), pJG2000-K/HA-WSN (E), pJG2000-K/NA-WSN (F), pJG2000-K/M-WSN (G) e pJG2000-K/NS-WSN (H).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

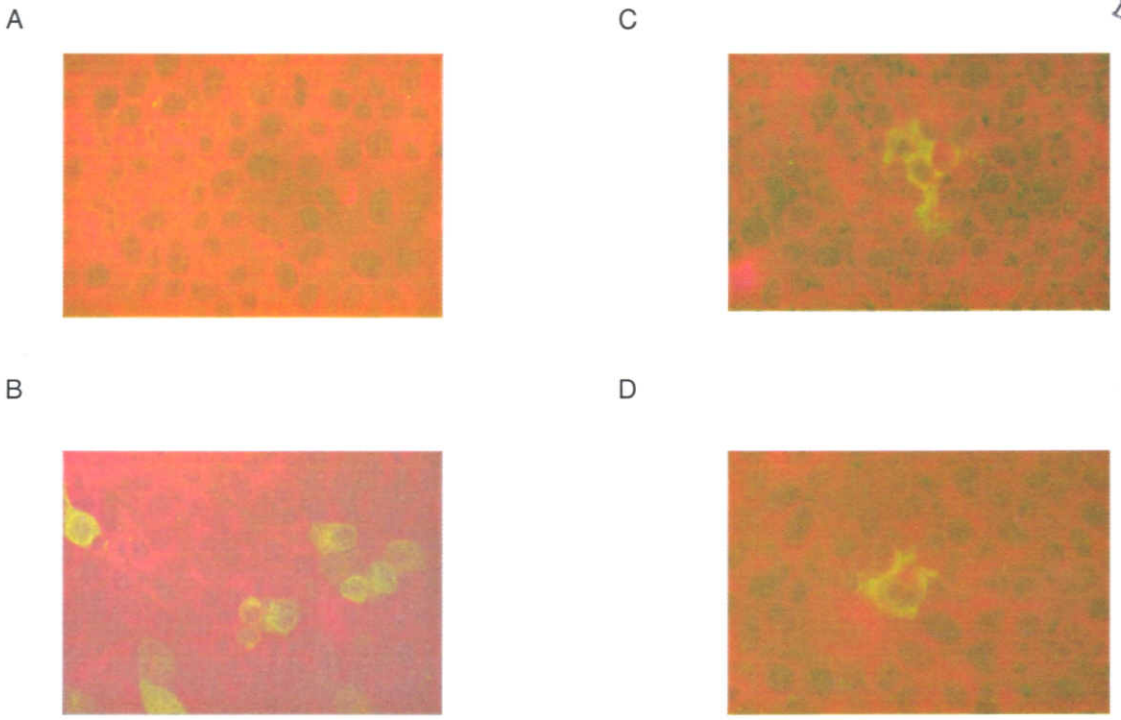


Figura 24. Detecção das proteínas do vírus da influenza pela Imunofluorescência Indireta, utilizando anticorpo policlonal primário contra proteínas do vírus da influenza humana, A/Aichi/68 (H3N2) e subseqüentemente, o conjugado-FITC de cabra anti-IgG de coelho, em células infectadas pelos controles negativo ("MOCK") (A) e positivos, A/Equine/Kentucky/2/86 (B) e A/WSN/33 (C), assim como pelo vírus pDP2002-NPEq-WSN (D), obtidos por rearranjo genético.

5.5.2 Ensaio de Placa

Os vírus da influenza são tipicamente estudados em células MDCK, que suportam o multiciclo de crescimento dos mesmos, sendo susceptíveis à formação de placas (Lamb & Krug, 2001).

O Ensaio de Placa, técnica adotada nesta tese, viabilizou tanto a comparação morfológica das placas apresentadas pelos vírus-controles, A/WSN/33 (Figura 25) e A/Equine/Kentucky/2/86 (Figura 26), com os vírus obtidos por rearranjos genéticos, pJG2000-K/PB2-WSN (Figura 27), pJG2000-K/HA-WSN (Figura 28), pJG2000-K/NA-WSN (Figura 29), pJG2000-K/M-WSN (Figura 30) e pJG2000-K/NS-WSN (Figura 31), quanto a quantificação de cinco dos seis vírus obtidos por rearranjos genéticos. O vírus pDP2002-NPEq-WSN apresentou pouquíssimas células fluorescentes na avaliação por Imunofluorescência Indireta e um crescimento pobre em células MDCK, e por isso foi o único que não se teve a possibilidade de apresentar um resultado no Ensaio de Placa.

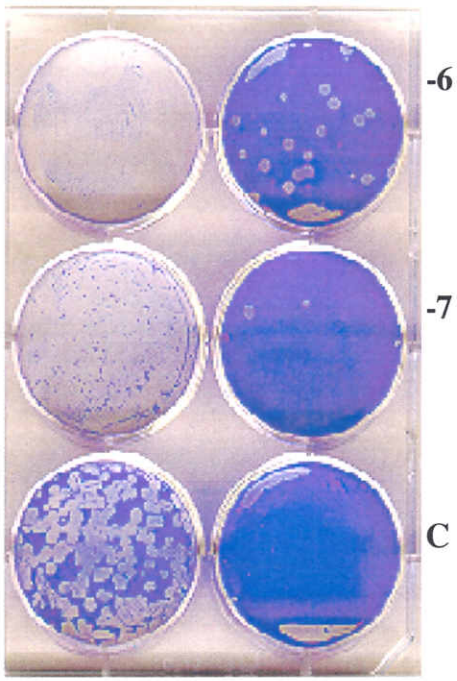


Figura 25. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus A/WSN/33 (controle).

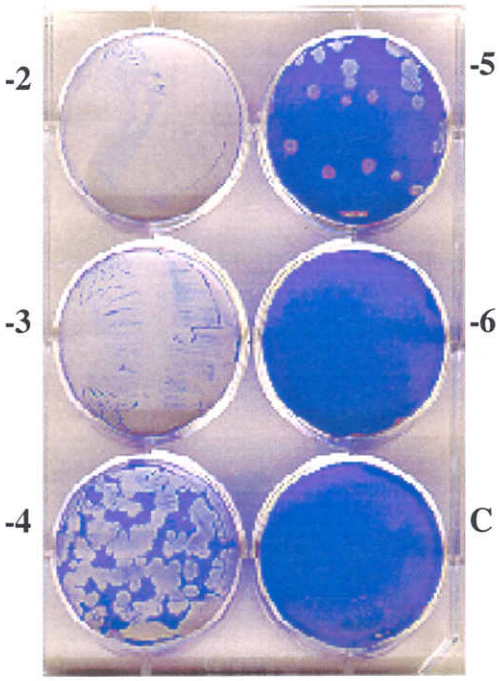


Figura 26. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (controle).

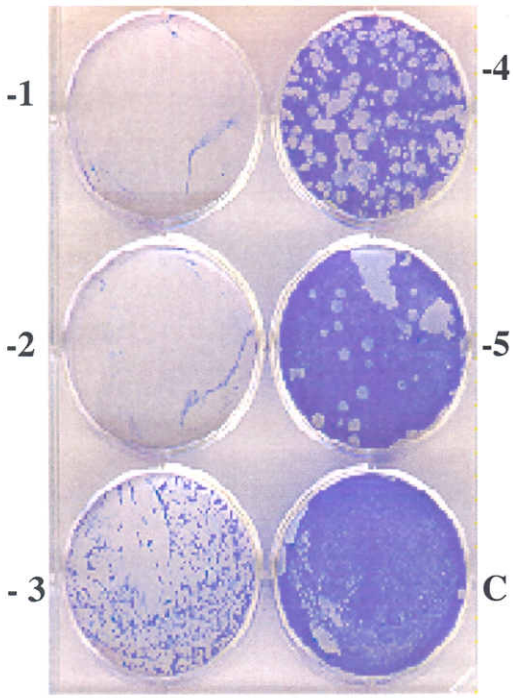


Figura 27. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/PB2-WSN.

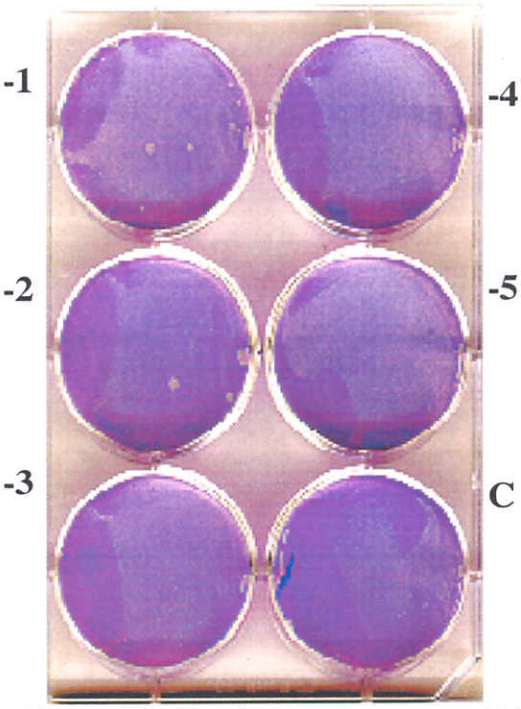


Figura 28. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/HA-WSN

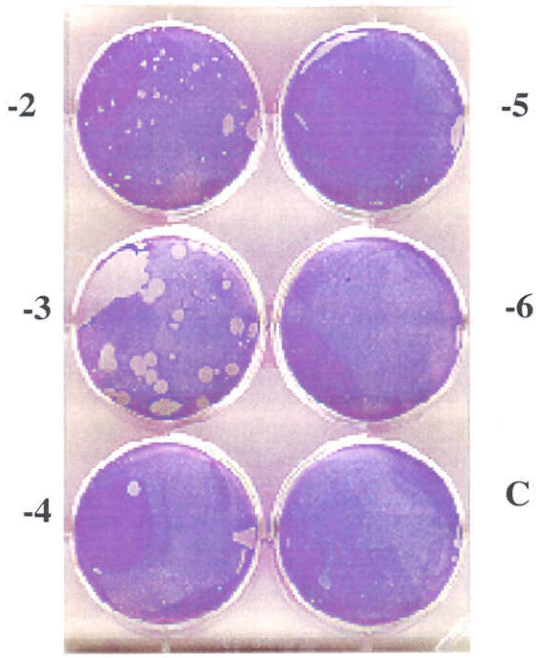


Figura 29. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/NA-WSN.

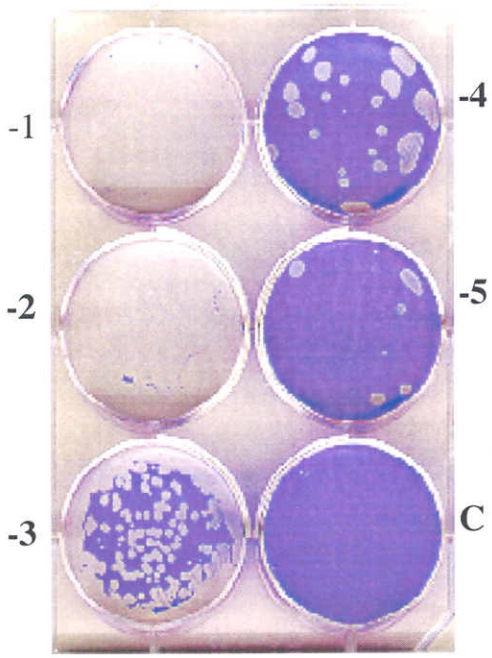


Figura 30. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/M-WSN.

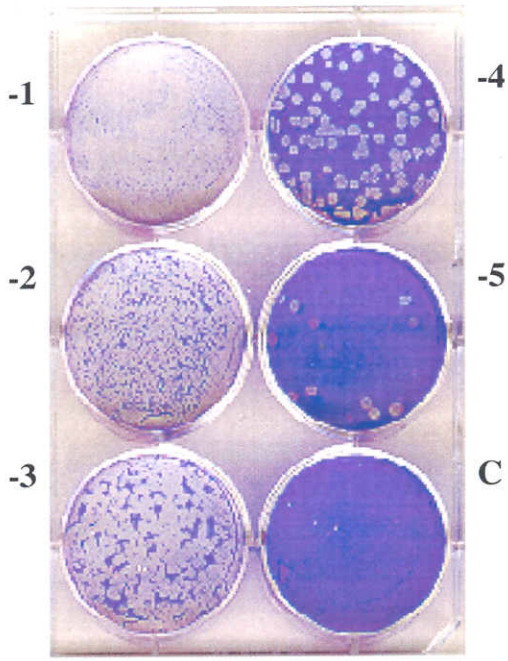


Figura 31. Ensaio de placa em células MDCK, infectadas pelo vírus pJG2000-K/NS-WSN.

Os vírus pJG2000-K/M-WSN e pJG2000-K/NS-WSN apresentaram como resultados nos Ensaios de Placas, após a quinta passagem viral de ambos, uma morfologia de placa similar aos controles A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33, com 5 x 10^5 e 11 x 10^5 PFU/ml, respectivamente (Figuras 30 e 31).

No caso do vírus pJG2000-K/HA-WSN (Figura 28), após a quarta passagem viral, apresentou 2 x 10^2 PFU/mL e uma morfologia de placa menor do que a dos controles A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33. A HA é uma glicoproteína com projeção trimérica (forma de haste), apresentando um terminal carboxi-hidrofóbico ancorado no envelope viral e um terminal hidrofílico projetando-se para fora do vírus. Facilita tanto a ligação do vírus ao receptor da célula do hospedeiro, quanto à penetração do vírus (Hayden & Palese, 1997). Conseqüentemente, devido a estes caracteres funcionais, é possível que a HA, de origem eqüina, venha a determinar esta diferença morfológica quando associada a um rearranjo com demais segmentos do vírus A/WSN/33, além de um crescimento bem inferior aos resultados apresentados pelos controles.

O vírus pJG2000-K/NA-WSN (Figura 29), após a sétima passagem viral, apresentou 1 x 10^4 PFU/mL e uma população mista com morfologia de placa menor e similar aos controles A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33. Estes resultados, aliados aqueles obtidos na transfecção H, sistema 4 + 4 (item 5.4), podem indicar ou um problema por contaminação, pouco provável devido aos cuidados durante a realização de cada experimento, ou de uma mutação no segmento NA do vírus pJG2000-K/NA-WSN, que determine um caráter letal no sistema 4 + 4.

No sistema 4 + 4, da transfecção H (item 5.4), talvez os demais segmentos de origem eqüina (HA, M e NS) não consigam suprir a deficiência apresentada por NA, o que não ocorre quando este segmento NA (mesmo clone) é utilizado num sistema 1 + 7, onde sete plasmídeos (pHW181-PB2, pHW182-PB1, pHW183-PA, pHW184-HA, pHW185-NP, pHW187-M e pHW188-NS) (HOFFMANN *et al.*, 2000b), contendo os cDNAs de uma amostra viral funcionalmente adaptada às condições laboratoriais (A/WSN/33), apresentam alta eficiência, capaz de levar à produção viral. De qualquer forma, mesmo com a obtenção do vírus pJG2000-K/NA-WSN, a morfologia no Ensaio de Placa já denota a necessidade de uma pesquisa mais detalhada deste vírus.

O vírus pJG2000-K/PB2-WSN (Figura 27), após a segunda passagem viral, apresentou mais de 15 x 10^5 PFU/ml, indicando a necessidade de um novo ensaio de placa, pois o título provavelmente estará acima de 10^5. Contudo, diante da falta de tempo, não foi possível realizar este novo ensaio. Dentre os vírus aqui produzidos, foi o que apresentou um melhor crescimento em células MDCK. Quanto à morfologia de placa, esta apresentou-se similar a dos controles A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33.

Todos os vírus aqui obtidos por rearranjos genéticos, com exceção de pDP2002-NPEq-WSN que não apresentou resultados no Ensaio de Placa, determinaram em células MDCK um crescimento inferior ao vírus A/WSN/33 recombinante (2x10^7 PFU/mL) que trata-se de uma amostra viral altamente adaptada (Zambon, 2001), com excelente crescimento nestas células. Os resultados apresentados pelo vírus, pJG2000-K/HA-WSN (2 x 10^2 PFU/mL) e principalmente pDP2002-NPEq-WSN, indicaram claramente que a troca por um gene do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, associando-o com os demais do vírus A/WSN/33, determina a obtenção de vírus não tão eficientes em células MDCK quanto o original A/WSN/33. Conseqüentemente, a adaptação ao hospedeiro e a interação genética são fatores de extrema relevância para uma replicação viral eficiente e como tais, deverão ser cuidadosamente analisados principalmente quando o objetivo for a produção de uma amostra vacinal.

Questões como os títulos virais inferiores a A/WSN/33, apresentados por todos os vírus

aqui produzidos, com excessão de pDP2002-NPEq-WSN (sem resultados no Ensaio de Placa), a diferença morfológica entre as placas apresentadas pelo vírus pJG2000-K/HA-WSN e os controles, provavelmente por HA ser de origem eqüina, assim como a detecção da população mista no Ensaio de Placa do vírus pJG2000-K/NA-WSN que pode ter determinado o caráter letal no sistema 4 + 4, indicam a necessidade da continuidade e aprofundamento destas análises. Estudos envolvendo MOI deverão ser aplicados para completar as análises dos títulos dos vírus obtidos por rearranjos genéticos em comparação com A/WSN/33. Contudo, a tese aqui realizada, abre novos caminhos para os estudos sobre o impacto destes rearranjos genéticos sobre a replicação viral, assim como a possibilidade em se pesquisar também a interação genética dos segmentos PB1 e PA do vírus A/Equine/Kentucky/2/8 com os demais segmentos de A/WSN/33.

5.6 CONFIRMAÇÃO DO SEGMENTO ESPECÍFICO AO VÍRUS A/EQUINE/KENTUCKY/2/86

A utilização dos iniciadores específicos ao segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 (amostra-específicos), nas RT-PCRs do vírus pJG2000-K/HA-WSN e do controle A/WSN/33, viabilizou inicialmente a confirmação da especificidade dos iniciadores para o segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, uma vez que os resultados foram negativos nas PCRs do vírus A/WSN/33 para este segmento. Da mesma forma, a partir do controle negativo, onde não foi utilizado cDNA (molde), foi assegurada a ausência de qualquer contaminação dos materiais utilizados nas reações de PCRs (Figura 32 A e B).

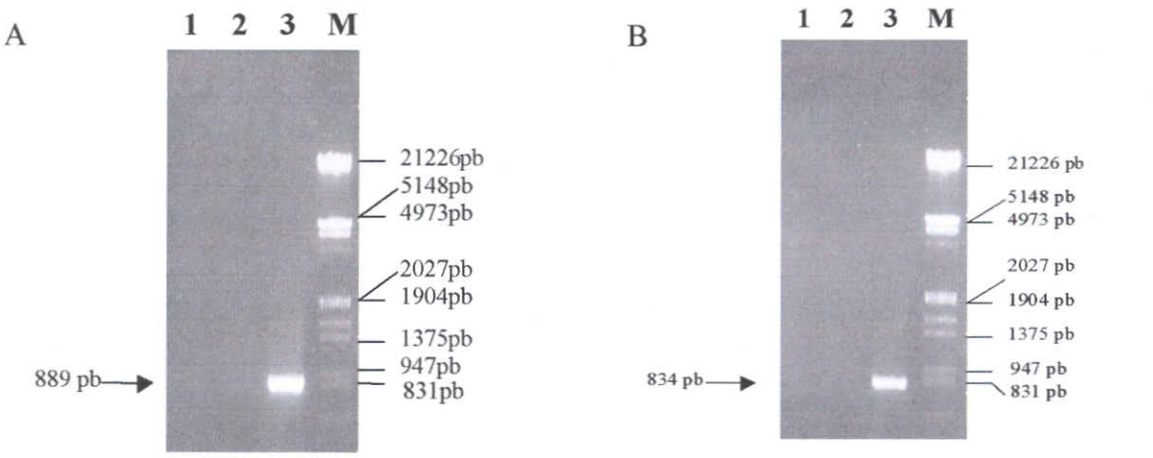


Figura 32. Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86: (A) HA-69-F e HA-958-R (seqüência K-HA F. 69); (B) HA-869-F e HA-1703-R (seqüência K-HA F. 869). Linhas 1, reação sem a adição de cDNA (molde); 2, vírus A/WSN/33; 3, vírus obtido por rearranjo genético, pJG2000-K/HA-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (A e B).

Na seqüência, diante da digestão dos respectivos produtos de PCRs com *Eco*RV, enzima cujo sítio de restrição encontra-se presente no segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e não do segmento HA do vírus A/WSN/33, foi possível confirmar este segmento, com origem no vírus da influenza eqüina, no vírus obtido por rearranjo genético, pJG2000-K/HA-WSN (Figura 33).

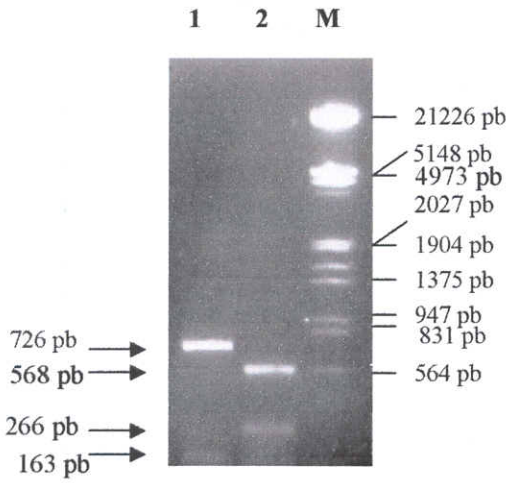


Figura 33. Confirmação do segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pJG2000-K/HA-WSN, obtido por rearranjo genético. Os produtos das PCRs (Figuras 32 A e B), foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RV, específica ao segmento HA do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente à seqüência K-HA F. 69, presente no vírus pJG2000-K/HA-WSN; 2, digestão do produto de PCR correspondente à seqüência K-HA F. 869, presente no vírus pJG2000-K/HA-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III

O mesmo princípio de iniciadores específicos ao segmento de interesse (Hoffmann *et al.*, 2000b), adotado para HA, foi aplicado aos vírus obtidos por rearranjos genéticos, pDP2002-NPEq-WSN e pJG2000-K/M-WSN, sendo que neste caso, a utilização dos "Iniciadores Universais" referentes aos segmentos NP e M (não cepa específica) viabilizou também a obtenção de resultados positivos na amplificação dos respectivos segmentos do vírus A/WSN/33 (Figuras 34 A e 35 A).

As digestões dos produtos de PCRs do vírus pDP2002-NPEq-WSN com *Xho*I, assim como do vírus pJG2000-K/M-WSN com *Afl*III, enzimas cujo os sítios de restrição encontravam-se presentes nos segmentos NP e M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e não nos segmentos de A/WSN/33 correspondentes, resultaram na confirmação dos segmentos NP e M, com origem no vírus eqüino, nos respectivos vírus obtidos por rearranjos genéticos. No caso dos produtos de PCRs referentes aos segmentos NP e M do vírus A/WSN/33, as digestões utilizando as mesmas enzimas *Xho*I e *Afl*III, respectivamente, determinaram resultados negativos (Figuras 34 B; 35 B).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

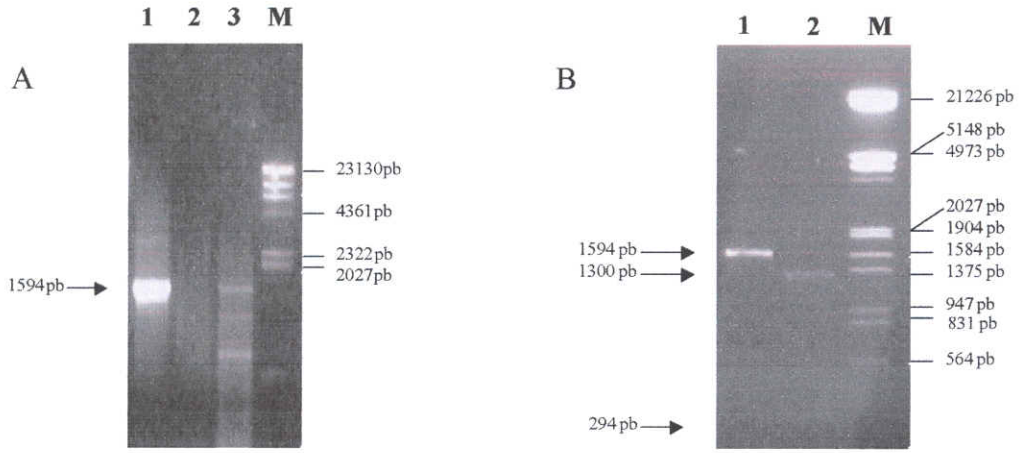


Figura 34. (A) Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento NP: BM-NP-1-F e BM-NP-1565-R. Linhas 1, vírus A/WSN/33; 2, reação sem a adição de cDNA (molde); 3, vírus pDP2002-NPEq-WSN, obtido por rearranjo genético. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III. (B) Confirmação do segmento NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pDP2002-NPEq-WSN. Os produtos das PCRs (Figura 34 A) foram digeridos com a enzima *Xho*I, específica ao segmento NP do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente a NP do vírus A/WSN/33; 2, digestão do produto de PCR correspondente a NP do pDP2002-NPEq-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III.

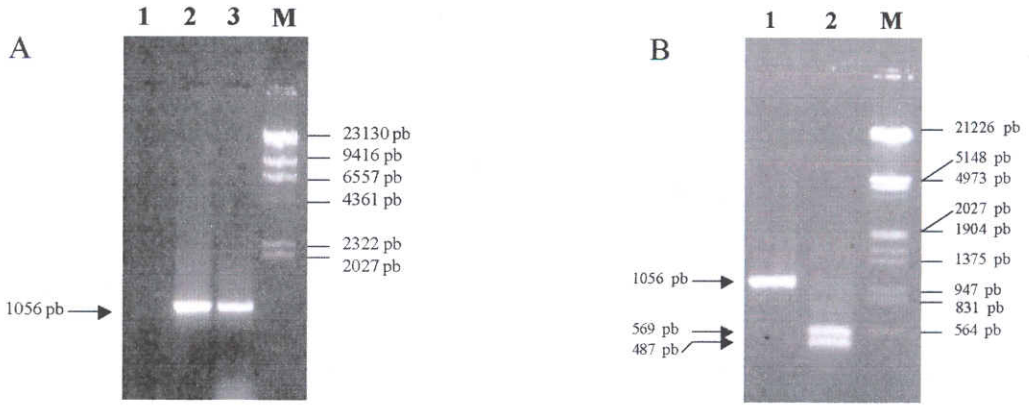


Figura 35. (A) Aplicação de RT-PCRs com iniciadores específicos ao segmento M: BM-M-1-F e BM-M-1027-R. Linhas 1, reação sem a adição de cDNA (molde); 2, vírus A/WSN/33; 3, vírus pJG2000-K/M-WSN, obtido por rearranjo genético. Linha M, marcador molecular Lambda DNA-*Hind*III. (B) Confirmação do segmento M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no vírus pJG2000-K/M-WSN. Os produtos das PCRs (Figura 35 A) foram digeridos com a enzima *Afl*III, específica ao segmento M do vírus A/Equine/Kentucky/2/86. Linhas 1, digestão do produto de PCR correspondente a M do vírus A/WSN/33; 2, digestão do produto de PCR correspondente a M do vírus pJG2000-K/M-WSN. Linha M, marcador molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III.

No caso dos vírus pJG2000-K/NA-WSN e pJG2000-K/NS-WSN, devido à ausência da seqüência dos segmentos NA e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 no http://www.flu.lan-gov, não foi possível determinar uma enzima cujo sítio de restrição encontrava-se presente nesses segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 e não nos respectivos segmentos do vírus A/WSN/33 para análise desses vírus.

Diante do pouco tempo que restava para o término do período da prorrogação do Programa de Doutorado Sanduíche nos EUA, não foi possível concluir os estudos dos vírus pJG2000-K/NA-WSN e pJG2000-K/NS-WSN. No entanto, pelo seqüenciamento, tanto do segmento NA de pJG2000-K/NA-WSN, quanto de NS do pJG2000-K/NS-WSN, comparando-os com os respectivos resultados dos sequenciamentos dos segmentos NA e NS do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 original, será possível confirmar a presença destes segmentos eqüino nos vírus obtidos por rearranjo genético. Uma outra opção, seria a Imunofluorescência Indireta de pJG2000-K/NA-WSN e pJG2000-K/NS-WSN, utilizando um anticorpo monoclonal específico para NA e NS eqüino.

Diante das dúvidas referentes à funcionalidade do segmento NA do vírus pJG2000-K/NA-WSN, o seqüenciamento viabilizará também a detecção de qualquer problema mutacional presente na seqüência de NA, assim como a obtenção de respostas que expliquem a população mista, verificada no Ensaio de Placa. Contudo, o estoque de clones referentes à pJG2000-K/NA, fornecidos por esta tese e entregues ao Dr. Ruben Donis, poderão ser também testados para a obtenção de novos vírus por rearranjos genéticos.

O vírus pJG2000-K/PB2-WSN foi obtido somente na última semana, anterior ao retorno ao Brasil. Conseqüentemente, não houve tempo hábil para a conclusão das análises deste vírus.

Neste contexto, através dos vírus obtidos por rearranjos genéticos entre A/Equine/Kentucky/2/86 e A/WSN/33, são estabelecidas novas informações e possibilidades de estudos das interações genéticas entre o vírus da influenza humana e eqüina que apesar da similaridade antigênica, ao serem submetidos a rearranjos genéticos (sistema 1 + 7) forneceram vírus não tão eficientes no crescimento em células MDCK quanto a amostra original humana (A/WSN/33). A relação da interação genética com a replicação é um fator que deve ser considerado principalmente na produção de amostras vacinais atenuadas, onde novos estudos in vitro devem ser verificados, assim como in vivo.

Da mesma forma, esta tese também estabeleceu novas alternativas pela recombinação em levedura para a obtenção da coleção de plasmídeos, tanto no campo da influenza, quanto para outros vírus, viáveis a serem estudados e aplicados à produção de recombinantes e ao desenvolvimento de amostras vacinais. Conseqüentemente, uma vez que a coleção de plasmídeos esteja disponível, a produção de rearranjos genéticos para estudos com fins vacinais pelo Sistema de Genética Reversa poderá ser rapidamente obtida, fator este crucial, tanto no campo da Medicina Veterinária, quanto na Medicina Humana, diante dos riscos de uma nova pandemia tão brutal quanto a "Gripe Espanhola" (1918).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

a) O Sistema de Recombinação em Levedura possibilitou a produção de diversos clones, onde plasmídeos recombinantes continham o cDNA correspondente a cada um dos oito segmentos genômicos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86;

b) A construção do vetor de clonagem pJG2000 possibilitou a utilização deste tanto no Sistema de Recombinação em Levedura, diante da viabilidade em propaga-lo em levedura (RFY206), assim como em *E. coli* (DH10B), quanto na seqüência, no Sistema de Genética Reversa, com a produção de RNA viral de sentido negativo e do mRNA de sentido positivo para a obtenção dos vírus por rearranjos genéticos;

c) A avaliação inicial dos clones representantes dos segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, realizada pela digestão com a enzima *Eco*RV, garantiu a seleção dos clones considerados a princípio positivos. Da mesma forma, foi possível estabelecer condições para a análise da expressão gênica dos clones referentes a PB1, PB2, PA e NP (da primeira fase do trabalho), através do Sistema de Replicação de um Minigenoma (P5) e aplicação do Ensaio de CAT (monitoração da atividade de CAT), constatando resultados negativos ou de baixa atividade de CAT, principalmente no caso dos segmentos PB1 e NP. Novos clones obtidos para estes segmentos (segunada fase do trabalho), assim como no caso dos clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS, puderam ser analisados diretamente no Sistema de Genética Reversa;

d) O Sistema de Genética Reversa, além de viabilizar a avaliação de diversos clones referentes aos segmentos HA, NA, M e NS, assim como os correspondentes a PB1, PB2 e NP da segunda fase do trabalho, também possibilitou a obtenção dos vírus por rearranjos genéticos entre o vírus da influenza eqüina, A/Equine/Kentucky/2/86, e o vírus da influenza humana, A/WSN/33, estabelecendo condições para a avaliação das interações genéticas destes;

e) A obtenção dos vírus por rearranjos genéticos constatou a capacidade dos clones dos segmentos genômicos PB2, HA, NP, NA, M e NS, obtidos pela Recombinação em levedura, em interagirem num sistema 1 + 7 com o vírus da influenza humana e produzirem vírus. A confirmação dos respectivos segmentos do vírus A/Equine/Kentucky/2/86 nos vírus pJG2000-K/HA-WSN, pJG2000-K/M-WSN e pDP2002-NPEq-WSN, garantiu a prova final da efetividade da associação dos dois sistemas, de recombinação em levedura e de genética reversa, possibilitando não só a utilização destes no campo da influenza (mais especificamente da influenza eqüina), mas também em outras famílias virais;

f) Os estudos iniciais, realizados com os seis vírus aqui obtidos por rearranjos genéticos, constataram que a troca por um gene do vírus A/Equine/Kentucky/2/86, associando-o com sete do vírus A/WSN/33 não confere a obtenção de vírus tão eficientes quanto o original A/WSN/33 em células MDCK.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N., SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 1986, p. 488-498.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (Eds.). *Current protocols in molecular biology*. New York: Jonh Wiley & Sons, 1990. Section II: Uses of fusion genes in mammalian transfection, supp. 14, unit 9.6A.

BECKER, C. H. Influenza eqüina. In: BEER, J. *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos: Vírus, Clamídias, Rickétsias e Microplasmose*. São Paulo: Roca, 1988, p. 125-129.

BRENT, R., PTASHNE, M. *Cell,* v.43, p. 729-736, 1985.

CARTER, G. R. *Veterinarian's Guide to the Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases*. Veterinary Medicine Publishing Company, Lenexa, Kansas, 1986, p. 133-134.

CHAMBERS, T. M. International equine influenza expert surveillance panel. In: *Proposal for the WHO GLOBAL AGENDA OF INFLUENZA* [on line]. Office International des Epizooties, Reference Laboratory, Department of Veterinary Science, University of Kentucky - [cited 14 November 2002]. Available from World Wide Web: < http://www.who.int/emc/diseases/flu/globalagenda/Proposal/ChambersT.htm>

CHAMBERS, T. M., HOLLAND, R. E., TUDOR, L. R., TOWNSEND, H. G. G., COOK, A., BOGDAN, J., LUNN, D. P., HUSSEY, S., WHITAKER-DOWLING, P., YOUNGNER, J. S., SEBRING, R. W., PENNER, S. J., STIEGLER, G. L. (General Articles) A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine Veterinary Journal*,v. 33, n. 7, p. 630-636, 2001.

COLLIER, L. OXFORD, J. *Human virology*: a text for students of medicine, dentistry and microbiology. Oxford: Oxford University Press, 1996. Cap. 10: Orthomyxovirus: influenza, p. 123 - 137.

CORRÊA, O. *Doenças infecciosas dos animais domésticos - viroses dos animais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos S. A., 1974. V. 3, p. 192-196.

CORRÊA, W. M., CORRÊA, C. N. M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI - Editora médica e Científica Ltda, 1992, p. 575-577.

DIMMOCK, N. J., PRIMROSE, S. B. *Introduction to modern virology*. 4th ed. Basic Microbiology Series, 1998, p. 276-287.

DULBECCO, R., GINSBERG, H. S. *Microbiology de Davis*. São paulo: Harper & Row do Brasil, 1980. Cap. 56: Os mixovírus, p. 1558-1580.

ELLIS, J. S., ZAMBON, M. C. Molecular diagnosis of influenza. *Rev. Med. Virol.*, v. 12, p. 375-389, 2002.

ENAMI, M. Improved technique to genetically manipulate influenza virus. *International Conference on Negative Strand Viruses*. Dublin, Ireland, Abstr., 93, 96, 1997.

ENAMI, M., LUYTJES, W., KRYSTAL, M., PALESE, P. Introduction of site-specific mutation into the genome of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 87, p. 3802-3805, 1990

ENAMI, M., SHARMMA, G., BENHAM, C., PALESE, P. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*, v. 185, p. 291-298, 1991.

FENNER, F., BACHMANN, P. A, GIBBS, E. P. J., MURPHY, F. A, STUDDERT, M. J., WHITE, D. O. *Veterinary virology*. London: Academic Press, 1987. 660 p. Chapter 26: *Orthomyxoviridae*, p. 473-484.

FERREIRA, A. J. Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1976, p. 361-363.

FIELDS, S., SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, v. 340, p. 245-246, 1989.

GÓMEZ-PUERTAS, P., MENA, I., CASTILLO, M., VIVO, A., PEREZ-PASTRANA, E., PORTELA, A. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1635-1645, 1999.

HAGAN, W. A., BRUNER, D. W. The infectious Diseases of Domestic Animals. 4. ed. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, New York, 1961, p. 929-933.

HAN, X. It's all about influenza virus. [cited 12 December 2002]. Available from World Wide Web: <http://www.huhaha.com/pages/fusiopage.html>

HAYDEN, F. G., PALESE, P. Influenza virus. In: RICHMAN, D. D., WHITLY, R. J., HAYDEN, F. G. *Clinical virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997, 911 - 942.

HIGGINS, A. J., WRIGHT, I. M. *The Equine Manual*. W. B. Saunders Company Ltd, London, 1995, p. 13-16.

HOFFMANN, E., KRAUSS, S., PEREZ, D. R., WEBBY, R., WEBSTER, R. G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, v. 20, p. 3165-3170, 2002 a.

HOFFMANN, E., MAHMOOD, K., YANG, C-F., WEBSTER, R. G., GREENBERG, H. B., KEMBLE, G. Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences,USA*, v. 99, n. 17, p. 11411-11416, august, 2002 b.

HOFFMANN, E., NEUMANN, G., KAWAOKA, Y., HOBOM, G., WEBSTER, R. G. "Ambisense" apprroach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology*, v. 267, p. 310-317, 2000 a.

HOFFMANN, E., NEUMANN, G., KAWAOKA, Y., HOBOM, G., WEBSTER, R. G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* v.97, n. 11, p. 6108-6113, may, 2000 b.

HOFFMANN, E., STECH, J., GUAN, Y., WEBSTER, R. G., PEREZ, D. R. Universal primer set for full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.*, v. 146, p. 2275-2289, 2001.

HOFFMANN, E., WEBSTER, R. G. Unidirectional RNA polymerase I - polymerase II transcription systems for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 2843-2847, 2000.

HONDA, A., UÉDA, K., NAGATA, K., ISHIHAMA, A. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J. Biochem.*, v. 104, p. 1021-1026, 1988.

Influenza viruses [online]. [cited 11 June 2001]. Available from Internet: <wysiwyg://46/http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/Influenza.htm>

KIMURA, N. , NISHIDA, M., NAGATA, K., ISHIHAMA, A., ODA, K., NAKADA, S. Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *Jorunal of General Virology*, v. 73, p. 1321-1328, 1992.

KITAGAWA, K., ABDULLE, R. A In vivo site-directed mutagenesis of yeast plasmids using a three-fragment homologous recombination system. *BioTechniques*, v. 33, p. 288-294, 2002.

LAMB, R. A, KRUG, R. M. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N. III. KNIPE, D. M., 1950 - IV. HOWLEY, P. M. V., GRIFFIN, D. E. *Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins, 2001. v. 1, cap. 46, p. 1487-1488.

LAVER, W. G., BISCHOFBERGER, N., WEBSTER, R. G. Disarming fluviruses. *Scientific American*, Jan., p. 56-65, 1999.

LIN, C., HOLLAND, R. E. Jr., WILLIAMS, N. M., CHAMBERS, T. M. Cultures of equine respiratory epithelial cells and organs explants as tools for the study of equine influenza virus infection. *Arch. Virol.*, v. 146, p. 2239-2247, 2001.

LUYTJES, W., KRYSTAL, M., ENAMI, M., PAVIN, J. D., PALESE, P. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*, v. 59, p. 1107-1113, 1989.

MAASSAB, H. F., BRYANT, M. L. The development of line attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med.Virol.*, v. 9, p. 237-244, 1999.

MANUGUERRA, J. C., HANNOUN, C. *Influenza and other viral respiratory diseases*: surveillance and laboratory diagnosis. Paris: Institut Pasteur, 1999, 287 p.

MAYR, A., GUERREIRO, M. G. *Virologia Veterinária*. 2. ed. Porto Alegre: editora Sulina, 1981, p. 361-363.

MENA, I., VIVO, A., PEREZ, E., PORTELA, A. Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.*, v. 70, p. 5016-5024, 1996.

MOHANTY, S. B., DUTTA, S. K. *Veterinary Virology* Philadelphia: Lea & Febiger, 1981, p. 174-177.

MURPHY, B. R., CHANOCK, R. M. Imunization against viruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. and CHANOCK, R. M. (eds.), *Virology*, 2. Ed. New York: Raven Press, v.1, p. 469-502, 1990.

NEUMANN, G., KAWAOKA, Y. Reverse genetics of influenza virus. *Virology*, v. 287, p. 243-250, 2001.

NEUMANN, G., KAWAOKA, Y. Generation of influenza A virus from cloned cDNAs - historical perspective and outlook for the new millenium. *Ver. Med. Virol.*, v. 12, p. 13-30, 2002.

NEUMANN, G., WATANABE, T., ITO, H., WATANABE, S., GOT, H., GAO, P., HUGHES, M., PEREZ, D. R., DONIS, R., HOFFMANN, E., HOBOM, G., KAWAOKA, Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences,USA*, v.96, p. 9345-9350, 1999.

NEUMANN, G., WHITT, M. A., KAWAOKA, Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *Journal of General Virology*, v. 83, p. 2635-2662, 2002.

NEUMANN, G., ZOBEL, A., HOBOM, G. RNA polymerase I- mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology*, v. 202, p. 477-479, 1994.

ODEND'HAL, S. *The Geographical Distribution of Animal Viral Diseases*. Academic Press, Inc., New York, 1983, p. 176-177.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. [cited 1 June 2001]. Chapter 3, 4.5. Equine Influenza. Available from World Wide Web: < http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00070.htm>.

ESCOLA DE VETERINÁRIA BIBLIOTECA DA UFMG

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Brazil / equine influenza. *Handistatus II multiannual animal disease status*. [cited 9 August 2003]. Available form World Wide Web: http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c-mald=64

O GLOBO. Menino contrai gripe das aves e traz medo de epidemia. O Globo, Rio de Janeiro, 20 Jan. 2003 a. 2º Caderno, p. 31.

O GLOBO. Gripe das aves já matou homem em Hong Kong; caso é o primeiro fatal desde surto no território em 1997. O Globo, Rio de Janeiro, 21 Jan. 2003 b. 2º Caderno, p. 26.

OLIVEIRA, G. S. DE, LOUREIRO, B. O, SCHIAVO, P. A., LIMA, C. H. DE A., MAZUR, C., ANDRADE, C. M. Isolamento e carcterização biomolecular do vírus influenza tipo A, subtipo H3N8, em um surto de gripe eqüina no Estado do Rio de Janeiro. In: SEMANA DO MÉDICO VETERNÁRIO, XIX, 2002, UFRRJ, Rio de Janeiro. *Anais do V prêmio de pesquisa Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia*. Rio de Janeiro: 2002.

ORIGENE TECHNOLOGIES. Duplex-A™ yeast two-hybrid system. Manual version 2.7, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, 1998, p.1-23.

PALESE, P., ZAVALA, F., MUSTER, T., NUSSENZWEIG, R. S., GARCÍA-SASTRE, A. Development of a novel influenza virus vaccines and vectors. *Journal of Infectious Diseases*, 176 (Supl. 1): S45-S49, 1997.

PEKOSZ, A., HE, B., LAMB, A. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: closing the circle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* v. 96, p. 8804-8806, 1999.

PEREZ, D. R., DONIS, R. O. A 48-amino-acid region of the influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J. Virol.*, v.69, p. 6932-6939, 1995.

PEREZ, D. R., DONIS, R. O. The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology*, v.249, p. 52-61, 1998.

PORTELA, A, DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctinal RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 723-734, 2002.

POTTER, C. W. A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology*, Sheffield, v. 91, p. 158-200, June, 2001.

PROMEGA CORPORATION. *CAT enzyme assay system with reporter lysis buffer*. [on line]. Technical bulletin no. 084. p. 1-8. August 2000. Available from Internet: www.promega.com>.

REED, L. J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end point. *Amer. J.* Hyg., p.493-497, 1938.

RENEGER, K. B. Influenza virus infectiuos and immunity: a review of human and animal models. *Laboratory Animal Science*, v. 42, p. 222-232, 1992.

SCHULTZ-CHERRY, S., DYBDAHL-SISSOKO, N., NEUMANN, G., KAWAOKA, Y., HINSHAW, V. S. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *Journal of Virology*, v. 75, n. 17, p. 7875-7881, sep. 2001.

SLEMONS, R. D., BRUGH, M. *Influenza*. In: BERAN, G. W. (Ed.) Handbook of zoonoses. 2nd ed. Sec. B: Viral. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 385 - 395.

STEINHAUER, D. A, SKEHEL, J. J. Genetics of influenzaviruses. *Annu. Rev. Genet.*, v. 36, p. 305-332, 2002

VIDAL, M.; BRACHMANN, R. K.; FATTAEY, A.; HARLOW, E. and BOEKE, J. D. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proceedings National Academy Sciences U.S.A.*, v. 93, p. 10315-10320, 1996.

WAGNER, R., MATROSOVICH, M., KLENK, H-D. Functional balance between hemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Ver. Med. Virol.*, v. 12, p. 159-166, 2002.

WEBSTER, R. G. Influenza: an emerging disease. *Specias Insue Emerging Infectious Diseases*. [on line]. July - September, 1998, v. 4, n. 3. [cited 1 June 2001]. Available from Internet: <wysiwyg://5/http;//www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no3/webster.htm>.

WEBSTER, R. G., THOMAS, T. L. Efficacy of equine influenza vaccines for protection against A/Equine/Jilin/89 (H3N8) - a new equine influenza virus. *Vaccine*, v. 11, p. 987-993, 1993.

WHITTAKER, G. R. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. [cited 15 May 2001]. Available from World Wide Web: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002447h.htm >.

WILSON, W. D. Equine influenza. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v. 9, p. 257-282, 1993.

WOROBEY, M., HOLMES, E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 2535-2543, 1999.

WRIGHT, P. F., WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N. III. KNIPE, D. M., 1950 - IV. HOWLEY, P. M. V., GRIFFIN, D. E. *Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins, 2001. V. 1, cap. 47, p. 1533-1535.

ZAMBON, M. C. The pathogenisis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.*, v. 11, p. 227-241, 2001.

8. ANEXO

8.1 INICIADORES

As seqüências complementares às do vírus da influenza estão representadas em negrito. O terminal 5' apresenta seqüências de reconhecimento para as enzimas de restrição, *Bsm*BI (BM) ou *Bsa*I (BA), ou uma seqüência do vetor pJG2000 para a Recombinação em Levedura (HW).

8.1.1 BM-PB1-1-F
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGCAAACTATA**

8.1.2 PB1-1230-R
Seqüência (5'a 3'):
TGAAGCAGTCCCATCGATTA

8.1.3 HW-PB1-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGCAAACTATA**

8.1.4 PB1-1141-F
Seqüência (5'a 3'):
CTTGCAAGCATTGATCTGAA

8.1.5 BM-PB1-2341-R
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGCATTTTTT**

8.1.6 HW-PB1-2341-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGCATTTTTT**

8.1.7 BmPB1EqKyF
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGGACCAGCAGGAATGCTCGC

8.1.8 BmPB1EqKyR
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATTGCGACAAAACCATACCGG

8.1.9 BM-PB2-1-F
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGTCAAATATA**

8.1.10 PB2-1193-R
Seqüência (5'a 3'):
CTCCCACTTACTATCAATTG

8.1.11 HW-PB2-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGTCAAATATA**

8.1.12 PB2-1111-F
Seqüência (5'a 3'):
ACAAGTCAATTGAAATGGGC

8.1.13 BM-PB2-2341-R
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGTCGTTTTT**

8.1.14 HW-PB2-2341-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGTCGTTTTT**

8.1.15 BaPB2EqKyF
Seqüência (5'a 3'):
TATTGGTCTCAGGGACAGTACACAGATTGGTGG

8.1.16 BaPB2EqKyR
Seqüência (5'a 3'):
ATATGGTCTCGTATTGGCCCTAGGGACCAGGG

8.1.17 HW-PA-1-F-II
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGTACTGATCC**

8.1.18 EqPA-127-R
Seqüência (5'a 3'):
ATTTGTTTGTTTCAATTTTCGG

8.1.19 PA-64-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGAGCTTGCGGAAAAGRC

8.1.20 PA-1182-R
Seqüência (5'a 3'):
GTCTTTACAATCCTCAAAATCC

8.1.21 PA-1111-F
Seqüência (5'a 3'):
ACAAGTCAATTGAAATGGGC

8.1.22 PA-2134-R
Seqüência (5'a 3'):
AGGAAGGAGTTGAACCAAG

8.1.23 EqPA-2110-F
Seqüência (5'a 3'):
AATGATCCCTGGGTTTTGC

8.1.24 HW-PA-2233-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTACTT

8.1.25 BmPAEqKyF
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGGAAAAGATTTGAAATCACAGG

8.1.26 BmPAEqKyR
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATTTTTCTCCTCATGCTCGC

8.1.27 HW-HA-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGGG**

8.1.28 KyH3HA-120-R
Seqüência (5'a 3'):
CCAGACATAATGTGGCTGTG

8.1.29 HA-69-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCTACAGTCAAAACCCAACC

8.1.30 HA-958-R
Seqüência (5'a 3'):
TGAAATGGTTTGTCGTTGGG

8.1.31 HA-869-F
Seqüência (5'a 3'):
CTCTGTAATGAGATCAGATGC

8.1.32 HA-1703-R
Seqüência (5'a 3'):
GTTGCCTTTTTGGCAAGCCC

8.1.33 KyHAHA-1642-F
Seqüência (5'a 3'):
CATGCTTCTTAATTTGCGTTG

8.1.34 BM-NP-1-F ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGGTAGATAAT**

8.1.35 BM-NP-1565-R ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGGTATTTTT**

8.1.36 HW-NP-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGGTAGATAAT**

8.1.37 HW-NP-1565-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGGTATTTTT**

8.1.38 BA-NA-1-F-II
Seqüência (5'a 3'):
TATTGGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAA**

8.1.39 NA-840-R
Seqüência (5'a 3'):
TGTGTCCCCCATTGAAACTT

8.1.40 HW-NA-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGAGT**

8.1.41 NA-751-F
Seqüência (5'a 3'):
CGGCAAACAGGCAAGCTAAA

8.1.42 BA-NA-1413-R
Seqüência (5'a 3'):
ATATGGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT**

8.1.43 HW-NA-1413-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT**

8.1.44 BM-M-1-F ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGTAG**

8.1.45 BM-M-1027-R ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT**

8.1.46 HW-M-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGTAG**

8.1.47 HW-M-1027-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT**

8.1.48 BM-NS-1-F ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
TATTCGTCTCAGGG**AGCAAAAGCAGGGTG**

8.1.49 BM-NS-890-R ("iniciador universal")
Seqüência (5'a 3'):
ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAAGGGTGTTTT**

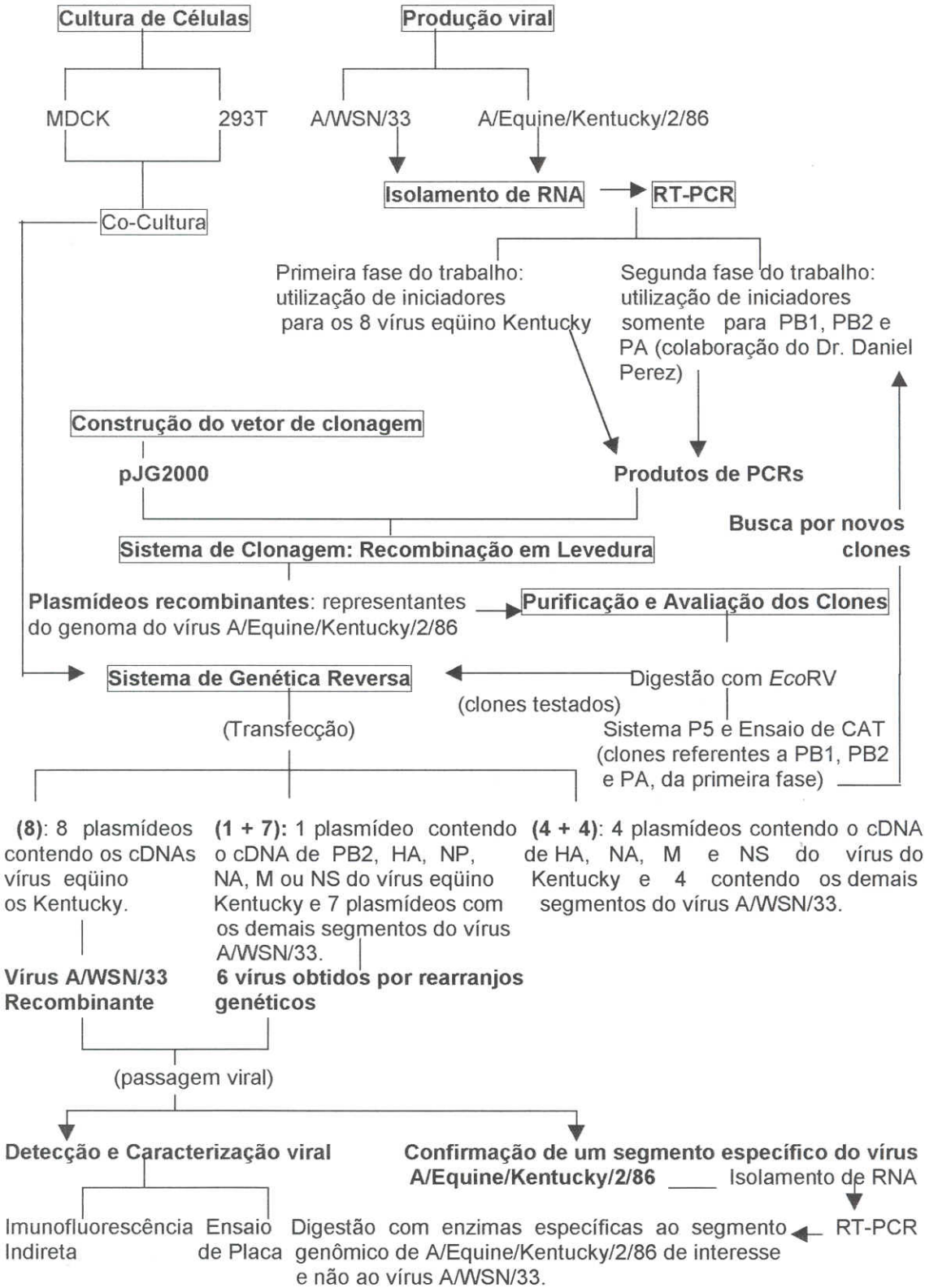
8.1.50 HW-NS-1-F
Seqüência (5'a 3'):
GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG**AGCAAAAGCAGGGTG**

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

8.1.51 HW-NS-890-R
Seqüência (5'a 3'):
CGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTATT**AGTAGAAACAAGGGTGTTTT**

8.1.52 NP-581-F
Seqüência (5'a 3'):
CCGGTCCTGCAGTAAAAGGT

8.2 ESQUEMA SEQÜENCIAL DA METODOLOGIA UTILIZADA NA TESE



8.3 SEQÜENCIAMENTOS

8.3.1 Seqüenciamento com iniciador BM-PB1-1-F: clone 1 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73.

8.3.1.1 Seqüência de nucleotídeos
L: A/Equine/London/1416/73
C: clone 1 pJG2000-K/PB1

```
L:  37 ccgactctactcttcttaaaagtgccagcgcaaaatgctataagcacaacattcccttat  96
       |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:   1 ccgactctactcttcttaaaggtgccagcgcaaaatgctataagcacaacattcccttat  60


L:  97 actggagatcctccctacagtcatggaacaggaacaggatacaccatggatactgtcaac 156
       |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
C:  61 actggagatcctccctacagtcatggaacagggacaggatacaccatggatactgtcaac 120


L:  57 agaacacaccaatactcagaaaaggggaaatggacaacaaacactgagattggagcacca 216
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C: 121 agaacacaccaatactcagaaaaggggaaatggacaacaaacactgagattggagcacca 180


L: 217 caactcaatccaatcgatgggccgctgcctgaagacaatgaaccaagcggatacgcccaa 276
       |||||||||||||||||||| ||||| |||||||||| |||||||||||| |||||||||
C: 181 caactcaatccaatcgatggaccgcttcctgaagacagtgaaccaagcgggtacgcccaa 240


L: 277 acagattgtgtattggaagcaatggcttccttgaagagtcccatcccgggatctttgaa 336
       |||||| |||||| |||||||||||||| |||||||| |||||||||| |||||||||
C: 241 acagatcgtgtatgggaagcaatggctttccttgaagaatcccatcccggaatctttgaa 300


L: 337 aactcgtgtcttgaaacgatggaggtggttcagcagacaagagtggacaaactaacacaa 396
       || ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
C: 301 aattcgtgtcctgaaacgatggaggtggttcagcagacaagagtggacaaactaacgcaa 360


L: 397 ggtcgacaaacttacgattggaccttgaataggaatcaacctgctgcaacagcacttgct 456
       |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
C: 361 ggtcnacaaacttacgattggaccttgaataggaatcaacctgccgcaacagcacttgct 420


L: 457 aatacaattgaagtgttcagatcaaatgatctgacttccaatgagtcagggagattaatg 516
       |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
C: 421 aatacaattgaagtgttcagatcaaatgatctgacttccaatgagtcagggagatnaatg 480


L: 517 gacttcctcaaagatgtcatggagtccatgaacaaggaagaaatggaaataacaacacac 576
       |||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||| ||||||||||||
C: 481 gacttcctcaaagatgtcatggagtccatgaacaaggaagnnatgganataacaacacac 540
```

```
L:577 ttccaacggaagaggagagtgagagacaacatgacaaagaaaatggtgacacaaagaa-c 635
      ||||||| |||||| ||||| ||| |||||||||| |||||| |||| || ||| |
C:541 ttccaacngaagagaagagtaaganacaacatgacnnagaaaannntgacnnaangaanc 600


L:636 catagggaagaaaaaacaa-cgattgaac 663
       |||    | ||||||||| |||||||||
C:601 natannnnanaaaaaacaancgattgaac 629
```

8.3.1.2 Seqüência de aminoácidos
L: A/Equine/London/1416/73
C: clone 1 pJG2000-K/PB1

```
L: 5   PTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIGAP 64
       PTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIGAP
C: 1   PTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIGAP 60

L:65   QLNPIDGPLPEDNEPSGYAQTDCVLEAMASLEESHPGIFENSCLETMEVVQQTRVDKLTQ 124
       QLNPIDGPLPED+EPSGYAQTD V EAMA LEESHPGIFENSC ETMEVVQQTRVDKLTQ
C:61   QLNPIDGPLPEDSEPSGYAQTDRVWEAMAFLEESHPGIFENSCPETMEVVQQTRVDKLTQ 120

L:125  GRQTYDWTLNRNQPAATALANTIEVFRSNDLTSNESGRLMDFLKDVMESMNKEEMEITTH 184
       G QTYDWTLNRNQPAATALANTIEVFRSNDLTSNESGR MDFLKDVMESMNKE M ITTH
C:121  GXQTYDWTLNRNQPAATALANTIEVFRSNDLTSNESGRXMDFLKDVMESMNKEXMXITTH 180

L:185  FQRKRRVRDNMTKK 198
       FQ KRRVR NM  K
C:181  FQXKRRVRXNMXXK 194
```

8.3.2 Seqüenciamento com iniciador BM-PB1-1-F: clone 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73.

8.3.2.1 Seqüência de nucleotídeos
L: A/Equine/London/1416/73
C: clone 3 pJG2000-K/PB1

```
L: 29  atgtcaacccgactctactcttcttaaaagtgccagcgcaaaatgctataagcacaacat 88
       ||||||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
C: 1   atgtcaatccgactctactcttcttaaaggtgccagcgcaaaatgctataagcacaacat 60

L: 89 tcccttatactggagatcctccctacagtcatggaacaggaacaggatacaccatggata 148
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
C: 61 tcccttatactggagatcctccctacagtcatggaacagggacaggatacaccatggata 120

L:149 ctgtcaacagaacacaccaatactcagaaaaggggaaatggacaacaaacactgagattg 208
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:121 ctgtcaacagaacacaccaatactcagaaaaggggaaatggacaacaaacactgagattg 180

L:209 gagcaccacaactcaatccaatcgatgggccgctgcctgaagacaatgaaccaagcggat 268
      |||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||||||||||||||| |
C:181 gagcaccacaactcaatccaatcgatggaccgcttcctgaagacaatgaaccaagcgggt 240

L:269 acgcccaaacagattgtgtattggaagcaatggcttccttgaagagtcccatcccggga 328
      |||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||| |||||||||| |
C:241 acgcccaaacagattgtgtattggaagca-tggctttccttgaagaatcccatcccggaa 299

L:329 tctttgaaaactcgtgtcttgaaacgatggaggtggttcagcagacaagagtggacaaac 388
      |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:300 tctttgaaaattcgtgtcttgaaacgatggaggtggttcagcagacaagagtggacaaac 359

L:389 taacacaaggtcgacaaacttacgattggaccttgaataggaatcaacctgctgcaacag 448
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||
C:360 taacacaaggtcgacaaacttacgattggaccttgaataagaatcaacctgccgcaacag 419

L:449 cacttgctaatacaattgaagtgttcagatcaaatgatctgacttccaatgagtcaggga 508
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:420 cacttgctaatacaattgaagtgttcagatcaaatgatctgacttccaatgagtcaggga 479

L:509 gattaatggacttcctcaaagatgtcatggagtccatgaacaaggaagaaatggaaataa 568
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:480 gattaatggacttcctcaaagatgtcatggagtccatgaacaaggaagaaatggaaataa 539
```

```
L:569 caacacacttccaacggaagaggagagtgagagacaacatgacaaagaaaatggtgacac 628
      |||||||||||||||||||||| |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||
C:540 caacacacttccaacggaagagaagagtangagacaacatgacaaagaaaatggtgacac 599


L:629 aaagaaccatagggaagaaaaaacaacgattgaacagaaagagctatctgatcagggcat 688
      ||||| ||||||||||||||| | ||||| ||||||||||||||||||||||||||||
C:600 aaaganccatagggaagaaaaancnacgatngaacagaaagagctatctgatcagggcat 659


L:689 taaccctgaa-cacaatgaccaaggatgctgagagagggaaattgaaacgacgagcaatt 747
       ||||    | |||| ||||||  || |||||||||||||| ||||||||||  |||||
C:660 naaccnnnnagcacantgaccanngacgctgagagagggaanttgaaacgacggncaatt 719


L:748 gcaaccccaggaatgcagata 768
      || |||||||||||||| |||
C:720 gc-accccaggaatgcanata 739
```

8.3.2.2 Seqüência de aminoácidos
L: A/Equine/London/1416/73
C: clone 3 pJG2000-K/PB1

```
L:  3   VNPTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIG 62
        VNPTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIG
C:  1   VNPTLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTTNTEIG 60

L:  63  APQLNPIDGPLPEDNEPSGYAQTDCVLEAMASLEESHP 100
        APQLNPIDGPLPEDNEPSGYAQTDCVLEA  SL+   P
C:  61  APQLNPIDGPLPEDNEPSGYAQTDCVLEAWLSLKNPIP 98
```

8.3.3 Seqüenciamento com iniciador PB1-1230-R: clone 3 do pJG2000-K/PB1 (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de PB1 do vírus A/Equine/London/1416/73.

8.3.3.1 Seqüência de nucleotídeos

L: A/Equine/London/1416/73

C: clone 3 pJG2000-K/PB1

```
L:425 ataggaatcaacctgctgcaacagcactt-gctaatacaatt-gaagtgttcagatcaaa 482
      ||| || ||| ||||| ||| | |||| | ||||| || | | || ||| ||||||||||
C:779 atangantcancctgccgcancngcacntngctaanacnantngangtgntcagatcaaa 720

L:483 tgatctgacttccaatgagtcagggagattaatggacttcctcaaagatgtcatggagtc 542
      |||||||||| | |||||||| ||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||
C:719 tgatctgacttnccatgagtcanggagattnatgnacttcctcaaagatgtcatggagtc 660

L:543 catgaa-caaggaagaaatggaaataacaacacacttccaacggaagaggagagtgagag 601
      |||| | || |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| ||||| ||||
C:659 catgnancanggaagaaatggaaataacnacacacttccaacggaagagaagagtaagag 600

L:602 acaacatgacaaagaaaatggtgacacaaagaaccatagggaagaaaaaacaacgattga 661
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:599 acaacatgacaaagaaaatggtgacacaaagaaccatagggaagaaaaaacaacgattga 540

L:662 acagaaagagctatctgatcagggcattaaccctgaacacaatgaccaaggatgctgaga 721
      |||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||| |||||||
C:539 acagaaagagctatctgatcagggcattaaccttgagcacaatgaccaaggacgctgaga 480

L:722 gagggaaattgaaacgacgagcaattgcaaccccaggaatgcagataagagggtttgtat 781
      |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
C:479 gagggaaattgaaacgacgggcaattgcaaccccaggaatgcagataagaggatttgtat 420

L:782 actttgttgaaacattggcccgaaggatatgtgaaaagcttgaacaatcaggattgccag 841
      | |||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
C:419 atttgttgaaacattagcccgaagaatatgtgaaaagcttgaacaatcaggattgccag 360

L:842 ttggcggtaatgagaagaaggccaaactggctaatgtcgtcagaaagatgatgactaatt 901
      |||||||||||||||| |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||
C:359 ttggcggtaatgagaaaaaggccaaactggcgaatgtcgtcagaaaaatgatgactaatt 300

L:902 cccaagacactgaactctcttcaccatcactggggacaataccaaatggaatgaaaatc 961
      |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:299 cccaagacactgaactctccttcaccatcactggggacaataccaaatggaatgaaaatc 240

L:962 agaacccacgcatgttcctggcaatgatcacatacataactagaaaccagccagaatggt1021
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:239 agaacccacgcatgttcctggcaatgatcacatacataactagaaaccagccagaatggt 180

L:1022tcagaaatgttctaagccttgcaccgattatgttctcaaataaaatggcaagactgggga1081
      |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:179 tcagaaatgttctaagcattgcaccgattatgttctcaaataaaatggcaagactgggga 120

L:1082agggatatatgtttgaaagcaaaagtatgaaattgagaactcagataccagccgaaatgc1141
      | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
C:119 aaggatatatgtttgaaagcaaaagtatgaaattgagaactcagataccagcagaaatgc 60
```

```
L:1142ttgcaagcattgatctgaaatatttcaatgactcaccaaaaagaaaattgagaagata 1200
      | |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
C:59  tcgcaagcattgatctgaaatatttcaatgactcaacaaaaagaaaattgagaagata 1
```

8.3.3.2 Seqüência de aminoácidos
L: A/Equine/London/1416/73
C: clone 3 pJG2000-K/PB1

```
L:177 EEMEITTHFQRKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNRKSYLIRALTLNTMTKDAERGKL 236
      EEMEI THFQRKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNRKSYLIRALTL+TMTKDAERGKL
C:22  EEMEIXTHFQRKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNRKSYLIRALTLSTMTKDAERGKL 81

L:237 KRRAIATPGMQIRGFVYFVETLARRICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDT 296
      KRRAIATPGMQIRGFVYFVETLARRICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDT
C:82  KRRAIATPGMQIRGFVYFVETLARRICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDT 141

L:297 ELSFTITGDNTKWNENQNPRMFLAMITYITRNQPEWFRNVLSLAPIMFSNKMARLGKGYM 356
      ELSFTITGDNTKWNENQNPRMFLAMITYITRNQPEWFRNVLS+APIMFSNKMARLGKGYM
C:142 ELSFTITGDNTKWNENQNPRMFLAMITYITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYM 201

L:357 FESKSMKLRTQIPAEMLASIDLKYFNDSTKKKIEKI 392
      FESKSMKLRTQIPAEMLASIDLKYFNDSTKKKIEKI
C:202 FESKSMKLRTQIPAEMLASIDLKYFNDSTKKKIEKI 201
```

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
UFMG

8.3.4 Seqüenciamento com iniciador BM-NP-1-F: clone 26 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/Kentucky/2/86.

8.3.4.1 Seqüência de nucleotídeos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 26 pJG2000-K/NP

```
K:37   atcaaagtcatggcgtctcaaggcaccaaacgatcttatgagcagatggaaactggtggg 96
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:1    atcaaagtcatggcgtctcaaggcaccaaacgatcttatgagcagatggaaactggtggg 60

K:97   gaacgccagaatgcaactgaaatcagagcatctgtcggaaggatggtgggaggaatcggc 156
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:61   gaacgccagaatgcaactgaaatcagagcatctgtcggaaggatggtgggaggaatcggc 120

K:157  cggttctatgttcagatgtgtactgagcttaaactcaacgaccatgaagggcggctgatt 216
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:121  cggttctatgttcagatgtgtactgagcttaaactcaacgaccatgaagggcggctgatt 180

K:217  cagaacagcataacaatagaaaggatggtactttcggcattcgacgaaagaagaaacaag 276
       |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:181  cagaacagcataactatagaaaggatggtactttcggcattcgacgaaagaagaaacaag 240

K:277  tacctcgaggagcatcccagtgctgggaaagaccccaagaaaacgggaggcccgatatac 336
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:241  tacctcgaggagcatcccagtgctgggaaagaccccaagaaaacgggaggcccgatatac 300

K:337  agaaggaaagatgggaaatggatgagagaactcatcctccatgataaagaagaaatcatg 396
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:301  agaaggaaagatgggaaatggatgagagaactcatcctccatgataaagaagaaatcatg 360

K:397  aggatctggcgtcaggccaacaatggtgaagacgctactgctggtcttactcatatgatg 456
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:361  aggatctggcgtcaggccaacaatggtgaagacgctactgctggtcttactcatatgatg 420

K:457  atctggcactccaatctcaatgacaccacataccaaagaacaagggctcttgttcgggct 516
       |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
C:421  atctggcactccaatctcaatgacaccacataccaaagaacaagggctcttgtacgggct 480

K:517  gggatggatcccagaatgtgctctctgatgcaaggatcaaccctcccacggagatctgga 576
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:481  gggatggatcccagaatgtgctctctgatgcaaggatcaaccctcccacggagatctgga 540
```

```
K:577 gctgccggtgctgcagtaaaaggtgttggaacaatggtaatggaactcatcaggatgatc 636
      ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:541 gctgccggtgctgcagtaaaaggtgtnggaacaatggtaatggaactcatcaggatgatc 600


K:637 aaacgcgggataaatgatcgaaatttctggagaggtgaaaatggtcgaagaaccagaatt 696
        |||||||||| |||||||| ||  |||||||||||||||||||| || ||| ||||
C:601 nnacgcgggatanatgatcganatnnctggagaggtgaaaatggtcganganccaaaatt 660

K:697 gcttatgaaagaatg 711
      |||||||||| ||||
C:661 gcttatgaaanaatg 675
```

8.3.4.2 Seqüência de aminoácidos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 26 pJG2000-K/NP

```
K:1   MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYVQMCTELKLNDHEGRLIQNS 60
      MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYVQMCTELKLNDHEGRLIQNS
C:4   MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYVQMCTELKLNDHEGRLIQNS 63

K:61  ITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRKDGKWMRELILHDKEEIMRIW 120
      ITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRKDGKWMRELILHDKEEIMRIW
C:64  ITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRKDGKWMRELILHDKEEIMRIW 123

K:121 RQANNGEDATAGLTHMMIWHSNLNDTTYQRTRALVRAGMDPRMCSLMQGSTLPRRSXXXX 180
      RQANNGEDATAGLTHMMIWHSNLNDTTYQRTRALVRAGMDPRMCSLMQGSTLPRRS
C:124 RQANNGEDATAGLTHMMIWHSNLNDTTYQRTRALVRAGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAG 183

K:181 XXXXXXXTMVMELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERM 222
             TMVMELIRMI RGI DR  WRGENGR  +IAYE M
C:184 AAVKGXGTMVMELIRMIXRGIXDRXXWRGENGRXXKIAYEXM 225
```

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

8.3.5 Seqüenciamento com iniciador NP-581-F: clone 26 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/Kentucky/2/86.

8.3.5.1 Seqüência de nucleotídeos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 26 pJG2000-K/NP

```
K:619 gaactcatcaggatgatcaaacgcgggataaatgatcgaaatttctggagaggtgaaaat 678
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:1   gaactcatcaggatgatcaaacgcgggataaatgatcgaaatttctggagaggtgaaaat 60

K:679 ggtcgaagaaccagaattgcttatgaaagaatgtgcaatatcctcaaagggaaattccaa 738
      |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
C:61  ggtcgaagaaccagaattgcttatgaaagaatgcgcaatatcctcaaagggaaattccaa 120

K:739 acagcagcacaacgggcaatgatggaccaagtgagggagggccgcaatcctggaaatgct 798
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:121 acagcagcacaacgggcaatgatggaccaagtgagggagggccgcaatcctggaaatgct 180

K:799 gagattgaggatctcattttcttggcacgatcagcactcattttgagaggatcagtagcc 58
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:181 gagattgaggatctcattttcttggcacgatcagcactcattttgagaggatcagtagcc 240

K:859 cataaatcatgcctacctgcctgtgtttatggccttgcagtagccagtgggtatgacttt 918
      |||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:241 catatatcacgcctacctgcctgtgtttatggccttgcagtagccagtgggtatgacttt 300

K:919 gagaaggaaggatactctctggttggaattgatcctttcaaactactccagaacagccaa 978
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |||||||
C:301 gagaaggaaggatactctctggttggaattgatcctttcaaactcctccagagcagccaa 360

K:979attttcagtctaatcagaccgaaagaaaatccagcacacaagagccagttggtgtggatg 1038
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:361attttcagtctaatcagaccgaaagaaaatccagcacacaagagccagttggtgtggatg 420

K:1039gcatgccattctgcagcatttgaggacctgagagttttgaatttcattagaggaaccaaa1098
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:421 gcatgccattctgcagcatttgaggacctgagagttttgaatttcattagaggaaccaaa 480

K:1099gtaatcccaagaggacagttagcaaccagaggagtgcaaattgcttcaaatgaaaacatg1158
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:481 gtaatcccaagaggacagttagcaaccagaggagtgcaaattgcttcaaatgaaaacatg 540
```

```
K:1159gagacaatagattctagcacactcgaactgaggagcagatattgggcaataaggaccagg1218
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:541 gagacaatagattctagcacactcgaactgaggagcagatattgggcaataaggaccagg 600


K:1219agtggagggaacaccagtcaacagagagcatctgcaggacagataagtgtgcaacccact1278
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
C:601 agtggagggaacaccagtcaacagagagcatctgcaggacagataagtgtgcnacccact 660


K:1279ttctcagtgcagagaaatcttcccttgaaagagcaaccattatggctgcattcactggg1338
      |  ||||||||||||||||  |||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||
C:661 tnntcagtgcagagaaatctnnccctttgaaagagcaa-catnatggctgcattcactggg 719


K:1339 aacactgagcggaggac 1355
       | ||||||| |||||||
C:720  ancactgagnggaggac 736
```

8.3.5.2 Seqüência de aminoácidos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 26 pJG2000-K/NP

```
K:192 ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMCNILKGKFQTAAQRAMMDQVREGRNPGNA 251
      ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERM NILKGKFQTAAQRAMMDQVREGRNPGNA
C:  1 ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMRNILKGKFQTAAQRAMMDQVREGRNPGNA 60

K:252 EIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQ 311
      EIEDLIFLARSALILRGSVAH S LPACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQ+SQ
C: 61 EIEDLIFLARSALILRGSVAHISRLPACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQSSQ 120

K:312 IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM 371
      IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM
C:121 IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM 180

K:372 ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERAT 424
      ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISV PT SVQRN  FERAT
C:181 ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISVXPTXSVQRNXXFERAT 233
```

8.3.6 Seqüenciamento com iniciador NP-581-F: clone 32 do pJG2000-K/NP (vírus A/Equine/Kentucky/2/86) e análise comparativa com a seqüência de NP do vírus A/Equine/Equine/Kentucky/2/86.

8.3.6.1 Seqüência de nucleotídeos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 32 pJG2000-K/NP

```
K:618 ggaactcatcaggatgatcaaacgcgggataaatgatcgaaatttctggagaggtgaaaa 677
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:1   ggaactcatcaggatgatcaaacgcgggataaatgatcgaaatttctggagaggtgaaaa 60


K:678 tggtcgaagaaccagaattgcttatgaaagaatgtgcaatatcctcaaaggga aattcca 737
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
C:61  tggtcgaagaaccagaattgcttatgaaagaatgtgcaatatcctcaaaggggaattcca 120


K:738 aacagcagcacaacgggcaatgatggaccaagtgagggagggccgcaatcctggaaatgc 797
      | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:121 agcagcagcacaacgggcaatgatggaccaagtgagggagggccgcaatcctggaaatgc 180


K:798 tgagattgaggatctcattttcttggcacgatcagcactcattttgagaggatcagtagc 857
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:181 tgagattgaggatctcattttcttggcacgatcagcactcattttgagaggatcagtagc 240


K:858 ccataaatcatgcctacctgcctgtgtttatggccttgcagtagccagtgggtatgactt 917
      |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:241 ccataaatcatgccacctgcctgtgtttatggccttgcagtagccagtgggtatgactt 300

K:918 tgagaaggaaggatactctctggttggaattgatcctttcaaactactccagaacagcca 977
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:301 tgagaaggaaggatactctctggttggaattgatcctttcaaactactccagaacagcca 360


K:978aattttcagtctaatcagaccgaaagaaaatccagcacacaagagccagttggtgtggat 1037
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:361aattttcagtctaatcagaccgaaagaaaatccagcacacaagagccagttggtgtggat 420


K:1038ggcatgccattctgcagcatttgaggacctgagagttttgaatttcattagaggaaccaa1097
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:421 ggcatgccattctgcagcatttgaggacctgagagttttgaatttcattagaggaaccaa 480


K:1098agtaatcccaagaggacagttagcaaccagaggagtgcaaattgcttcaaatgaaaacat1157
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:481 agtaatcccaagaggacagttagcaaccagaggagtgcaaattgcttcaaatgaaaacat 540


K:1158ggagacaatagattctagcacactcgaactgaggagcagatattgggcaataaggaccag1217
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
C:541 ggagacaatagattctagcacactcgaactgaggagcagatattgggcaataaggaccag 600
```

```
K:1218gagtggagggaacaccagtcaacagagagcatctgcaggacagataagtgtgcaacccac1277
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||
C:601 gagtggagggaacaccagtcaacagagagcatctgcaggacagataagtgtgcnanccac 660


K:1278tttctcagtgcagagaaatcttccctttgaaagagcaaccattatggctgcattcactgg1337
      |||||||||||||||||||| |||  ||| |||| ||||||| |||||||| | ||||
C:661 tttctcagtgcagagaaatcttncctnngaangagc-accattacggctgcatnc-ctgg 718


K:1338 gaacactgagcggaggact 1356
       | || ||||| ||||||||
C:719  g-acnctgagnggaggact 736
```

8.3.6.2 Seqüência de aminoácidos
K: A/Equine/Kentucky/2/86
C: clone 32 pJG2000-K/NP

```
K:192 ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMCNILKGKFQTAAQRAMMDQVREGRNPGNA 251
      ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMCNILKG+FQ AAQRAMMDQVREGRNPGNA
C:1   ELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMCNILKGEFQAAAQRAMMDQVREGRNPGNA 60

K:252 EIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQ 311
      EIEDLIFLARSALILRGSVAHKSC PACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQ
C:61  EIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCPPACVYGLAVASGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQ 120

K:312 IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM 371
      IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM
C:121 IFSLIRPKENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLNFIRGTKVIPRGQLATRGVQIASNENM 180

K:372 ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATI 425
      ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISV  TFSVQRNL  E A +
C:181 ETIDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQRASAGQISVXXTFSVQRNLXXEXAPL 234
```