

CAMILA CRISTINA ALMEIDA DIAS

**COMPARAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PATOGÊNICOS DO VÍRUS
DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS E
CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

CAMILA CRISTINA ALMEIDA DIAS

**COMPARAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PATOGÊNICOS DO VÍRUS
DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS E
CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 24 de setembro de 2007.

Prof^a. Bernadete Miranda dos Santos
(Co-orientadora)

Prof^a. Juliana Rangel Lopes Fietto

Dr^a. Poliane Ferreira Alfenas

Prof^a. Maria Aparecida S. Moreira

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

Quando o frescor da manhã é substituído pelo cansaço do meio-dia, quando os músculos das pernas tremem sob a tensão, a subida parece não ter fim e, de repente, nada acontece como o desejamos – é então que não devemos hesitar.

Dag Hammarskjöld

Poucos de nós podem fazer grandes coisas, mas todos nós podemos fazer pequenas coisas com muito amor.

Madre Teresa

Dedico aos meus pais José Dias Teixeira e Emília Maria de Almeida Dias pelo amor incondicional, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca ter me deixado desistir frente às dificuldades, por ter feito o impossível para me ensinar a ser perseverante e por ter sempre colocado pessoas maravilhosas durante a minha caminhada para partilhar as conquistas e os momentos difíceis, alegrando sempre a minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Veterinária pela oportunidade, apoio e incentivo sempre presentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Mauro Pires Moraes pela orientação, conselhos, ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade.

À querida Prof^a Márcia Rogéria de Almeida pela disponibilidade em continuar a orientação com a saída do Prof. Mauro, pelas preocupações e ensinamentos desde o período da graduação, pelo incentivo, pela amizade e confiança.

À Prof^a Juliana Fietto pela orientação e disponibilidade em todos os momentos em que precisei; pelos ensinamentos; e por me dar esperança e força quando elas estavam já se esgotando.

À Prof^a Bernadete Miranda dos Santos pela co-orientação, pela amizade, pelos conselhos e pelas amostras gentilmente cedidas.

Ao Prof. Joaquín Patarroyo, pela co-orientação, pela amizade e conselhos valiosos.

À Poliane Alfenas pela amizade, acolhida, ensinamentos e disponibilidade.

À Prof^a Maria Aparecida Scatamburlo, pela amizade e disponibilidade.

À todos os professores do Departamento de Veterinária pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária, em especial ao Marquinhos e ao Luiz Carlos, por todos esses anos de amizade e respeito, pela boa vontade e disponibilidade em todos os momentos. Ao Sr. Valdir pelo convívio sempre prazeroso, pela dedicação ao trabalho e pelo apoio. Ao Marcinho pela amizade e disponibilidade.

Aos colegas dos laboratórios de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) e Genômica pela ajuda e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, pelo carinho, amizade e sensibilidade nos momentos difíceis e de longas jornadas. Em especial, à Fernanda Souza e à Luciana pela amizade e ensinamentos; ao Orlando pela disponibilidade sempre; à Daniela e ao Bernardo pela companhia diária e noturna, pela amizade firme e descontraída; à Elisa e Monique pela ajuda e amizade; ao Abelardo pelos ensinamentos e partilhas. Ao Sávio, por dar continuidade a este trabalho.

À todos os meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado, pelos momentos de alegria, compreensão e descontração.

Aos meus pais por abrirem mão dos seus sonhos para realizarem os meus.

À minha irmã Laíssa pelo carinho, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais adotivos, tio Júnior e tia Simone, por me acolherem com tanto carinho, por sempre estarem presentes em minha vida nos momentos que mais precisei, me apoiando e incentivando. Aos meus priminhos amados Teté, Mael, Aninha e João Pedro, pelo carinho excessivo, pelas brincadeiras e risadas inesquecíveis. Amo vocês!

E a todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e para minha formação.

À vocês, minha eterna gratidão!

BIOGRAFIA

CAMILA CRISTINA ALMEIDA DIAS, filha de José Dias Teixeira e Emília Maria de Almeida Dias, nasceu em 13 de abril de 1983, em Coronel Fabriciano – MG.

Em julho de 2005 graduou-se em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

Em agosto do mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Setembro de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Características da doença infecciosa bursal (IBD).....	3
2.2. Vírus da doença infecciosa bursal (IBDV).....	5
2.3. Variação antigênica e patotípica do IBDV.....	10
2.4. Hibridização subtrativa.....	12
3. OBJETIVOS.....	
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Vírus e células.....	15
4.2. Isolamento de RNA total.....	15
4.3. Oligonucleotídeos.....	16
4.4. Produção do cDNA codificador da proteína viral VP2.....	17
4.5. Amplificação dos cDNAs.....	17
4.6. Clonagem de uma porção da região hipervariável da proteína viral VP2.....	17
4.7. Extração de DNA plasmidial.....	18
4.8. Ensaio de restrição.....	19
4.9. Determinação da seqüência de nucleotídeos.....	19
4.10. Análise filogenética.....	19
4.11. Construção da biblioteca de cDNA.....	20
4.11.1. Vírus e células.....	20
4.11.2. Isolamento de RNA total.....	20
4.11.3. Purificação de RNA mensageiro (mRNA).....	21
4.11.4. Hibridização subtrativa.....	21
4.11.4.1. Síntese de cDNA a partir do mRNA purificado...21	
4.11.4.2. Digestão pela endonuclease de restrição <i>Rsa</i> I.22	
4.11.4.3. Ligaçãõ dos adaptadores.....	23
4.11.4.4. Primeira hibridizaçãõ.....	25
4.11.4.5. Segunda hibridizaçãõ.....	26
4.11.5. Amplificaçãõ por PCR e Nested-PCR.....	26
4.11.6. Clonagem dos produtos amplificados da hibridizaçãõ.....	27
4.11.7. Transformaçãõ químicã.....	28
4.11.8. Triagem de clones por PCR.....	28
4.11.9. Extraçãõ de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	29
4.11.10. Determinaçãõ da seqüência nucleotídica.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Isolamento de IBDV a partir de células VERO.....	31
5.2. Análise filogenética dos isolados.....	31
5.3. Detecçãõ de IBDV em células VERO.....	38

5.4. Identificação de genes diferencialmente expressos durante a infecção pelo IBDV em células VERO.....	39
6. CONCLUSÕES.....	43
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	44
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45
9. APÊNDICE.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp.: ampicilina
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
cDNA: DNA complementar
dscDNA: DNA complementar fita dupla
CO₂: dióxido de carbono
DEPC: dietilpirocarbonato
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxinucleotídeo
D.O.: densidade óptica
DTT: ditioneitol
DVT: Departamento de Veterinária
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
IBD: “infectious bursal disease” doença infecciosa bursal
IBDV: “infectious bursal disease virus” vírus da doença infecciosa bursal
IPNV: “infectious pancreatic necrosis virus” vírus da necrose pancreática infecciosa
kDa: kilodalton
LVMA: Laboratório de Virologia Molecular Animal
MAPK: “mitogen-activated protein kinase”
MEM: meio essencial mínimo
M: molar
MgCl₂: cloreto de magnésio
NF-κB: “nuclear factor kappa B”
nm: nanômetros
NO: óxido nítrico
RNA: ácido ribonucléico
mRNA: RNA mensageiro
ssRNA: RNA fita simples
dsRNA: RNA fita dupla
OIE: Organização Internacional de Epizootias
ORF: “Open Reading Frames” seqüências abertas de leitura
pb: pares de base
PCR: “polymerase chain reaction” reação em cadeia da polimerase
pVP2: precursor da proteína VP2
q.s.p.: quantidade suficiente para
RT-PCR: “reverse transcriptase polymerase chain reaction”
s: segundos
SFB: soro fetal bovino
SPF: livre de patógenos específicos.
U: unidade
UESA: Unidade de Estudo em Sanidade Avícola.
UFV: Universidade Federal de Viçosa
VERO: células de rim de macaco verde da África
vvIBDV: IBDV altamente virulento
xg: rcf “relative centrifugal force” unidade de força centrífuga relativa
°C: graus Celsius
pmol: pico mol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do genoma do IBDV e sua estratégia de transcrição (Murphy <i>et al.</i> , 1999, com modificações).....	09
Figura 2. Figura esquemática do ciclo replicativo do IBDV.....	09
Figura 3. Esquema representativo da preparação dos cDNAs <i>tester</i> ligados aos adaptadores (Adaptado do manual do kit BD PCR-Select™ cDNA Subtraction kit/CLONTECH).....	24
Figura 4. Padrão eletroforético dos produtos amplificados pela RT-PCR dos isolados de IBDV.....	31
Figura 5. Dendograma mostrando a localização filogenética dos isolados de IBDV (LVMA0504 e LVMA0604) obtidas a partir do alinhamento de 211 nucleotídeos (842 a 1053) do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo viral.....	33
Figura 6. Alinhamento e comparação das seqüências de aminoácidos (238 a 306) deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos da região hipervariável da proteína VP2 de isolados de IBDV do sorotipo 1.....	34
Figura 7. Fotomicrografia de cultivo de células VERO. A - Células normais. B - Arredondamento e destruição da monocamada celular. Aumento de 100 x...39	
Figura 8. Análise da extração de RNA total e purificação do mRNA por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2 %.....	39
Figura 9. Análise da digestão pela <i>Rsa</i> I por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo.....	40
Figura 10. Análise dos produtos amplificados pelas reações de Nested-PCR por eletroforese em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídeo.....	41
Figura 11. Análise dos produtos amplificados pelas reações de Nested-PCR por eletroforese em gel de acrilamida 6 % corado pela prata.....	41
Figura 12. Análise da reação de PCR, feita a partir de colônias contendo produtos da hibridização subtrativa, por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reação de ligação dos adaptadores. (Apêndice 9.1.).....	52
Tabela 2. Análise da ligação dos adaptadores. (Apêndice 9.2.).....	52
Tabela 3. Reagentes utilizados no processamento da primeira hibridização. (Apêndice 9.3.).....	52
Tabela 4. Avaliação da presença de sítios para enzimas de restrição nas seqüências de nucleotídeos analisadas dos isolados de IBDV LVMA0504 e LVMA0604.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Identificação dos isolados utilizados na análise filogenética.....	32
--	----

RESUMO

DIAS, Camila Cristina Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Comparação molecular de isolados patogênicos do vírus da doença infecciosa bursal do estado de Minas Gerais e construção de uma biblioteca subtrativa.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Bernadete Miranda dos Santos.

A doença infecciosa bursal (IBD) tem sido, há muitos anos, uma grande preocupação para a indústria avícola, especialmente na década passada devido a emergência de cepas virais hipervirulentas. Mutações no gene responsável pela codificação da proteína viral VP2 de linhagens patogênicas e a má utilização de vacinas atenuadas por poucas passagens têm sido responsáveis pelo aparecimento de novos surtos. A proposta deste trabalho foi analisar filogeneticamente dois diferentes isolados de IBDV de Minas Gerais por meio da comparação da seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína do capsídeo viral VP2. Em razão da necessidade de se estudar melhor a interação patógeno-hospedeiro, objetivou-se ainda a construção de uma biblioteca subtrativa a partir de células VERO infectadas pelo IBDV, 8 horas após a infecção, com a finalidade de identificar genes diferencialmente expressos durante essa interação vírus-célula hospedeira. Para a análise filogenética dos isolados, fragmentos de 251 pb amplificados por RT-PCR foram clonados e seqüenciados. A comparação das seqüências revelou que os isolados possuem identidade de 98-100% com linhagens clássicas vacinais de IBDV, indicando que os surtos analisados podem ter sido causados pelo vírus vacinal. Para a construção da biblioteca subtrativa, duas populações de cDNA foram hibridizadas: uma derivada de células VERO infectadas por IBDV e a outra de células VERO não infectadas. Os produtos hibridizados foram amplificados para posterior clonagem e avaliação dos produtos diferencialmente expressos. O conhecimento das características replicativas do IBDV associado ao estudo das conseqüências da infecção pelo vírus na expressão gênica da célula hospedeira, iniciado neste trabalho, permitirá a elucidação dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, contribuindo assim para o desenvolvimento de métodos mais eficazes no controle e prevenção da IBD.

ABSTRACT

DIAS, Camila Cristina Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2007. **Molecular comparison of pathogenic isolates of the infectious bursal disease virus in Minas Gerais State and construction of a subtractive library.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Advisers: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Bernadete Miranda dos Santos.

Infectious bursal disease (IBD) has been the major preoccupation for the poultry industry, especially in the past decade with the emergency of high virulent strains. Mutations in the gene that code the VP2 viral protein of pathogenic strains and the amiss use of attenuate vaccines by few passages have been responsible for the springing of new outbreaks. The purpose of this work was to analyze phylogenetically two different isolates of IBDV in Minas Gerais State by the comparison of the nucleotide sequence of the gene that code VP2 viral capsid protein. In order to study the pathogen-host interaction, a subtractive library was constructed from VERO cells infected by IBDV (8 hours post-infection) aiming the identification of differential gene expression during this interaction. For the phylogenic analysis of the isolates, fragments of 251 bp amplified by RT-PCR were cloned and sequenced. The comparison of the sequences revealed that these isolates have 98-100% identity with classical vaccinal IBDV strains indicating that these outbreaks might have been caused by the vaccinal virus. To construct the subtractive library, two cDNA populations were hibridizated: one derived by IBDV infected VERO cells and other by non infected VERO cells. The hibridizated products were amplified for the posterior cloning and evaluation of the differential express products. Understanding of the replication characteristics of the IBDV associated to the study of the virus infection effects in the gene expression of the host cell, shown in this work, will allow the elucidation of the mechanisms involved in the pathogen-host interaction contributing, therefore, for the development of methods more effectives in the control and prevention of the IBDV.

1. INTRODUÇÃO

A doença infecciosa bursal (*Infectious Bursal Disease* – IBD) tem sido, já há alguns anos, uma constante preocupação para a avicultura industrial, principalmente pela criação de plantéis com maior densidade e em sistema de confinamento observada atualmente, o que confere condições epidemiológicas para o surgimento de problemas sanitários. A IBD, considerada endêmica nos países de avicultura tecnificada, é responsável por perdas econômicas significativas em aves jovens devido ao aumento da mortalidade e da imunodepressão das aves acometidas.

A IBD tem causado problemas para a indústria avícola em todo o mundo, sendo que estes se concentraram a partir da década de 90. Esse aumento no número de casos foi devido ao aparecimento de formas variantes de alta virulência que têm causado elevadas perdas econômicas. Até 1987, as cepas dos vírus apresentavam baixa virulência causando menos de 2% de mortalidade específica e eram satisfatoriamente controladas por vacinação. No entanto, a partir dessa época, falhas na vacinação foram descritas em diferentes partes do mundo. Assim, devido a essas novas características do vírus e da doença faz-se necessário uma melhor caracterização das cepas circulantes para que um programa adequado de vacinação seja estabelecido (van den Berg, 2000).

O vírus da IBD encontra-se presente em 95% dos países membros da Organização Internacional de Epizootias (OIE) onde a ocorrência de falhas nas estratégias de prevenção e controle tem estimulado o estudo dos mecanismos de patogênese e da estrutura viral (Mickael & Jackwood, 2005).

A diversidade de isolados de IBDV com características diferentes tem dificultado o controle e a prevenção da IBD, uma vez que cepas utilizadas em vacinas comerciais podem não conferir proteção adequada contra outras cepas circulantes. A análise das propriedades genômicas comuns a vários isolados de IBD tem contribuído para uma melhor caracterização dos surtos causados pelo vírus, além de auxiliar na elaboração de melhores métodos de controle e prevenção dessa doença.

Além da identificação e conhecimento da seqüência completa e função dos genes de um organismo, muita atenção tem sido dada à interação

hospedeiro-patógeno. O conhecimento do padrão de expressão gênica apresentado nas células em situações específicas, tais como a infecção por um vírus, nos permite criar situações *in vitro* que levam ao aumento do entendimento da patogenia do agente viral e sua interação com o hospedeiro.

Neste trabalho, dois diferentes isolados de IBDV foram analisados filogeneticamente para melhor estudar dois surtos ocorridos na região central do estado de Minas Gerais no ano de 2004. Além disso, uma biblioteca subtrativa foi produzida a partir de células VERO infectadas pelo IBDV, 8 horas após inoculação. A elucidação dos genes diferencialmente expressos durante a infecção viral, juntamente com o conhecimento do ciclo replicativo do IBDV, permitirá um melhor entendimento dos mecanismos utilizados pelo vírus na célula hospedeira para produzir suas proteínas, replicar e infectar uma nova célula hospedeira, bem como dos mecanismos que a célula dispõe para minimizar os danos causados pela infecção viral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características da doença infecciosa bursal (IBD)

Doenças virais imunodepressivas têm um importante impacto econômico devido às perdas diretas e indiretas. As perdas diretas estão relacionadas com a mortalidade, que é dependente da virulência e da dose de infecção, bem como da idade das aves, dos fatores genéticos e do estado imunológico das aves. Já as perdas indiretas, devido à imunodepressão causada pela doença, constituem retardo no crescimento e condenação de carcaça ao abate, além dos gastos com antibióticos para tratar as infecções secundárias. Assim, o impacto econômico da IBD é influenciado pela virulência da cepa viral, pela susceptibilidade das aves, pela concomitância de patógenos primários e secundários, além de fatores ambientais e de manejo (Müller *et al.*, 2003).

A IBD foi primeiramente descrita em 1962, por Cosgrove, na cidade de Gumboro, estado de Delaware, Estados Unidos, onde ocorreu o primeiro surto da doença em 1957. Até 1987, os isolados de IBDV eram de baixa virulência causando uma mortalidade específica menor que 2% e a doença era facilmente controlada pela vacinação. Em 1986 e 1987, falhas vacinais foram relatadas em várias partes do mundo, onde novos isolados foram posteriormente detectados (Jackwood & Saif, 1987; Snyder *et al.*, 1992). Os primeiros casos da doença aguda foram relatados na Europa por van den Berg e colaboradores, em 1991. Surpreendentemente, esses surtos ocorreram em frangos de corte no final do período de produção em granjas com adequadas condições higiênicas e profiláticas (van den Berg, 2000). Desde então, a emergência de formas variantes de IBDV antigênicos e hipervirulentos em várias partes do mundo têm causado perdas econômicas significantes.

No Brasil até meados da década de 90, a doença era predominantemente sub-clínica sendo observada hipotrofia da bursa e problemas secundários decorrentes da imunodepressão, sendo que as vacinas comerciais de mercado conferiam proteção satisfatória (Leffer, 2004). Di Fabio *et al.* (1999) relataram surtos de IBD com amostras variantes no estado de Minas Gerais consideradas de alta patogenicidade. A partir de 1997, a forma altamente virulenta da IBD (vvIBDV) foi diagnosticada no Brasil acometendo aves de postura e de corte e foi classificada dentro do grupo molecular G11

(Ikuta *et al.*, 2001). Banda & Villegas (2004) caracterizaram geneticamente isolados brasileiros da variante vvIBDV e encontraram maior similaridade com isolados europeus do que com isolados americanos, sugerindo que a origem da variante brasileira seja européia.

Essa doença é caracterizada por ser altamente contagiosa em aves jovens, seu agente etiológico é o *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV). O IBDV é membro da família *Birnaviridae* e é classificado em dois sorotipos. A maior parte dos isolados a partir de galinhas pertence ao sorotipo 1, enquanto que os isolados em perus normalmente pertencem ao sorotipo 2. Os dois sorotipos podem infectar galinhas e perus, mas a doença clínica é reconhecida somente em galinhas (Müller *et al.*, 2003).

Os isolados pertencentes ao sorotipo 1 têm tropismo por pré-linfócitos B em divisão na bursa, causando depleção dos linfócitos por meio da indução da apoptose, imunodeprimindo as aves acometidas. A severidade da doença está relacionada com a quantidade de células suscetíveis presentes na bursa e, por isso, a idade de maior suscetibilidade é entre a 3^a e a 6^a semana, quando esse órgão está em pleno desenvolvimento. A rápida multiplicação do vírus nos pré-linfócitos B causa uma destruição dessas células e a subsequente disseminação do vírus causa a doença clínica, geralmente culminando em morte (van den Berg, 2000). Os monócitos e macrófagos podem ser persistentemente infectados e desempenham um importante papel na disseminação do vírus (van den Berg *et al.*, 1994).

A causa exata da doença clínica e, conseqüente morte, não é ainda bem esclarecida, mas não parece estar relacionada somente com a severidade das lesões (van den Berg *et al.*, 2000). Os sinais clínicos da doença aguda constituem-se por prostração, anorexia, desidratação, diarreia branca e morte. Já a doença sub-clínica, que é a forma mais importante da doença, manifesta-se com baixa mortalidade e severa imunodepressão. Os achados de necrópsia da fase aguda revelam hemorragias nos músculos esqueléticos, principalmente coxa e perna, e na mucosa do proventrículo; rins pálidos, aumentados de volume e com presença de uratos; timo diminuído de volume; bursa aumentada de volume, devido a presença de hiperemia, edema, exsudação e infiltração inflamatórias, podendo haver hemorragia (Nagarajan & Kibenge, 1997, van den Berg, 2000). Na doença sub-clínica, observa-se severa depleção linfóide não

somente na bursa como também nos outros órgãos linfóides (van den Berg, 2000).

A ave infectada elimina o vírus para o ambiente por meio das fezes, sendo a transmissão tida somente como horizontal, ocorrendo a contaminação pelas vias aéreas, digestiva e ocular (Santos *et al.*, 2005). A infecção de aves jovens pelo IBDV leva a destruição dos linfócitos B bursa dependentes, resultando em imunodepressão, aumentando a incidência de falhas vacinais e infecções secundárias. A IBD tem um pequeno período de incubação e alta morbidade. Já a mortalidade varia e depende do estado de imunidade das aves e do ambiente em que são criadas. A contaminação ambiental é um dos pontos mais importantes a ser evitado, pois, uma vez infectado com IBDV, a descontaminação é muito difícil (Winterfield *et al.*, 1972).

Devido à alta resistência do IBDV às condições ambientais e sua distribuição global, métodos de biossegurança associados com a vacinação são essenciais para o controle e a prevenção da IBD, que têm sido um dos grandes desafios da avicultura mundial.

2.2. Vírus da doença infecciosa bursal (IBDV)

O IBDV possui um capsídeo icosaédrico não envelopado de 60 nm de diâmetro constituído por 32 capsômeros. A caracterização do genoma viral consiste em uma fita dupla de RNA bi-segmentada (Müller *et al.*, 1979; Kibenge *et al.*, 1988), permitindo sua classificação dentro de uma nova família de vírus, a *Birnaviridae*, sendo o protótipo do gênero *Avibirnavirus* (Leong *et al.*, 2000). Os birnavírus não infectam mamíferos e a família é constituída por 3 gêneros: *Aquabirnavirus*, onde está classificado o *Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV) que acomete salmonídeos e trutas e é considerado o protótipo da família; *Avibirnavirus*, constituído apenas pelo IBDV que infecta somente galinhas e *Entombirnavirus*, incluindo o *Drosophila X virus* que infecta *Drosophila melanogaster* (Dobos *et al.*, 1995a).

Os birnavirus replicam no citoplasma sem deprimir fortemente os processos celulares de transcrição e tradução, sendo o mRNA viral transcrito por uma RNA polimerase dependente de RNA associada ao virion (Murphy *et al.*, 1999).

A família *Birnaviridae* possui virions não envelopados com morfologia hexagonal, 60 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. O genoma consiste de duas moléculas de RNA fita dupla que são chamadas de A e B.

O segmento A, de 3.261 pb, possui duas seqüências abertas de leitura (“Open Reading Frames – ORF”). A maior ORF codifica uma poliproteína, de 110 kDa, que é processada nas proteínas estruturais VP2 (40-45 kDa) e VP3 (32-34 kDa), formadoras do capsídeo externo e interno, respectivamente, e a VP4 (28-30,5 kDa), que é uma protease viral envolvida no processamento da poliproteína (Azad *et al.*, 1987). A segunda ORF codifica uma proteína não estrutural, VP5, de 17 kDa (Dobos *et al.*, 1995b). O segmento B de 2.827 pb codifica a proteína VP1 de 97 kDa, que possui atividade de polimerase e atua como a RNA polimerase dependente de RNA, sendo responsável pela replicação e transcrição do genoma do vírus (Macreadie & Azad, 1993). A VP1 encontra-se presente em pequenas quantidades no virion como proteína livre e como proteína associada ao genoma. De acordo com van den Berg *et al.* (2000) esta proteína desempenha um importante papel na encapsidação da partícula viral.

A VP2 é codificada por uma região de seqüência variável do genoma e possui epitopos conformação-dependente responsáveis pelo reconhecimento dos anticorpos neutralizantes (Bayliss *et al.*, 1990). Mutações nesta região podem ser responsáveis pela emergência de novas variantes de IBDV (van den Berg, 2000) e pelas diferenças na antigenicidade e atenuação viral (Mickael & Jackwood, 2005). Mutações nas proteínas virais VP1 e VP4, bem como nos sítios antigênicos da VP2 e VP3 e próximas ao sítio de clivagem VP2-VP4 afetam a atividade dessas proteínas e, assim, alteram a taxa de replicação viral e, possivelmente, a virulência (Brown & Skinner, 1996).

A maturação do vírus ocorre durante a montagem da partícula viral e é um processo autocatalítico, que na maioria das vezes é carregado pela VP4. O processamento final da VP2 é dependente da presença da VP3 que por sua vez interage com a VP1 e com o dsRNA viral durante a encapsidação (Chevalier *et al.*, 2002). A VP3 desempenha diversos papéis durante o ciclo viral sendo requerida no controle da maturação, ao interagir com o genoma do vírus e estabilizando o dsRNA genômico dentro da partícula viral (Tacken *et al.*, 2002; Tacken *et al.*, 2003).

Estudos recentes (Deng *et al.*, 2007) identificaram dois epitopos da VP3 que apresentaram boa imunogenicidade e foram capazes de induzir a produção de anticorpos contra IBDV em camundongos da linhagem BALB/c, embora mais estudos sejam necessários para melhor compreender essas características da VP3.

A proteína VP5 é uma proteína não estrutural, altamente básica e rica em cisteína, que se encontra conservada em todas as cepas patogênicas de IBDV. A VP5 é expressa em células infectadas com IBDV, mas não é carregada pelo virion e nem requerida na replicação viral, tendo função regulatória (Mundt *et al.*, 1995). Yao *et al.* (1998) demonstraram um efeito citotóxico da proteína VP5 e Lombardo *et al.* (2000) mostraram que essa proteína ainda estaria relacionada com o espalhamento da progênie viral para as células vizinhas nos estágios finais da infecção. Acredita-se que a VP5 forma canais ou poros na membrana plasmática (Tacken *et al.*, 2003), uma vez que membranas plasmáticas de células que expressavam VP5 foram permeáveis não somente a pequenas moléculas, mas também a moléculas maiores (Lombardo *et al.*, 2000).

O IBDV possui uma estrutura genômica simples (Figura 1) que é essencial para a compreensão do seu ciclo replicativo (Figura 2). A infecção viral se inicia com a adsorção do vírus, etapa em que o vírus se liga aos receptores celulares presentes na membrana plasmática. Após o reconhecimento, o vírus penetra na célula hospedeira por endocitose, passa por um processo de desnudamento e logo dá início à síntese de RNA viral. Esta ocorre por um mecanismo de remoção da fita semiconservativa, onde a VP1 serve como “primer” e polimerase para a elongação em cadeia da fita (Nagarajan & Kibenge, 1997). A regulação da expressão gênica viral é essencial na formação do produto precursor que origina as proteínas VP2, VP3 e VP4. Além disso, seqüências específicas distribuídas ao longo do genoma têm sido identificadas e acredita-se que tenham um papel crucial na sinalização do ciclo viral pela constituição de estruturas primárias (promotores, sítios de ligação) ou secundárias (alças). Dentre elas, destaca-se a seqüência não codificadora de 32 nucleotídeos de cada extremidade 5', as repetições de nucleotídeos na seqüência terminal e as seqüências palindrômicas (Mundt & Muller, 1995, Kibenge *et al.*, 1996, Nagarajan & Kibenge, 1997). As alças

formadas na região 3' protegem o genoma viral contra o ataque de exonucleases e, ainda, pode ter uma função de iniciação da síntese da fita negativa (Boot *et al.*, 1999).

Várias estruturas e seqüências são essenciais para a viabilidade do IBDV, enquanto outras são específicas para cepas e tipos, incluindo sorotipos e patotipos. Cada modificação na composição genética dessas proteínas estruturais e regulatórias e, ou, na seqüência poderia influenciar no ciclo viral, na especificidade ao hospedeiro e na virulência da cepa. Para a compreensão das bases moleculares da virulência é necessário um melhor conhecimento do ciclo de vida natural do IBDV (van den Berg, 2000). Dessa forma, a observação de genes mais ou menos expressos pode permitir uma maior compreensão tanto do mecanismo de replicação viral, quanto da interação hospedeiro patógeno.

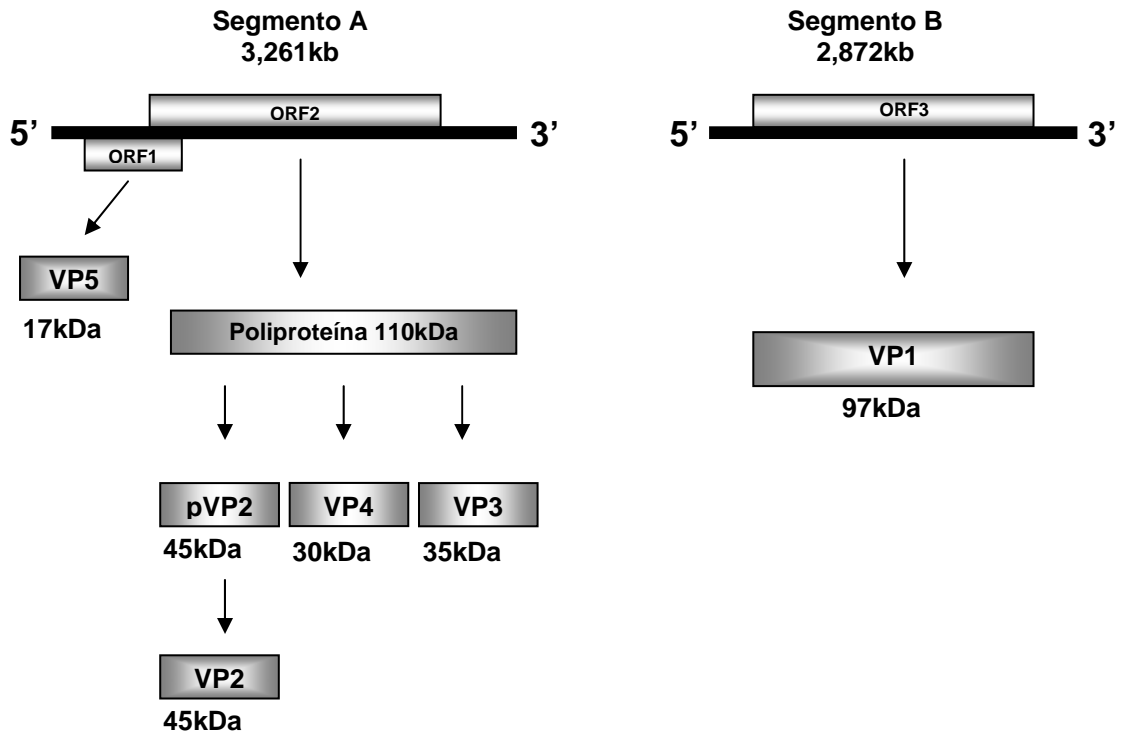


Figura 1. Representação esquemática do genoma do IBDV e sua estratégia de transcrição (Murphy *et al.*, 1999 com modificações).

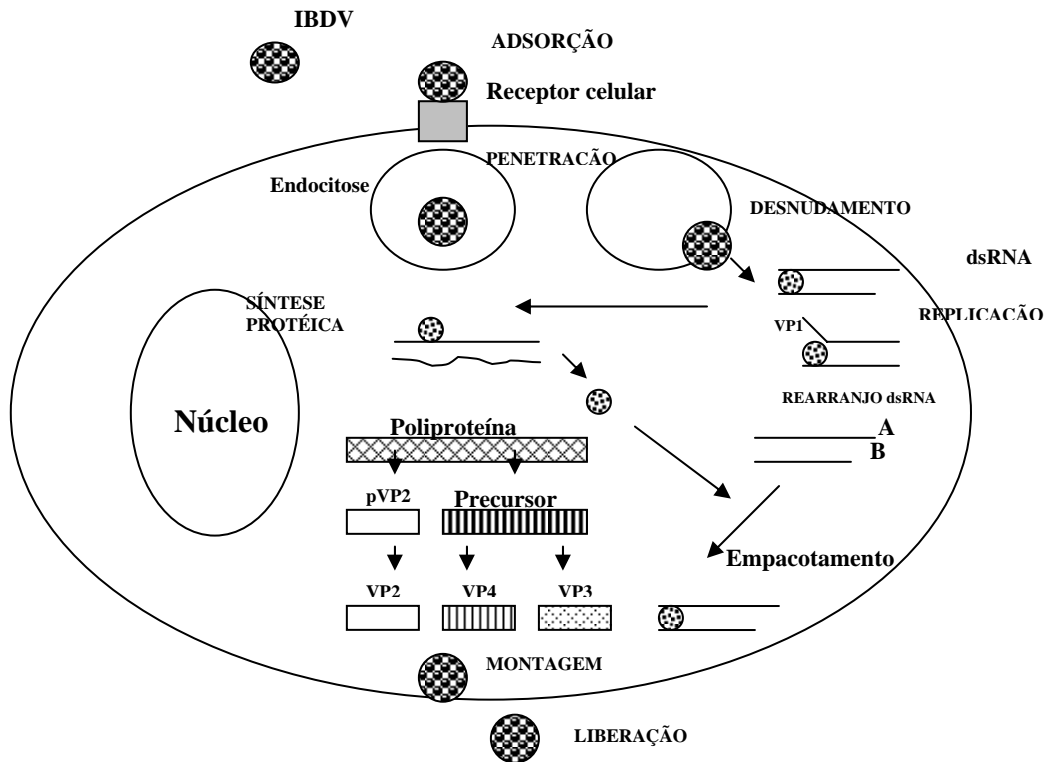


Figura 2. Figura esquemática do ciclo replicativo do IBDV.

2.3. Variação antigênica e patotípica do IBDV

Os vírus com genoma RNA segmentado, como o IBDV, possuem uma grande diversidade genética devido à alta taxa de mutação da RNA polimerase e da possível ocorrência de rearranjos entre os segmentos genômicos. Essas modificações podem gerar tanto variações antigênicas quanto patogênicas, uma vez que podem alterar a virulência dos vírus (van den Berg, 2000).

Dois sorotipos são descritos para o IBDV: 1 e 2. O sorotipo envolvido nos quadros patológicos em avicultura é o sorotipo 1, que é classificado em amostras clássicas, variantes e altamente virulentas. Dentro das amostras clássicas encontram-se a grande maioria das amostras vacinais utilizadas em avicultura (Saif, 1999). Os IBDVs pertencentes ao sorotipo 1 são divididos em seis subtipos antigênicos por meio de ensaios de soroneutralização (Jackwood & Saif, 1987).

Essa variação antigênica pode causar falha nos programas de vacinação, principalmente quando a estrutura antigênica da cepa de campo é muito distinta da cepa vacinal (van den Berg, 2000). No Brasil, diferentes padrões do vírus têm sido identificados em várias regiões do país por meio de ensaios de enzima de restrição com sítios na região hipervariável da VP2, permitindo a diferenciação das cepas variantes antigênicas, clássicas e altamente virulentas (Ikuta *et al.*, 2001).

Os determinantes moleculares que distinguem os isolados altamente virulentos (vvIBDV) dos isolados da forma clássica de IBDV não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que a presença de resíduos de aminoácidos específicos (Alanina na posição 222, Isoleucina nas posições 256 e 294 e Serina na posição 299) dentro do domínio hipervariável da VP2 é característico de fenótipo hipervirulento (van den Berg *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 2004). Não há nenhum anticorpo específico que reconheça exclusivamente os isolados de vvIBDV, tornando difícil o diagnóstico direto. Maior atenção tem sido dada à comparação de seqüências da região hipervariável da proteína VP2 de diferentes isolados (Boot *et al.*, 2000). Mutações nesta região têm alterado as características de antigenicidade e de tropismo viral (Jackwood & Sommer-Wagner, 2007). Os aminoácidos situados nas posições 253 e 284 da VP2 que determinam a entrada do vírus na célula

hospedeira (Liu & Vakharia, 2004), portanto qualquer alteração desses aminoácidos pode mudar drasticamente tais características e dificultar ainda mais o controle das linhagens altamente virulentas (Jackwood & Sommer-Wagner, 2007).

Ikuta *et al.* (2001) relataram a existência de novas variantes do IBDV no Brasil distintos das amostras vacinais. Na opinião desses autores, esse fato pode ser uma das explicações para a eventual ineficiência dos programas de vacinação. Eles salientaram que o fato já foi descrito com o isolamento de amostras variantes nos EUA e isolados patogênicos no Japão e, sugerem, a partir da análise de seqüências do gene que codifica a VP2, que os vvIBDV de diferentes países da Europa, Rússia e Israel são também muito relacionados com os isolados brasileiros de vvIBDV.

Liu *et al.* (2001) confirmaram que a sequência nucleotídica da região hipervariável da proteína VP2 de cepas vvIBDV que causaram, ao mesmo tempo, surtos na Europa, África e Ásia pertencem ao mesmo grupo e são similares antigenicamente e geneticamente entre si.

Em um estudo realizado no Laboratório de Virologia Molecular Animal/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, foi avaliada a diferença de patogenicidade de isolados de IBDV no estado de Minas Gerais. Neste estudo verificou-se que não houve grande diferença das lesões causadas pelos isolados de campo quando comparadas com as lesões causadas por algumas das amostras vacinais. Esse resultado sugere que as amostras vacinais podem causar lesões características da doença e que o uso de determinada cepa mais ou menos invasiva deve ser avaliada com cuidado pelo profissional de campo (Barrios, 2005). Um dos isolados, no entanto, demonstrou maiores padrões de patogenicidade do que os outros isolados avaliados.

Diferentes métodos são utilizados para caracterizar e comparar IBDV encontrado no campo. A maioria desses métodos inclui neutralização cruzada, análise molecular que avalia seqüências do genoma que são similares ou diferentes, anticorpos monoclonais (Stewart-Brown, 1997) e ensaios moleculares que utilizam enzimas de restrição que resultam em padrões de restrição (RFLP) (Ikuta *et al.*, 2001). A avaliação da seqüência de nucleotídeos da região hipervariável da proteína VP2 do IBDV permite caracterizar diferentes isolados do estado de Minas Gerais, quanto a sua patogenicidade, tomando

como base os dados de seqüências anteriores. Essa análise é necessária para a melhor compreensão das causas que levaram a ocorrência de surto. Nesse sentido, será possível relacionar esses isolados circulantes no estado de Minas Gerais com os IBDV encontrados em diferentes países. A análise da seqüência de nucleotídeos desses isolados servirá, ainda, como base para a adequação dos programas de vacinação que vêm sendo adotados na região.

2.4. Hibridização subtrativa

De um modo geral, a infecção do hospedeiro por um patógeno viral é um marco das mudanças que acontecem no microambiente da célula hospedeira. Essas mudanças ocorrem quando a célula hospedeira tenta conter a infecção viral, retardando ou impedindo sua propagação, ou também quando um vírus facilmente consegue se replicar e infectar outras células. Para compreender a regulação molecular desses processos, genes de interesse diferencialmente expressos podem ser clonados e identificados, tornando-se bons alvos para estudos detalhados de sua função e participação no processo de infecção (Diatchenko *et al.*, 1996).

A hibridização subtrativa tem sido um eficiente método para identificar e isolar genes diferencialmente expressos durante a infecção viral (Kiss *et al.*; 2003, Munir *et al.*, 2004). Esse método é capaz de identificar genes que estão presentes em uma população, mas não em outra, e permite a identificação de genes celulares a partir da comparação de duas populações de cDNA (Kiss *et al.*, 2003). A hibridização subtrativa tem a vantagem de não somente identificar genes de interesse, conhecidos, mas todos os genes expressos de forma diferenciada (Chen *et al.*, 2005).

A investigação global da mudança na expressão gênica em sistemas biológicos pode ser realizada com uma variedade de métodos que promovem a identificação de transcritos diferencialmente expressos entre duas populações de mRNA. Definindo a regulação transcricional dos genes do hospedeiro durante a infecção viral é possível obter um entendimento elaborado dos mecanismos de interação vírus-hospedeiro que pode ajudar a definir as bases moleculares da patogênese da doença (Munir *et al.*, 2004).

A expressão regulada dos genes virais é essencial na multiplicação do IBDV. Em células infectadas pelo IBDV, 5 proteínas virais maduras (VP1, VP2,

VP3, VP4 e VP5) são sintetizadas. A relação de um produto precursor (poliproteína) tem sido demonstrada na biossíntese da VP2, VP3 e VP4. Nesse processo, a poliproteína passa por duas etapas de clivagem. O produto da primeira clivagem é um precursor da VP2 (pVP2) que sofre modificação pós-traducional durante a montagem e maturação do vírus. O processamento da pVP2 em VP2, durante a maturação do vírus, é provavelmente resultante de uma clivagem sítio-específica da pVP2 por uma protease codificada pela célula do hospedeiro (Kibenge *et al.*, 1997). O outro produto da primeira clivagem passa por uma nova clivagem e origina a VP3 e a VP4 (Nagarajan & Kibenge, 1997). A VP1, além de ser a polimerase viral, é uma proteína associada ao dsRNA genômico. Durante a replicação do genoma viral, a VP1 serve como *primer* para dar início ao processo de síntese do ssRNA e, além disso, vai estendendo a cadeia de RNA. Dobos (1995b) sugeriu que somente uma unidade da VP1 é capaz de desempenhar as duas funções, não sendo necessárias duas moléculas de VP1 para realizar funções diferentes.

Para compreender as vias de sinalização envolvidas na indução de citocinas e produção de óxido nítrico (NO) pelo IBDV, Khatri & Sharma (2006) examinaram a ativação da MAPK p38 e NF- κ B em macrófagos de galinha e observaram que essas vias regulam a produção de citocina e NO pelo IBDV. O conhecimento da ativação de mecanismos, bem como da inibição de outros, decorrente da infecção pelo IBDV é de extrema importância e serve como base para a elaboração de métodos eficazes de prevenção e controle da doença.

A construção de uma biblioteca subtrativa a partir de células VERO infectadas pelo IBDV nos permitirá detectar genes que são diferencialmente expressos durante a infecção viral e, que, juntamente com o conhecimento de suas funções, tornará possível o entendimento dos mecanismos usados pelo IBDV para produzir suas proteínas virais e originar uma nova progênie, bem como, conhecer mecanismos de controle da célula frente à infecção viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comparar e estudar as características moleculares de isolados de IBDV do estado de Minas Gerais.

3.2. Objetivos específicos

Analisar filogeneticamente diferentes isolados de IBDV por meio da comparação das seqüências nucleotídicas da região hipervariável do gene que codifica a VP2 e, ainda, construir uma biblioteca subtrativa a partir de células VERO infectadas pelo IBDV, 8 horas pós-inoculação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Virologia Molecular Animal situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Virologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária (DVT), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG. Com o intuito de caracterizar molecularmente dois diferentes isolados de IBDV, ensaios de RT-PCR foram conduzidos e as seqüências nucleotídicas que codificam a proteína do capsídeo viral VP2 foram comparadas com a de outros isolados de IBDV e analisadas filogeneticamente. A construção de uma biblioteca subtrativa foi processada com a finalidade de identificar, posteriormente, genes diferencialmente expressos durante a infecção viral.

4.1. Vírus e células

Foram utilizados dois isolados virais extraídos de amostras de bursa, obtidas de aves (*Gallus gallus domesticus*) necropsiadas, de diferentes granjas do estado de Minas Gerais, que foram encaminhadas para a Unidade de Estudo em Sanidade Avícola do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UESA-DVT-UFV), com suspeita clínica de IBD. Os vírus isolados a partir da bursa foram amplificados em células de rim de macaco verde da África (VERO). As células VERO foram cultivadas em garrafas de 75 cm², crescidas em meio essencial mínimo (MEM) (CULTILAB) contendo 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina/SIGMA-ALDRICH) e antimicótico (fungizona/SIGMA-ALDRICH) e suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB-CULTILAB). Quando o tapete celular tornou-se semi-confluyente, os diferentes isolados virais foram inoculados e após 1 hora de adsorção foram adicionados 8 mL de MEM suplementado com 5 % de SFB e as garrafas colocadas em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

4.2. Isolamento de RNA total

Para o isolamento do RNA total, os vírus foram amplificados em células VERO até observação de efeito citopático (ECP). A monocamada de células foi tripsinizada e as células foram transferidas para tubos de 1,5 mL, para posterior

centrifugação durante 3 minutos a 1.600 xg. As células precipitadas foram ressuspensas em 200 µL de água livre de RNase tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC). A essa suspensão, foram adicionados 750 µL de TRIzol (INVITROGEN) e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Um volume de 200 µL de clorofórmio (SIGMA-ALDRICH) foi adicionado e a amostra foi agitada vigorosamente durante 15 segundos e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1.400 xg por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico (SIGMA-ALDRICH) e a amostra foi incubada à -20 °C por 16 horas e centrifugada a 1.400 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%, agitado, centrifugado a 1.400 xg por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante removido novamente. O precipitado de RNA foi seco por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água DEPC. O RNA foi dissolvido durante incubação a 60 °C por 10 minutos e, em seguida, resfriado no gelo.

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria e a qualidade do RNA foi avaliada em eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2 % para, logo após, iniciar a síntese do cDNA.

4.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para a síntese e amplificação do cDNA amplificam uma região altamente variável, de 251 pb, localizada entre os nucleotídeos 805 e 1056 do gene que codifica a proteína do capsídeo viral VP2. Esses oligonucleotídeos foram construídos a partir da seqüência nucleotídica da região hipervariável da VP2 descrita por Bayliss *et al.* (1990), à saber:

Senso (VP2 F): 5'GTA ACA ATC ACA CTG TTC TCA G 3'

Anti-senso (VP2 R): 5'GAT GGA TGT GAT TGG CTG GG 3'

Para a síntese do cDNA a partir do RNA total foi utilizado *primer* específico para a VP2 (VP2R).

4.4. Produção do cDNA codificador da proteína viral VP2

Para o processamento do RNA foi utilizado o kit *SuperScriptTM FirstStrand Synthesis System for RT-PCR* (INVITROGEN), seguindo-se a recomendação do fabricante. Uma mistura com 2,5 µg de RNA, 4 pmol de oligonucleotídeo VP2R e água DEPC foram aquecidos a 70 °C por 10 minutos e colocados no gelo por um minuto. A essa mistura foram adicionados MgCl₂ 2,5 mM, tampão *First Strand* 1 X, dNTP 0,5 mM e DTT 0,01 M, e, em seguida, a mistura foi aquecida a 42 °C por 5 minutos. Depois do aquecimento foram adicionados 50 U da enzima (Superscript II – INVITROGEN), a mistura foi incubada a 42 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos e, em seguida, resfriada no gelo. Logo após, foram adicionadas 2 U de RNase H, a mistura incubada a 37 °C por 20 minutos e, então, estocada a -20 °C.

4.5. Amplificação dos cDNAs

Para a amplificação do cDNA que codifica a proteína viral VP2 visando a caracterização molecular dos isolados foi utilizada uma mistura que consiste de 2 µL de cDNA, tampão PCR 1 X, MgCl₂ 5 mM, dNTP 0,2 mM, 1 pmol de cada oligonucleotídeo, VP2F e VP2R, 1 U de Taq DNA polimerase (INVITROGEN). Para a reação de amplificação foi feito um controle negativo utilizando água ultra-pura como molde. As misturas foram colocadas no termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) por 40 ciclos a 94 °C por 2 minutos, 94 °C por 40 s, 55 °C por 1 minuto e 30 s e 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 1 %, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (SIGMA), utilizando-se o padrão molecular DNA ladder 100 pb (GIBCOBRL) e visualizado sob luz ultravioleta.

4.6. Clonagem da porção da região hipervariável da proteína viral VP2

Os produtos de PCRs correspondentes a uma porção da região hipervariável da VP2 do IBDV foram clonados utilizando-se como vetor de clonagem o *pGEM T Easy Vector System* (PROMEGA). A clonagem foi conduzida de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram multiplicados por meio da transformação

química de células competentes *Escherichia coli* DH5 α , descrita por Sambrook *et al.* (1989), e as células recombinantes foram discriminadas pela coloração das colônias brancas (recombinantes) e azuis (não recombinantes). Os clones foram selecionados para posterior extração e purificação do DNA plasmidial.

4.7. Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi conduzida pelo método da lise alcalina descrito por Maniatis *et al.* (1998). Para isso, as colônias recombinantes selecionadas foram crescidas separadamente em 4 mL de meio LB/ampicilina (100 μ g/mL) durante 16 horas a 37 °C e 180 rpm. Após o crescimento, a suspensão de bactérias foi transferida para tubos de 1,5 mL e centrifugada por 2 minutos a 8.600 xg . Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 200 μ L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, glicose 50 mM), agitou-se por vortexagem até a completa ressuspensão das células. Após deixar à temperatura ambiente por 5 minutos, foram adicionados 200 μ L de solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Os tubos foram invertidos por 6 vezes e colocados no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L de solução III gelada (Acetato de potássio 3 M, ácido acético 2 M), os tubos invertidos lentamente por 6 vezes e incubados no gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 8.600 xg por 3 minutos e 550 μ L de sobrenadante foram transferidos para tubos novos, sendo, a seguir, adicionados 5 μ L de RNase A (10 mg/mL). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37 °C em banho-maria. Em seguida, adicionaram-se, aos tubos, fenol-clorofórmio em uma proporção de 1:1. Os tubos foram agitados por 5 minutos e centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionaram-se 500 μ L de clorofórmio. Os tubos foram agitados por 5 minutos e centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos sendo a fase superior coletada e transferida novamente para novos tubos, onde foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos e deixados por 16 horas a -20 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado, o precipitado celular lavado com 500 μ L de etanol 70 % e centrifugado durante 5 minutos a 10.000 xg . O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e ressuspendido em 20 μ L de água ultra pura estéril. O DNA plasmidial

extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 0,8 %, corado por brometo de etídeo 0,5 µg/mL (SIGMA-ALDRICH) e visualizado sob luz ultravioleta.

4.8. Ensaio de restrição

Para confirmar a presença do inserto de 251 pb, foi realizado um ensaio de restrição utilizando a enzima *EcoR* I (FERMENTAS), seguindo as recomendações do fabricante com modificações. Dois µL do DNA plasmidial foram misturados ao tampão para *EcoR* I 1 X e a mistura foi incubada a 60 °C no banho-maria por 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi resfriada no gelo e, em seguida, foram adicionadas 1,5 U da enzima *EcoR* I. Os tubos contendo a mistura foram novamente agitados e incubados a 37 °C no banho-maria por 16 horas. A eficiência da clivagem foi analisada em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 0,8 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (SIGMA-ALDRICH), utilizando-se o padrão molecular DNA ladder 100 pb (GIBCOBRL) e visualizado sob luz ultravioleta.

4.9. Determinação da seqüência de nucleotídeos

As amostras de DNAs plasmidiais foram purificados utilizando o kit de purificação “*GFX PCR and DNA Purification Kit*” (AMERSHAM BIOSCIENCE), seguindo as recomendações do fabricante e, em seguida, foram seqüenciadas em um seqüenciador automático MegaBACE 1000 (AMERSHAM BIOSCIENCE), utilizando-se o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Mega BACE (AMERSHAM BIOSCIENCE), conforme as recomendações do fabricante, no Laboratório de Genômica situado no BIOAGRO/UFV.

4.10. Análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos foram editadas usando o aplicativo Chromaspro 1.34 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e uma região central de 211 nucleotídeos (842 a 1053 da seqüência de nucleotídeo do gene que codifica a proteína VP2) foi selecionada para conduzir o alinhamento das seqüências. Assim, as seqüências dos dois isolados analisados neste estudo foram alinhadas com as seqüências correspondentes de outros isolados de IBDV depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology*

Information (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o aplicativo computacional MEGA 3.1.

Nos estudos filogenéticos, conduzidos no aplicativo MEGA 3.1, utilizou-se o algoritmo Neighbor-Joining, com o modelo de Kimura (1980), com 2 parâmetros, aliado ao método de bootstrap utilizando-se 1.000 repetições, para a análise da distância e agrupamento das seqüências de uma porção da região hipervariável da VP2.

A análise da identidade dos isolados foi feita utilizando o algoritmo BLASTn, opção do NCBI.

4.11. Construção da biblioteca de cDNA

4.11.1. Vírus e células

Células VERO infectadas por IBDV e células VERO não infectadas foram cultivadas sob condições idênticas. Para a infecção das células VERO foi utilizado o isolado LVMA0604, extraído da bursa de aves com suspeita clínica de IBD. Para o cultivo celular foram utilizadas garrafas de 75 cm² e as células cultivadas em meio essencial mínimo (MEM-CULTILAB) com 1 % de uma mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina/SIGMA), 1 % de antimicótico (fungizona/SIGMA-ALDRICH) e suplementada com 10 % de soro fetal bovino (SFB-CULTILAB). Quando o tapete celular tornou-se semi-confluyente foi feita a inoculação com o isolado viral (LVMA 0604). Após 1 hora de adsorção, foram adicionados 8 mL de MEM suplementado com 5 % de SFB e as garrafas foram colocadas novamente em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Para o cultivo de células não infectadas por IBDV, foi simulada uma infecção pela adição de MEM no mesmo volume de inóculo utilizado para o cultivo infectado, seguindo-se os mesmos procedimentos.

4.11.2. Isolamento de RNA total

Após 8 horas de inoculação, as duas populações de células VERO (uma infectada com IBDV e outra não infectada) foram tripsinizadas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O RNA foi extraído como descrito no item 4.2.

A qualidade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2 % visualizado sob luz ultravioleta. A

concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria e, em seguida, processou-se a purificação do RNA total em RNA mensageiro (mRNA).

4.11.3. Purificação de RNA mensageiro (mRNA)

O mRNA foi purificado a partir de 0,5 mg de RNA total previamente extraído utilizando-se o *NucleoTrap® mRNA Midi Purification Kit* (CLONTECH), conforme as recomendações do fabricante, sendo que duas purificações consecutivas foram necessárias para a completa purificação do mRNA. A qualidade do purificado foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2 % utilizando-se 0,5 µL do mRNA.

4.11.4. Hibridização subtrativa

Para a realização desta técnica foi utilizado o kit *BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (CLONTECH), onde populações de cDNA obtidas de células VERO foram comparadas, sendo uma população preparada a partir de células infectadas por IBDV e a outra a partir de células não infectadas cultivadas sob as mesmas condições, denominadas nesse ensaio de *tester* e *driver*, respectivamente.

4.11.4.1. Síntese de cDNA a partir do mRNA purificado

A síntese da fita de cDNA foi realizada com cada mRNA, *tester* e *driver*, e com o mRNA controle, obtido de músculo esquelético humano, fornecido pelo kit. O cDNA de músculo esquelético produzido serviu como controle de cDNA nos passos posteriores.

Para cada *tester*, *driver* e controle foram adicionados em um tubo de 0,5 mL cerca de 2 µg do mRNA e 1 µM de oligonucleotídeo. As soluções foram incubadas a 70 °C por 2 minutos e 4 °C por 2 minutos, no termociclador. A cada tubo foi adicionado tampão First-Strand 1 X, dNTP 1 µM e 20 U da enzima Transcriptase Reversa AMV. Os componentes foram misturados, incubados a 42 °C durante 90 minutos e colocados no gelo para completar a síntese da fita de cDNA. Em seguida, iniciou-se a síntese da fita dupla de cDNA (dscDNA), adicionando-se em cada tubo o tampão Second-Strand 1 X, dNTP 1 µM e coquetel de enzimas Second-Strand 1 X. Os componentes foram misturados e rapidamente centrifugados para posterior incubação a 16 °C por

120 minutos no termociclador. Em seguida, adicionou-se 6 U de DNA Polimerase T4 e, novamente, os componentes foram misturados para posterior incubação a 16 °C por 30 minutos no termociclador. Quatro microlitros da mistura EDTA/Glicogênio 20 X foram adicionados aos tubos para terminar a síntese da segunda fita. Aos tubos foram adicionados 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram vortexados e centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente para a separação das fases. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo tubo onde foram adicionados 100 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para posterior vortexagem e centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. À fase aquosa superior coletada foram adicionados 40 µL de NH₄OAc 4 M e 300 µL de etanol 95 %. Após a vortexagem, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg durante 20 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de dscDNA foi lavado com 500 µL de etanol 80 % e centrifugado a 10.000 xg durante 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi exposto à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos para evaporação completa do etanol residual e dissolvido em 50 µL de água Milli-Q estéril. Seis microlitros da amostra foram transferidos para um novo tubo, estocados a -20 °C e reservados para estimar a distribuição dos cDNAs sintetizados.

4.11.4.2. Digestão pela endonuclease de restrição *Rsa* I

Os cDNAs produzidos (*tester*, *driver* e controle) foram digeridos pela enzima *Rsa* I para gerar fragmentos de dscDNA de tamanhos curtos e com pontas cegas. Um volume de 43,5 µL de cada dscDNA sintetizado foi adicionado em um tubo contendo tampão de restrição *Rsa* I 1X e 15 U da enzima *Rsa* I. Os componentes foram misturados, rapidamente centrifugados e incubados a 37 °C por 16 horas. Cinco microlitros da mistura de digestão foram reservados para análise da eficiência da digestão por *Rsa* I, por meio da eletroforese em gel de agarose 1 %. Dois microlitros e meio da mistura EDTA/glicogênio 20 X foram adicionados para completar a reação. Posteriormente, iniciou-se uma purificação do cDNA, adicionando-se 50 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram vortexados e centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente para a

separação das fases. A fase superior aquosa foi coletada e transferida para novos tubos onde foram adicionados 50 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Novamente, os tubos foram vortexados e centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada, transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 25 µL de NH₄OAc 4 M e 187,5 µL de etanol 95 % e, mais uma vez, os componentes foram misturados e centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o dscDNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 80 % e centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi completamente removido e o dscDNA novamente precipitado ficou exposto à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol residual. O dscDNA foi dissolvido em 5,5 µL de água Milli-Q estéril e a solução foi estocada a -20 °C.

4.11.4.3. Ligação dos adaptadores

A Figura 3 mostra um fluxograma experimental global para preparação do cDNA *tester* ligado ao adaptador. A subtração foi feita em ambas as direções para cada par de cDNA *tester/driver*. O cDNA 1 corresponde à amostra derivada de células VERO infectadas pelo IBDV e o cDNA 2 é a amostra derivada de células VERO não infectadas. O experimento de subtração foi projetado para enriquecer as seqüências diferencialmente expressas presentes na amostra 1 (cDNA 1, *tester*), mas não na amostra 2 (cDNA 2, *driver*), bem como para a subtração reversa, na qual o cDNA 2 serviu como *tester* e o cDNA 1 serviu como *driver*. Com isso, duas populações de cDNA subtraído foram obtidas: o cDNA *forward*-subtraído contendo seqüências correspondentes aos genes que foram super-expressos durante a infecção viral e o cDNA *reverse*-subtraído contendo seqüências correspondentes aos genes que foram inibidos ou sub-expressos durante a infecção viral.

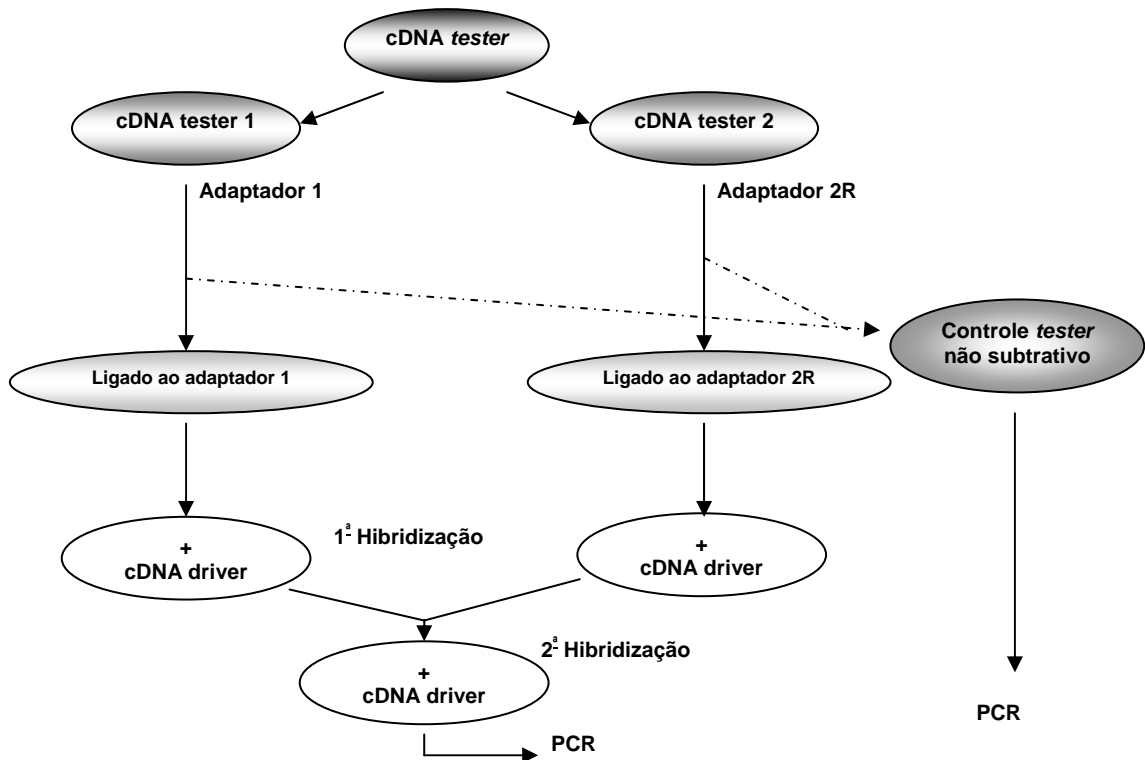


Figura 3. Esquema representativo da preparação dos cDNAs *tester* ligados aos adaptadores (Adaptado do manual do kit BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit/CLONTECH).

Como ilustrado na Figura 3, três ligações de adaptadores separadas foram feitas para cada cDNA *tester* experimental e cDNA controle, sendo que os adaptadores não foram ligados ao cDNA driver. Cada cDNA foi aliquotado em dois tubos separados, sendo uma alíquota ligada ao adaptador 1 (*Tester* 1-1, 2-1 e 3-1) e a segunda ligada ao adaptador 2R (*Tester* 1-2, 2-2, e 3-2). Depois que as reações de ligação foram ajustadas, porções de cada tubo *tester* foram combinadas de modo que o cDNA ficasse ligado com ambos adaptadores (controle não-subtraído *tester* 1-c, 2-c e 3-c). Cada cDNA controle *tester* não-subtraído serviu como um controle positivo para ligação, e depois serviu como controle negativo para a subtração.

Para a ligação dos adaptadores, 1 µL de cada cDNA experimental digerido pela *Rsa* I foi diluído 5 vezes. Uma mistura (Master Mix) contendo tampão de ligação 1 X e 400 U de T4 DNA ligase foi adicionada a cada tubo de reação, contendo 2 µM de adaptador e cDNA *tester* experimental/controle, conforme descrito na Tabela 1 (Apêndice 9.1.).

Em um novo tubo foram misturados 2 μ L de *Tester* 1-1 e 2 μ L de *Tester* 1-2. Depois que a reação de ligação foi completada, esta foi considerada como o controle *tester* não-subtraído 1-c. Foi feito o mesmo para cada cDNA *tester* adicional e para o cDNA *tester* controle. Os tubos foram incubados durante 18 horas à temperatura de 16 °C. Após esse tempo, foi adicionado 1 μ L da mistura EDTA/glicogênio para parar a reação de ligação e as amostras foram incubadas em banho-maria a 72 °C durante 5 minutos para inativar a ligase. Os produtos resultantes desta etapa foram os cDNAs controle/*tester* ligados aos adaptadores e os cDNAs controle/*tester* não-subtraídos.

Um microlitro de cada controle *tester* não-subtraído (1-c, 2-c e 3-c) foi removido e diluído 100 vezes para serem utilizados posteriormente na reação de PCR. As amostras foram estocadas a -20 °C.

A eficiência da ligação foi analisada antes do prosseguimento com a hibridização. Para isso, 0,5 μ L de cada cDNA ligado aos adaptadores foram combinados, em tubos separados, conforme demonstrado na Tabela 2 (Apêndice 9.2.).

Para um volume final de 25 μ L, foram adicionados em cada tubo tampão para PCR 1 X, MgCl₂ 2 mM, deoxinucleotídeo (dNTP) 0,5 mM, 2 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRA). Os reagentes foram incubados em termociclador sob as seguintes condições: 75 °C por 5 minutos para extensão dos adaptadores, 94 °C por 30 segundos, seguidos de 25 ciclos a 94 °C por 10 segundos, 65 °C por 30 segundos e 68 °C por 2,5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL).

4.11.4.4. Primeira hibridização

Para se processar a primeira hibridização, um excesso de cDNA *driver* foi adicionado a cada cDNA *tester*.

Para cada subtração foram combinados os reagentes listados na Tabela 3 (Apêndice 9.3.). Em seguida, os tubos foram incubados a 98 °C durante 90 segundos e, posteriormente, a 68 °C por 8 h em um termociclador.

4.11.4.5. Segunda hibridização

Na segunda hibridização, as duas amostras resultantes da primeira hibridização foram misturadas e as seqüências diferencialmente expressas foram novamente enriquecidas com o cDNA *driver* desnaturado correspondente. Novas moléculas hibridizadas foram formadas, as quais correspondiam aos cDNAs diferencialmente expressos com diferentes adaptadores em cada extremidade.

Os procedimentos seguintes foram realizados para cada cDNA *tester* e para o cDNA controle. Em tubos novos, foram adicionados 1 µL de cDNA *driver* e tampão de hibridização 1 X, para um volume final de 5 µL. Um microlitro dessa mistura foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionada uma gota de óleo mineral antes de incubar a 98 °C por 90 segundos em um termociclador. Após a desnaturação do cDNA *driver*, ele foi adicionado às amostras 1 e 2 da primeira hibridização. Um micropipetador foi ajustado para 15 µL e a amostra 2 (*Tester* 1-2, 2-2 e 3-2) resultante da primeira hibridização foi coletada. Após deixar um pequeno espaço com ar na ponteira, logo abaixo da amostra, coletou-se o cDNA *driver*, desnaturado anteriormente, e toda a mistura foi transferida para o tubo contendo a amostra 1 (*Tester* 1-1, 2-1 e 3-1) resultante da primeira hibridização. Os tubos foram misturados, rapidamente centrifugados e incubados a 68 °C por 18 horas em um termociclador. Após esse tempo, 200 µL de tampão de diluição foram adicionados e os tubos foram aquecidos em um termociclador a 68 °C durante 7 minutos e, posteriormente, estocados a -20 °C.

4.11.5. Amplificação por PCR e Nested-PCR

Os cDNAs diferencialmente expressos foram seletivamente amplificados durante as duas reações descritas. Antes do ciclo térmico, as fitas dos adaptadores que faltavam foram preenchidas por uma rápida incubação a 75 °C durante 5 minutos permitindo assim a extensão dos mesmos e criando um sítio de ligação para o *primer* 1 do PCR. Na primeira amplificação, somente os cDNAs dupla-fita com diferentes adaptadores em cada extremidade foram exponencialmente amplificados. Na segunda amplificação, foi usado Nested-PCR para reduzir o resíduo e enriquecer as seqüências diferencialmente expressas.

Foram realizadas sete reações de PCR: (1) cDNA experimental *forward*-subtraído, (2) *tester* controle 1-c não-subtraído, (3) cDNA experimental *reverse*-subtraído, (4) *tester* controle não-subtraído para a subtração reversa (2-c), (5) cDNA controle subtraído, (6) *tester* controle não-subtraído para controle de subtração (3-c) e (7) cDNA subtraído controle para PCR. Este último serviu como controle positivo.

Para preparar as amostras para a PCR foram aliqüotados 1 µL de cada cDNA diluído em tubos devidamente identificados e 1 µL de cDNA controle para a PCR em um deles. Para um volume final de 25 µL, foram adicionados tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9,0), dNTP 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,4 mM de *primer* 1 e 2 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRA). Os tubos foram incubados a 75 °C durante 5 minutos em termociclador para a extensão dos adaptadores, seguidos de 94 °C por 25 segundos, 34 ciclos a 94 °C por 10 segundos, 66 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos. Oito microlitros de cada reação foram analisados em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 2 % corado com brometo de etídeo (5 µg/mL/SIGMA-ALDRICH).

Para as reações de Nested-PCR, foram adicionados tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9,0), dNTP 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,4 mM de cada *nested-primer* e 2 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRA) em tubos contendo 1 µL da reação de PCR e iniciou-se o ciclo de temperatura: 20 ciclos a 94 °C por 10 segundos, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos. Oito microlitros de cada reação foram analisados em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 2 % corado com brometo de etídeo (5 µg/mL, SIGMA-ALDRICH). Os produtos da reação foram estocados a -20 °C.

4.11.6. Clonagem dos produtos amplificados da hibridização

Os produtos do Nested-PCR obtidos com a segunda hibridização foram clonados, utilizando-se como vetor de clonagem o pGEM-T Easy (PROMEGA). A clonagem foi conduzida de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, os plasmídios gerados foram amplificados por meio da transformação química de células competentes *Escherichia coli* DH5α e as células recombinantes foram discriminadas pela coloração das colônias brancas (recombinantes) e azuis (não recombinantes). Cerca de 1.800 clones foram selecionados de forma aleatória e, para aqueles onde a presença do

inserto foi constatada por PCR de colônia, processou-se a extração do DNA plasmidial.

4.11.7. Transformação química

A transformação química foi conduzida conforme a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para isso, células competentes da linhagem de *E. coli* DH5 α foram descongeladas no gelo e a elas foram adicionados 5 μ L da reação de ligação. Homogeneizou-se cuidadosamente e as células foram colocadas em banho de gelo por mais 30 minutos para, em seguida, promover o choque térmico das células competentes por 90 segundos em banho-maria a 42°C e retornar o tubo ao gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de LB aos tubos contendo as células transformadas e incubados por 1 hora a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Em seguida, as células foram plaqueadas em LB sólido (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 %) suplementado com ampicilina 100 μ g/mL e adicionados X-gal 2 % (5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-galactosídeo) e 10 μ L de IPTG 200 mM (isopropil-tiogalactopianosídeo). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 20 horas. Após esse tempo, fez-se a triagem bacteriana por PCR para a confirmação da presença do inserto. As colônias recombinantes foram crescidas em placas de 96 poços de fundo redondo contendo 100 μ L de LB/Amp. por 16 horas em estufa a 37 °C . Os pré-inóculos foram crescidos posteriormente em placas de 96 poços contendo 2 mL de LB/Amp. durante 16 horas sob agitação de 280 rpm para a extração de DNA plasmidial.

4.11.8. Triagem de clones pela PCR

Colônias individuais de bactérias foram coletadas diretamente da placa de transformação e plaqueadas em placas contendo LB sólido suplementado com ampicilina 100 μ g/mL e adicionados X-gal 2 % e 10 μ L de IPTG 200 mM. As placas continham posições numeradas para cada colônia e as bactérias remanescentes na ponteira foram transferidas para tubos de 200 μ L contendo 30 μ L de solução tampão Tris-EDTA contendo 50 μ g de Proteinase K (SIGMA). Cada tubo continha 10 diferentes colônias bacterianas. Esses tubos foram incubados a 55 °C durante 15 minutos e 80 °C por 15 minutos em um termociclador. A mistura foi resfriada no gelo por 1 minuto e, posteriormente,

centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Um microlitro deste DNA foi adicionado à reação de PCR, previamente preparada, contendo tampão de PCR 1 X (INVITROGEN), 0,1 mM de cada dNTP, 0,6 pmol de oligonucleotídeo senso (M13F) e antisenso (M13R), 1 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 10 µL. As reações de PCR foram colocadas no termociclador nas seguintes condições: 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 1,2 % corado por brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta.

4.11.9. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

As placas de 96 poços contendo as bactérias crescidas foram centrifugadas a 160 x g por 10 minutos a 22 °C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados a cada poço 240 µL de GET (glicose 1%, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0) para ressuspender as células. Centrifugou-se a 150 x g por 7 minutos, descartou-se o sobrenadante e, em seguida, foram adicionados 80 µL de GET para ressuspender as células. Sessenta microlitros da suspensão de células foram transferidos para placas de polipropileno de fundo redondo, já contendo 4 µL de RNase A (10 mg/mL). Foram adicionados a cada poço 80 µL de NaOH 0,2 M/SDS 1 %. As placas foram seladas com adesivo, misturadas por 30 vezes por inversão, incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 2 minutos a 160 xg. Em seguida, foram adicionados à cada poço 80 µL de KOAc 3M gelado, selou-se, novamente, as placas com adesivo e misturou-se 30 vezes por inversão. As placas foram incubadas no gelo por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 160 xg por 1 minuto. O adesivo foi removido e as placas abertas foram incubadas em estufa a 90 °C por 30 minutos. As placas foram resfriadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 160 xg por 9 minutos. Logo após, o volume total do sobrenadante foi transferido para uma placa de filtro Millipore (0,22 µm), que foi centrifugada a 160 xg durante 6 minutos. Ao filtrado foram adicionados 100 µL de isopropanol, misturou-se 30 vezes por inversão, e centrifugou a 160 xg durante 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de etanol 70 % gelado. As placas foram centrifugadas a

160 µg por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as placas foram secas à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. O DNA foi ressuspendido com 60 µL de água Milli-Q durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram, então, estocadas a -20 °C até o processamento do sequenciamento.

4.11.10. Determinação da seqüência de nucleotídeos

As amostras de DNAs plasmidiais extraídas e purificadas foram seqüenciadas em um seqüenciador automático MegaBACE 1000 (AMERSHAM BIOSCIENCE), utilizando-se o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Mega BACE (AMERSHAM BIOSCIENCE), conforme as recomendações do fabricante, no Laboratório de Genômica situado no BIOAGRO/UFV. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os algoritmos BLASTn e BLASTx, sendo considerada significativa quando o valor esperado de similaridade (*e-value*) fosse inferior a $1e^{-10}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de IBDV a partir de células VERO

Os vírus isolados a partir da bursa de aves com suspeita clínica de IBD, foram amplificados em células VERO. Após duas passagens consecutivas nessa linhagem de células, a monocamada foi coletada por tripsinização 36 horas pós-inoculação com os isolados de IBDV, denominados de LVMA0504 e LVMA0604, pois nesse tempo, o efeito citopático, conseqüente da infecção viral, já era evidente.

Após a transcrição reversa do RNA em DNA complementar (cDNA), uma porção da região hipervariável do gene que codifica a proteína viral VP2 foi amplificada por meio da RT-PCR e o produto da PCR de 251 pb foi visualizado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo, conforme pode ser visto na Figura 4.

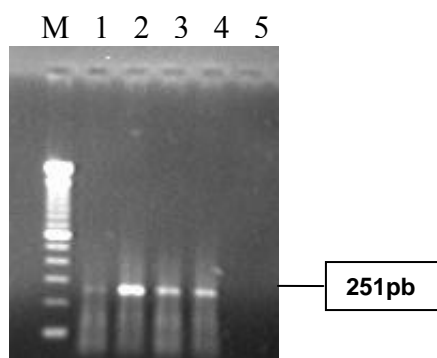


Figura 4. Padrão eletroforético dos produtos amplificados pela reação de RT-PCR dos isolados de IBDV. M: marcador de 100 pb, 1 e 2: isolados de IBDV LVMA0504, 3 e 4: isolados de IBDV LVMA0604, 5: controle negativo.

5.2. Análise filogenética dos isolados

As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com outras seqüências depositadas no NCBI (Quadro 1) para a construção da árvore filogenética. Como se observa na Figura 5, cada ramificação da árvore filogenética gerada possui um número, que indica a porcentagem de vezes que aquela ramificação foi conservada nos demais testes, ou seja, nas 1.000 repetições atribuídas ao bootstrap.

De acordo com a Figura 5, pode-se observar que as linhagens brasileiras de IBDV analisadas no presente estudo estão estreitamente

relacionadas com linhagens clássicas de IBDV utilizadas em vacinas atenuadas. A comparação das seqüências de nucleotídeos, bem como das seqüências deduzidas de aminoácidos, dos isolados analisados neste estudo com a vacina brasileira Gumborvet comumente utilizada pelas granjas do estado, observou-se uma identidade de 100 % (Figura 6).

Quadro 1. Identificação dos isolados utilizados na análise filogenética.

Isolados	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Classificação
Gumborvet	AF293798	Clássica
Gumbovax	AF293799	Clássica
PBG98	D00868	Clássica
Cu1	D00867	Clássica
Gumboral CT	AF293796	Clássica
STC	D00499	Clássica
GBF1	D16828	Clássica
Edgar	A33255	Clássica
SAL-1	X96472	Clássica
Bursine II	AF293795	Clássica
MX7504	AF498620	Clássica
MX7506	AF498621	Clássica
Lukert	D16679	Clássica
52/70	D00869	Clássica
Variant A	M64285	Variante E.U.A.
Variant E	X54858	Variante E.U.A.
Snyder	I21030	Variante E.U.A.
GLs	M97346	Variante E.U.A.
U28	AF498635	Variante E.U.A.
849VB	X95883	vvIBDV
Des603-BR	AF293802	vvIBDV
JRMPT45IR	DQ785174	vvIBDV
UK661	X92760	vvIBDV
DV86	D16630	vvIBDV
OKYM	D49706	vvIBDV
CA586-BR	AF279691	vvIBDV
MC597-BR	AF293804	vvIBDV
KK1	AF165150	vvIBDV
002/73	AJ878682	Clássica (VP1)

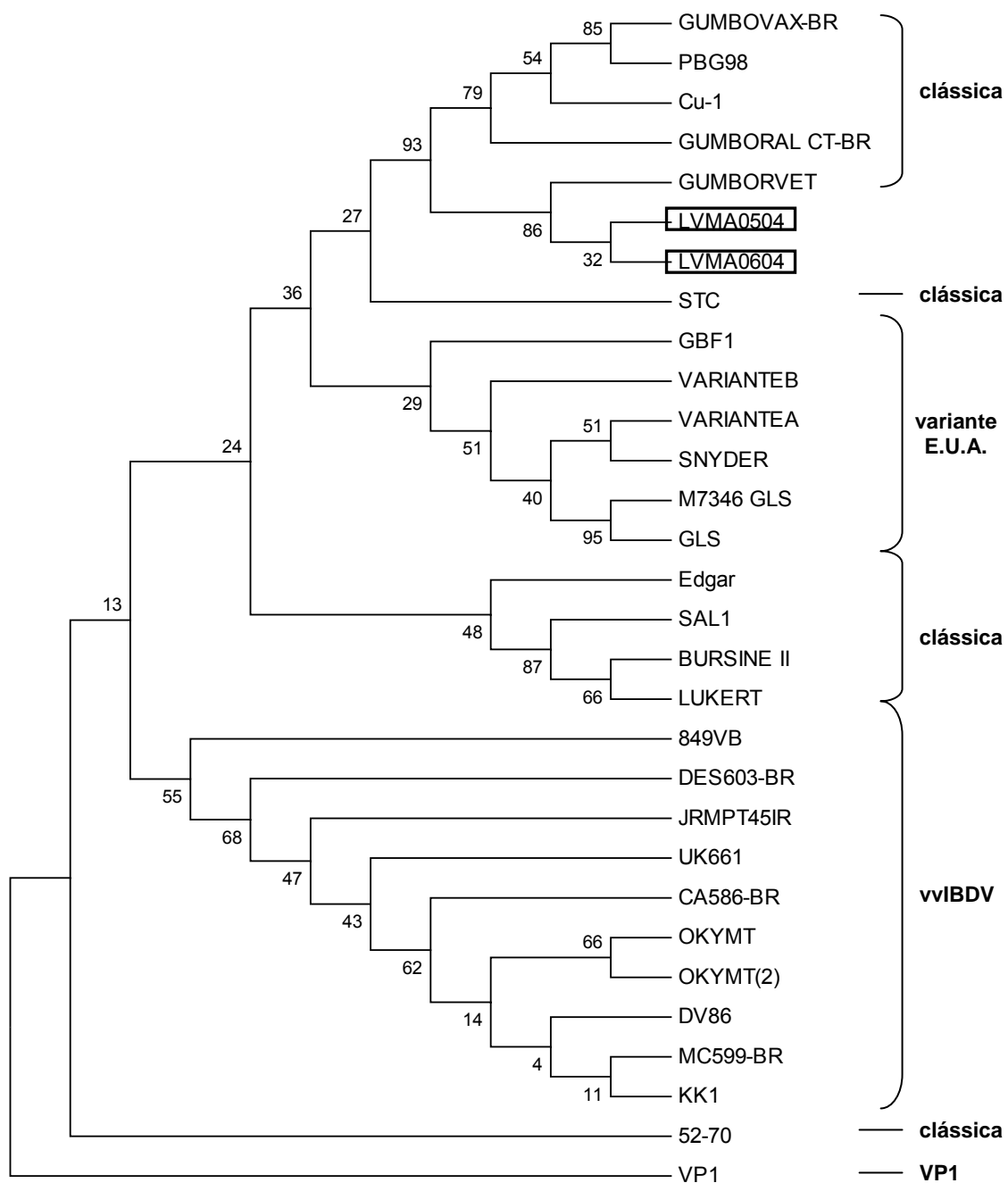


Figura 5. Dendrograma mostrando a localização filogenética dos isolados de IBDV (LVMA0504 e LVMA0604) obtidas a partir do alinhamento de 211 nucleotídeos (842 a 1053) do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo viral. Esses nucleotídeos estão localizados na região hipervariável da VP2. Os números nas bases dos ramos indicam porcentagens da análise de bootstrap, nas quais as ramificações foram observadas.

	238	256	294
LVMA0504	TSLSVGGELVVFQTSVHGLVVLGATIYLIIGFDGTAVITRAVAANGLTTGTDNLLPFNL		
LVMA0604	TSLSVGGELVVFQTSVHGLVVLGATIYLIIGFDGTAVITRAVAANGLTTGTDNLLPFNL		
GUMB.VET		
GUMB.CTT.....M...I		
Cu-1T.....M...		
GUMBOVAXR.....T.....T.....M...		
PBG98R.....T.....T.....M...		
VAR.AK...QS.....A.I...M...		
VAR.BK...QS.....A.I...M...		
SNYDER	-.....K...QS.....A...M...		
GLSK...S.....S.....M...I		
GBF1H...QS.....ST.....D...X...M...I		
MC599-BR	-...I.....Q..I.....D...A...M...I		
UK661	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
CA586-BR	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
DV86	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
JRMPT45	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
OKYM	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
KK1	...I.....Q..I.....D...A...V...I		
DES603BR	...I.....Q..I.....D...A...M...I		
849VB	.K.....R.Q..I.....D...A...M...I		
52-70	...I.....Q.....D...A...M...		
STCQ.....F.....T.....D...A...M...		
Edgar	...I.....Q.....T.....SD...A...M...		
LUKERT	...I.....H...Q..A.N.....T.....SD.....I...M...		
BURSINE2	...I.....H.....A.D.....T.....SD.....I...M...		
SAL1	...I.....H.T.PC.A.D.....T.....S.T.....I...M.G...		
	295 299 306		
LVMA0504	VIPTNEITQPIT		
LVMA0604	VIPTNEITQPIT		
GUMB.VET		
GUMB.CT		
Cu-1	..S.....		
GUMBOVAX		
PBG98		
VAR.A		
VAR.B		
SNYDER		
GLS		
GBF1		
MC599-BR	...S.....		
UK661	...S.....		
CA586-BR	...S.....		
DV86	...S.....		
JRMPT45	...S.....		
OKYM	...S.....		
KK1	...S.....		
DES603BR		
849VB		
52-70		
STC		
Edgar		
LUKERT		
BURSINE2		
SAL1-		

Figura 6. Alinhamento e comparação das seqüências de aminoácidos (238 a 306) deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos da região hipervariável da proteína VP2 de isolados de IBDV do sorotipo 1. (-) região da seqüência não determinada, (.) aminoácidos idênticos aos da seqüência dos isolados LVMA0504 e LVMA0604.

Ikuta *et al.* (2001) desenvolveram um ensaio de RT-PCR/RFLP para caracterizarem isolados de IBDV brasileiros baseado na amplificação de um fragmento de 248 pb do gene que codifica a proteína viral VP2, de acordo com a seqüência descrita por Bayliss *et al.* (1990). A partir dessa caracterização, os isolados foram agrupados conforme seus padrões de RFLP.

Seguindo este padrão de classificação, as seqüências nucleotídicas dos dois isolados de IBDV foram analisadas quanto à presença de sítio de restrição para as enzimas *Dra* I, *Sac* I, *Sty* I, *Ssp* I, *Taq* I e *Mva* I (Tabela 5). Segundo essa metodologia, as amostras analisadas apresentam características de cepas clássicas, uma vez que não possuem sítio para *Ssp* I, mas apresentam para *Sac* I e *Mva* I. Três sítios de aminoácidos (256, 294 e 299) têm sido demonstrados como conservados em todas as cepas de vvIBDV conhecidas em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil (Ikuta *et al.*, 2001), que poderia conferir a eles um fenótipo altamente virulento (van den Berg *et al.*, 2004). Quando se compara os isolados deste estudo com cepas vvIBDVs (figura 6), nota-se que não há nenhuma substituição de resíduos de aminoácido nas posições 256 e 294 (Leucina por Isoleucina), nem na posição 299 (Asparagina por Serina), dentro do domínio hipervariável da VP2. Isso confirma a característica clássica desses isolados.

Tabela 4. Avaliação da presença de sítios para enzimas de restrição nas seqüências de nucleotídeos analisadas dos isolados de IBDV LVMA 0504 e LVMA0604.

Análise dos sítios de restrição	<i>Dra</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sty</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Mva</i> I
0504	-	+	+	-	-	+
0604	-	+	+	-	-	+

* De acordo com a metodologia descrita por Ikuta *et al.* (2001).

+ : indica presença do sítio de restrição.

- : indica ausência do sítio de restrição.

A alta taxa de mutação dos vírus que possuem como genoma RNA segmentado, além da alta pressão de seleção gerada pela intensa vacinação das aves, podem levar ao aparecimento de IBDVs com propriedades diferentes capazes de persistirem em uma população imunizada. Por isso, é necessário

identificar e caracterizar novos isolados de IBDV e, assim, compará-los com outros previamente descritos (van den Berg, 2000). Van den Berg *et al.* (2004), propuseram três critérios para a caracterização de isolados de IBDV: antigenicidade, aspectos genéticos e de patogenicidade.

As duas cepas de IBDV analisadas neste estudo foram isoladas de duas diferentes granjas com criação de aves de postura localizadas na região central do estado de Minas Gerais. Os dois surtos ocorreram no ano de 2004, mas em épocas diferentes do ano. As galinhas chegaram à UESA com quadro clínico sugestivo de doença infecciosa bursal e foram positivas sorologicamente para IBDV. Barrios (2005) comparou a patogenicidade desses isolados, em ovos SPF com 10 dias de idade, com isolados vacinais e encontrou características de patogenicidade semelhantes entre eles, sugerindo que esses isolados provavelmente possuem a mesma origem vacinal.

Bayliss *et al.* (1990), por meio da análise das seqüências nucleotídicas do segmento A de isolados de IBDV, observaram que o vírus possui seqüências altamente conservadas, com exceção de uma região situada entre os nucleotídeos localizados entre a posição 615 e 1050 na ORF que codifica a proteína VP2. Essa região foi denominada hipervariável e correspondia exatamente à região onde os anticorpos monoclonais neutralizantes se ligavam, previamente identificada por Azad *et al.* (1987). Anticorpos neutralizantes contra o IBDV reconhecem sítios específicos entre os aminoácidos 206 e 350 da VP2 (Azad *et al.*, 1987). Mudanças nessa região são responsáveis pelo surgimento de novas variantes do vírus, ocasionando o não reconhecimento pelos anticorpos previamente produzidos e, com isso, a produção de uma resposta não eficiente aos vírus vacinais.

Desde então, diversas variantes antigênicas do IBDV têm sido descritas nos E.U.A. (Snyder *et al.*, 1988), em diversos países da Europa (Brown *et al.*, 1994), da América Central (Jackwood & Sommer, 1999), na Austrália (Sapats & Ignjatovic, 2000) e também no Brasil (Ikuta *et al.*, 2001).

Le Nouën *et al.* (2006) observaram que os segmentos A e B possuem seqüências altamente conservadas quando eles compararam diversos isolados de IBDV geneticamente diferentes, sugerindo uma co-evolução dos 2 segmentos genômicos. Eles também descreveram um rearranjo entre o segmento A de uma cepa vvIBDV e o segmento B de uma cepa clássica

baseado na seqüência nucleotídica desses 2 segmentos. O fato do isolado analisado ter sido cultivado por várias passagens, não descarta a possibilidade desse rearranjo ter ocorrido durante essa adaptação de acordo com Le Nouën *et al.* (2006). Yongwei Wei *et al.* (2006), confirmaram a ocorrência de rearranjo na natureza entre os segmentos A e B de um IBDV isolado a partir da bursa da ave infectada a partir da análise da seqüência completa de nucleotídeos do vírus. Muitos fatores podem contribuir para o aparecimento do rearranjo, tais como pressão vacinal, com a utilização de diversas cepas vacinais; fatores ambientais (como temperatura, luminosidade, umidade e densidade de aves nos galpões de criação); além da resposta imunológica das galinhas em relação à vacinação e aos fatores ambientais. Além disso, os eventos de rearranjo podem requerer fatores específicos dos vírus como substituições de aminoácidos nas proteínas virais (Yongwei Wei *et al.*, 2006).

A caracterização molecular desses isolados mostrou que a região analisada entre eles é idêntica e possui alta identidade (98-100%) com cepas clássicas usadas na formulação das vacinas brasileiras. Com base na antigenicidade desses isolados (determinada pela UESA/DVT/UFV), nas características de patogenicidade desses isolados relatadas por Barrios (2005) e nas características moleculares aqui determinadas, podemos confirmar a origem vacinal desses surtos ocorridos na região central do estado de Minas Gerais no ano de 2004.

Yongwei Wei *et al.* (2006) identificaram 8 aminoácidos conservados quando compararam as seqüências de aminoácidos da proteína VP1 de cepas clássicas e vvIBDV, que provavelmente contribuíram de forma positiva para a virulência dos vvIBDVs. A diferença de patogenicidade encontrada pode ser devido a presença de alguma mutação na ORF que codifica a proteína VP1, que resultou no aumento da virulência do isolado LVMA0604. Além da modificação presente na proteína VP1, outros fatores podem estar envolvidos no desencadeamento da virulência, como substituições de aminoácidos no sítio de clivagem entre as proteínas VP2-VP4, que podem alterar a virulência por afetar o processamento da poliproteína.

Esses resultados sugerem que surtos de IBD podem ocorrer quando se utilizam vacinas “fortes” ou “quentes”, ou seja, vacinas que são atenuadas por poucas passagens em cultivo celular ou ovo embrionado. Recomenda-se,

portanto, a utilização dessas vacinas somente após uma primeira imunização das aves com uma vacina de vírus inativado ou vacina atenuada intermediária em plantéis com níveis de imunidade adequados. Além disso, a utilização de vacinas atenuadas por baixas passagens constitui um risco, uma vez que pode ocorrer reversão da atenuação no hospedeiro, além do vírus poder sofrer recombinação na natureza.

5.3. Detecção de IBDV em células VERO

Em cultivo celular primário de fibroblasto de embrião de galinha SPF, realizado em ensaios anteriores, o isolado LVMA0604 foi capaz de destruir a monocamada celular com 24 horas de inoculação, tendo o efeito citopático (ECP) iniciado 12 horas após a inoculação. Em células VERO, a formação de um ciclo completo do vírus é um pouco mais demorada. Para esse mesmo isolado, a observação de ECP iniciou-se com 24 horas pós-inoculação (h.p.i.) e a destruição completa da monocamada ocorreu com 48 horas (Figura 7). A fotomicrografia 7B mostra o ECP causado pelo isolado LVMA0604 com 48 h.p.i., em que se observa arredondamento das células infectadas e a acentuada destruição da monocamada celular.

Para conseguir avaliar a expressão gênica diferencial durante a infecção pelo IBDV é necessária a descrição do tempo exato de ocorrência de cada evento da replicação do IBDV, que ainda é desconhecido. A escolha do tempo de 8 h.p.i. foi baseada nos tempos descritos desses eventos para o *Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV) (Villanueva *et al.*, 2004), um protótipo da família *Birnaviridae*. Este é um tempo intermediário entre a produção de mRNAs virais (6 h.p.i.) e a síntese de dsRNA genômico (10 h.p.i.).

A utilização de células VERO comparada ao cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha pode ser uma vantagem, uma vez que a população de células é homogênea em VERO e, embora o cultivo primário de fibroblasto seja uma célula do hospedeiro, não é a célula-alvo da infecção *in vivo* pelo IBDV. Os processos metabólicos nos quais o vírus pode interferir, como a expressão de citocinas, a indução da apoptose, a inibição de proteases, são eventos evolutivos conservados.

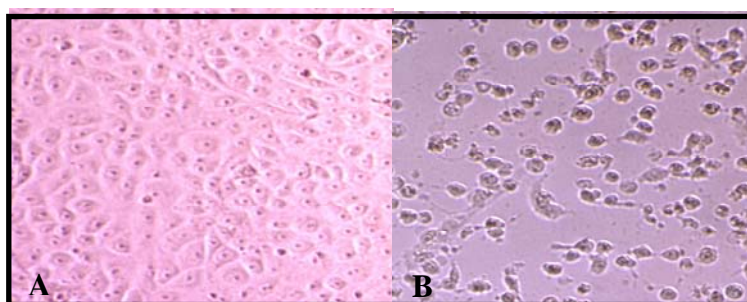


Figura 7. Fotomicrografia de cultivo de células VERO. A - Células normais. B – Arredondamento e destruição da monocamada celular. Aumento de 100 x.

5.4. Identificação de genes diferencialmente expressos durante a infecção pelo IBDV em células VERO

Para a identificação de genes diferencialmente expressos em uma interação vírus célula animal, uma biblioteca subtrativa foi produzida a partir de células VERO infectadas pelo IBDV, utilizando-se um cultivo celular infectado, 8 horas pós-inoculação.

Foi processada a extração de RNA total e posterior purificação do mRNA (Figura 8) das duas populações estudadas, células VERO infectadas por IBDV (LVMA 0604) e células VERO não infectadas.

A partir dos mRNAs purificados, os cDNAs foram produzidos e a partir daí iniciou-se a construção da biblioteca subtrativa.

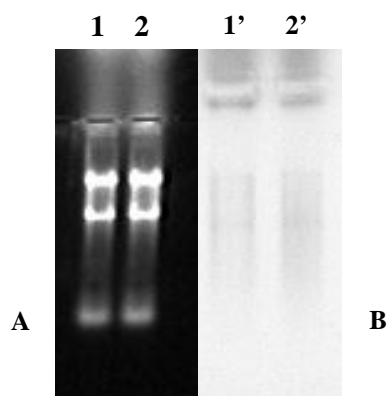


Figura 8. Análise da extração de RNA total e purificação do mRNA por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2 %. A – RNA total extraído de células VERO não infectadas (1) e infectadas por IBDV (2). B – RNA mensageiro purificado a partir do RNA total de células VERO não infectadas (1') e infectadas por IBDV (2').

Para identificar os genes diferencialmente expressos durante a infecção de células VERO pelo IBDV, foi construída uma biblioteca subtrativa, onde foram realizadas hibridizações em ambas as direções (*forward* e *reverse*). A subtração na direção *forward* utiliza o excesso de cDNA de células VERO não infectadas, sendo constituída, portanto, de genes induzidos durante a infecção viral. A subtração na direção reversa (biblioteca *reverse*) utiliza o excesso de cDNA de células VERO infectadas pelo IBDV, selecionando os genes reprimidos em decorrência da infecção viral.

Os cDNAs produzidos para a construção da biblioteca subtrativa foram digeridos pela enzima *Rsa* I (Figura 9) para posterior ligação dos adaptadores 1 e 2R. Após a ligação dos adaptadores, seguiu-se com a hibridização das amostras, processada em duas etapas. Os produtos da hibridização, ou seja, os genes diferencialmente expressos, foram amplificados por meio de PCR e Nested-PCR e visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Figura 10) e em gel de acrilamida 6 % corado pela prata (Figura 11), para a averiguação da diversidade da biblioteca.

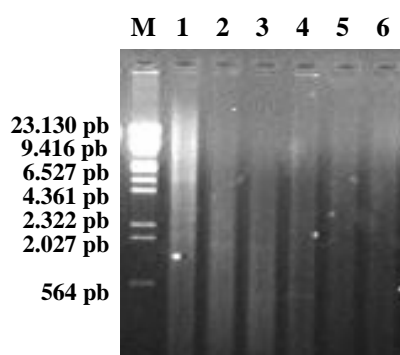


Figura 9. Análise da digestão pela *Rsa* I por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular DNA lambda/Hind III. C: cDNA controle. D: cDNA *driver*. T: cDNA *tester*. c: cDNA controle digerido pela enzima de restrição *Rsa* I. d: cDNA *driver* digerido pela enzima de restrição *Rsa* I. t: cDNA *tester* digerido pela enzima de restrição *Rsa* I.

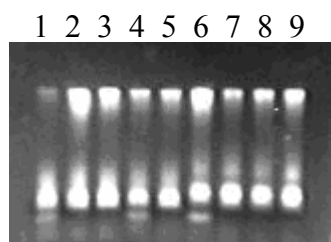


Figura 10. Análise dos produtos amplificados pelas reações de Nested-PCR por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. 1-5: Nested-PCR *forward*. 6-9: Nested-PCR *reverse*.

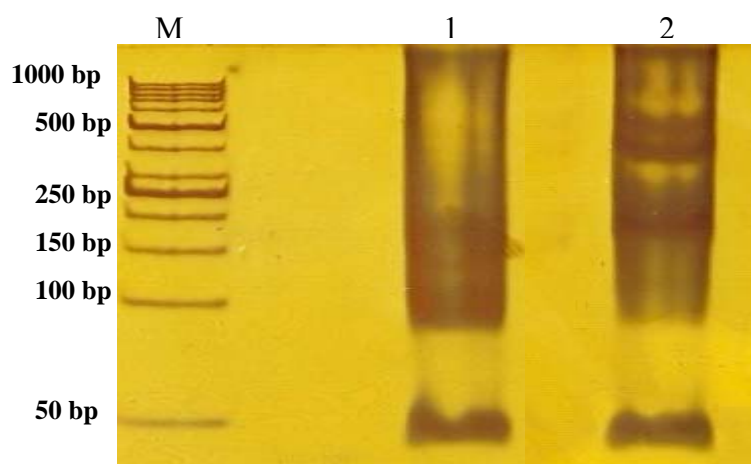


Figura 11. Análise dos produtos amplificados pelas reações de Nested-PCR por eletroforese em gel de acrilamida 6 % corado pela prata. M: marcador de peso molecular 50 pb (FERMENTAS). 1: Nested-PCR *forward*. 2: Nested-PCR *reverse*.

A partir dos produtos amplificados nas reações Nested-PCR foi feita a clonagem da biblioteca. Dessa clonagem, 1.800 colônias foram analisadas por PCR de colônia quanto à presença de inserto e, logo, observou-se a baixa complexidade da biblioteca, uma vez que somente foram identificadas bandas de 100 a 350 pb (Figura 12). Cento e oito clones da biblioteca, de ambas as direções (*forward* e *reverse*), foram selecionados de forma aleatória e foram seqüenciados. As análises revelaram a presença de seqüências somente desconhecidas que não alinharam com nenhuma seqüência presente no NCBI, além da constatação de uma contaminação durante a clonagem por *Leishmania spp.*. Dessa maneira, esses clones foram descartados.

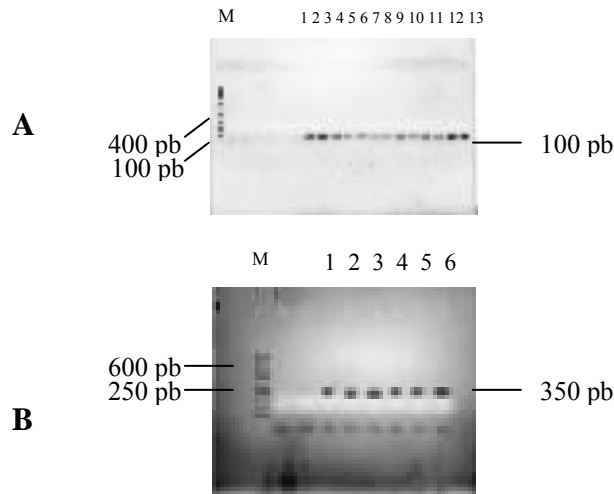


Figura 12. Análise da reação de PCR, feita a partir de colônias contendo produtos da hibridização subtrativa, por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. A – M: marcador de peso molecular 100 pb; 1-13: produtos amplificados a partir de colônias diferentes. B – M: marcador de peso molecular 50 pb; 1-6: produtos amplificados a partir de colônias diferentes.

Uma nova clonagem dos produtos da biblioteca está sendo conduzida para que, dessa forma, possam ser identificados os genes reprimidos e super-induzidos na célula VERO, 8 horas após a infecção pelo IBDV.

Em decorrência dos produtos da hibridização ainda não terem sido avaliados, não temos a confirmação se essas bibliotecas construídas estão de fato enriquecidas para genes diferencialmente expressos. Com isso, não é possível avaliar se no tempo de infecção utilizado neste estudo (8 h.p.i.) existe grande diversidade de produtos diferencialmente expressos. Os eventos da replicação do IBDV são bem determinados, porém o tempo exato em que ocorrem, em determinada célula hospedeira, ainda é desconhecido. Para que possamos determinar o pico de expressão gênica desencadeado pela infecção viral, a quantidade de RNA presente em cada etapa do ciclo do IBDV deve ser determinada.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A comparação de seqüências nucleotídicas de parte da região hipervariável do gene que codifica a proteína do capsídeo viral VP2, revelou que esses isolados de IBDV possuem alta identidade com cepas clássicas utilizadas na fabricação de vacinas atenuadas.
- ✓ Esses resultados indicam que amostras vacinais atenuadas por baixas passagens podem ter sido responsáveis pelos surtos nos quais os isolados foram obtidos. A diferença de patogenicidade dos dois isolados pode estar relacionada com alguma mutação em regiões genômicas não analisadas neste estudo, como a região que codifica a proteína viral VP1, diretamente relacionada com a virulência do IBDV.
- ✓ A técnica de hibridização subtrativa pode ser utilizada em células VERO infectadas pelo IBDV com a finalidade de estudar os mecanismos de interação vírus-célula hospedeira.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ A caracterização molecular de outros IBDVs isolados de surtos ocorridos no estado de Minas Gerais, bem como de isolados no Brasil, deve ser uma ferramenta difusamente utilizada para elucidar a real causa dos surtos e, dessa forma, formular melhores programas de vacinação, visando a prevenção e o controle da doença.
- ✓ A análise da seqüência completa do segmento B (VP1) do isolado LVMA0604 analisado neste estudo será necessária para uma melhor compreensão de seus determinantes moleculares de virulência.
- ✓ A análise da seqüência completa do genoma de isolados de IBDV permitirá relacionar suas características moleculares com sua patogenicidade. Dessa forma, será possível proporcionar a produção de novos imunobiológicos assim como permitir a criação de um programa de vacinação mais eficiente.
- ✓ A análise completa dos produtos das bibliotecas construídas, *forward* e *reverse*, e ainda a validação dos genes diferencialmente expressos serão conduzidas, em seguimento deste trabalho, no Laboratório de Virologia Molecular Animal, situado no BIOAGRO/UFV, para que melhor se compreenda a interação IBDV - célula hospedeira.
- ✓ O conhecimento das características replicativas do IBDV associado ao estudo das conseqüências da infecção pelo vírus na expressão gênica da célula hospedeira, iniciado com este trabalho, permitirá elucidar os mecanismos envolvidos nessa interação, para futuramente propor métodos mais eficazes no controle e prevenção da IBD.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AZAD, A.A.; JAGADISH, M.N.; BROWN, M.A; HUDSON, P.J., 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Viol.*, 161, 145-152.
- BANDA, A; VILLEGAS, P., 2004. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.*, 48, 504-549.
- BARRIOS, P.R., 2005. Comparação patogênica e molecular de isolados do vírus da doença infecciosa bursal. (Dissertação de mestrado) Viçosa, Microbiologia Agrícola, UFV, 40p.
- BAYLISS, C.D.; SPIES, U.; SHAW, K.; PETERS, R.W.; PAPAGEORGIOU, A.; MULLER, H.; BOURSNEILL, M.E.G., 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.*, 71, 1303-1312.
- BOOT, H.J.; TER HUURNE, A.A.H.M.; PEETERS, B.P.H.; GIELKENS, A.L.J., 1999. Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. *Viol.*, 265, 330-341.
- BOOT, H.J.; TER HUURNE, A.A.H.M.; PEETERS, B.P.H., 2000. Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of Infectious Bursal Disease virus. *J. Virol. Methods*, 84, 49-58.
- BROWN, M.D.; GREEN, P.; SKINNER, M.A., 1994. VP2 sequences of recent European "very virulent" isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of "classical" strains. *J. Gen. Virol.*, 75, 675-680.
- BROWN, M.D. & SKINNER, M.A., 1996. Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, 40, 1-15.
- CHEN, X., CHEN Z., YAO, H., CHEN, F., ZHU, H., ZHOU, H., 2005. Construction and characterization of a cDNA library from human liver tissue with chronic hepatitis B. *J. Zhej. Univ. Sci.* 6B(4), 288-294.

- CHEVALIER, C., LEPAULT, J., ERK, I., DA COSTA, B., DELMANS, B., 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.*, 76(5), 2384-2392.
- DENG, X., GAO, Y., GAO, H., QI, X., CHENG, Y., WANG, X., WANG, X., 2007. Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, 129(1), 35-42.
- DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I.; ETERRADOSSI, N., 1999. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brasil. *Vet. Rec.*, 145, 203-204.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y.C., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E., SIEBERT, P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 6025-6030.
- DOBOS, P.; BERTHIAUME, L.; LEONG, J.A.; KIBENGE, K.S.B.; MULLER, H.; NICHOLSON, B.L., 1995a. Family *Birnaviridae*. In: "Virus Taxonomy", Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, New York, 1995, 240-244.
- DOBOS, P., 1995b. Protein-primed RNA synthesis *in vitro* by the virion associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 208, 19-25.
- IKUTA, N., EL-ATTRACHE, J., VILLEGAS, P., GARCIA, E.M., LUNGE, V.R., FONSECA, A.S., OLIVEIRA, C., MARQUES, E.K., 2001. Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, 45, 297-306.
- JACKWOOD, D.H. & SAIF, Y.M., 1987. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, 31, 766-770.
- JACKWOOD, D.J. & SOMMER, S.E., 1999. Restriction fragment polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis.*, 43(2), 310-314.
- JACKWOOD, D. & SOMMER-WAGNER, S., 2007. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*, 365(2), 369-375.

- KATRI, M. & SHARMA, J.M., 2006. Infectious bursal disease virus infection induces macrophage activation via p38 MAPK and NF- κ B pathways. *Virus Res.*, 118, 70:77.
- KIBENGE, F.S.B.; DHILLON, A.S.; RUSSEL, R.G. (1988). Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 69, 1757-1775.
- KIBENGE, F.S.B., NAGARAJAN, M.M., QIAN, B., 1996. Determination of the 5' and 3' terminal noncoding sequences of the bi-segmented genome of the Avibirnavirus infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.*, 141, 1133-1141.
- KIBENGE, F.S.B.; QIAN, B.; CLEGHORN, J.R.; MARTIN, C.K., 1997. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch. Virol.*, 142, 2401-2419.
- KISS, C., NISHIKAWA, J., DIECHMANN, A., TAKADA, K., KLEIN, G., SZEKELY, L., 2003. Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J. Virol. Methods*, 107, 195-203.
- LE NOUËN, C., RIVALLAN, G., TOQUIN, D., DARLU, P., MORIN, Y., BEVEN, V., BOISSESON, C., CAZABAN, C., COMTE, S., GARDIN, Y., ETERRADOSSI, N., 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.*, 87, 209-216.
- LEFFER, E.V.B., 2004. Considerações sobre o controle da doença de Gumboro. *Ave world*. S.P. Animal World, abr-mai.
- LEONG, J.C., BROWN, D., DOBOS, P., KIBENGE, F., LUDERT, J.E., MULLER, H., MUNDT, E., NICHOLSON, B., 2000. Birnaviridae. In: M.H.V. Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (Eds.), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Academic Press, ISBN 0-12-370200-3, 481-490.
- LIU, H.J.; HUANG, P.H.; WU, Y.H.; LIN, M.Y.; LIAO, M.H., 2001. Molecular characterization of very virulent infectious bursal disease viruses in Taiwan. *Res. Vet. Sci.*, 70, 139-147.
- LIU, M. & VAKHARIA, V.N., 2004. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virol.*, 330, 62-73.

- LOMBARDO, E.; MARAVER, A.; ESPINOSA, I.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; RODRIGUES, J.F., 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Viol.*, 277, 345-357.
- MACREADIE, I.; AZAD, A.A., 1993. Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 6, 1169-1178.
- MANIATIS, T., FRITSCH, F., SAMBROOK, J., 1998. Molecular Cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), NY.
- MICKAEL, C.S. & JACKWOOD, D.J., 2005. Real-time RT-PCR analysis of two epitope regions encoded by the gene of infectious bursal disease viruses. *J. Virol. Methods*, 128, 37-46.
- MULLER, H., SCHOLTISSEK, C., BENCHT, H., 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.*, 31, 584-589.
- MULLER, H.; ISLAM, M.R.; RAUE,R., 2003. Research on infectious bursal disease – the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.*, 97, 153-165.
- MUNDT, E.; BEYER, J.; MULLER, H., 1995. Identification of novel protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 76, 437-443.
- MUNDT, E. & MULLER, H., 1995. Complete nucleotide sequence of 5' and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Viol.*, 209, 10-18.
- MUNIR, S., SINGH, S., KAUR, K., KAPUR, V., 2004. Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in virus infected cells. *Biol. Proced. Online*, 6(1), 94-104.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J., 1999. Birnaviridae In: *Vet. Virol.*, Academic Press. 3. ed., 405-409.
- NAGARAJAN, M.M.; KIBENGE, F.S.B., 1997. Infectious bursal disease virus. A review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can. J. Vet. Res.*, 61(1), 81-88.

- SAIF, Y.M., 1999. Control y prevención de la enfermedad infecciosa de la bursa. In: XVI Congresso Latino-Americano de Avicultura, 1999, Lima. Peru:APA. *Anais*, 37-38.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory manual. 2ª edição. Cold Spring Harbor (CSH), NY
- SANTOS, B.M.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, V., 2005. Doenças virais de importância nas aves. CD nº13, editora UFV, 2ª ed., 71p.
- SAPATS, S.L. & IGNJATOVIC, J., 2000. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch. Virol.* 145, 773-785.
- SNYDER, D.B., LANA, D.P., CHO, B.R., MARQUARDT, W.W., 1988. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 32, 527-534.
- SNYDER, D.B., VAKHARIA, V.N. & SAVAGE, P.K., 1992. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.*, 127, 89-101.
- STEWART-BROWN, B., 1997. Análisis molecular de la infección de la bursa. Interpretación práctica. In: Congresso Latinoamericano de Avicultura, XV, Cancun, México. *Anais*, 33-34.
- TACKEN, M.G.J.; PEETERS, B.P.H.; THOMAS, A.A.M., ROTTIER, P.J.M., BOOT, H.J., 2002. Infectious Bursal Disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.*, 76(22), 11301-11311.
- TACKEN, M.G.J., VAN DEN BEUKEN, P.A.J., PEETERS, B.P.H., THOMAS, A.A.M., ROTTIER, P.J.M., BOOT, H.J., 2003. Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology*, 312, 306-319.
- VAN DEN BERG, T. P., GONZE, M. & MEULEMANS, G., 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, 20, 133:143.
- VAN DEN BERG, T.P., GODFROID, J., MORALES, D., & MEULEMANS, G., 1994. The use of HD11 macrophage cell line in the study of IBDV. *Proceedings of the International symposium on infectious bursal disease*

- and chicken infectious anaemia*, Rauschholzhausen, Germany, 133-142.
- VAN DEN BERG, T.P., GONZE, M., MORALES, D., MEULEMANS, G., 1996. Acute infectious disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, 25, 751-768.
- VAN DEN BERG, T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.*, 29, 175-194.
- VAN DEN BERG, T.P., MORALES, D., ETERRADOSSI, N., RIVALLAN, G., TOQUIN, D., RAUE, R., ZIERENBERG, K., ZHANG, M.F., ZHU, Y.P., WANG, C.Q., ZHENG, H.J., WANG, X., CHEN, C.G., LIM, B.L., MÜLLER, H., 2004. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol.*, 33(5), 470-476.
- VILLANUEVA, R.A., GALAZ, J.L., VALDÉS, J.A., JASHÉS, M.M., SANDINO, A.M., 2004. Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.*, 78(24), 13829-13838.
- WINTERFIELD, R.W.; FADLY, A.M.; BICKFORD, A., 1972. Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in chickens. Persistence of the virus and lesions. *Avian Dis.*, 16, 623-632.
- YAO, K.; GOODWIN, M.A.; VAKHARIA, V.N., 1998. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J. Virol.*, 72, 2647-2654.
- YONGWEI WEI, J.L., JIANGTAO ZHENG, H.X., LONG LI, L.Y., 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 350(2), 277-287.

9. APÊNDICE

9.1.

Tabela 1. Reação de ligação dos adaptadores.

Componentes	<i>Tester 1-1, 2-1 e 3-1*</i>	<i>Tester 1-2, 2-2 e 3-2*</i>
cDNA <i>tester</i> diluído	2 µL	2 µL
Adaptador 1 (10 µM)	2 µL	-
Adaptador 2R (10 µM)	-	2 µL
Master Mix	6 µL	6 µL
Volume final	10 µL	10 µL

* A reação foi realizada para cada cDNA *tester* experimental e para o cDNA *tester* controle.

9.2.

Tabela 2. Análise da ligação dos adaptadores.

Componentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
<i>Tester 1-1*</i>	0,5 µL	0,5 µL	-	-
<i>Tester 1-2*</i>	-	-	0,5 µL	0,5 µL
G3PDH 3' <i>Primer</i> (10 µM)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
G3PDH 5' <i>Primer</i> (10 µM)	-	1 µL	-	1 µL
PCR <i>Primer</i> 1 (10 µM)	1 µL	-	1 µL	-
Volume final	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL

* Foi realizado da mesma forma para o *Tester 2-1 e 2-2, 3-1 e 3-2*.

9.3.

Tabela 3. Reagentes utilizados no processamento da primeira hibridização.

Componentes	Amostra de hibridização	Amostra de hibridização
	<i>Tester 1-1, 1-2 e 1-3</i>	<i>Tester 1-2, 2-2 e 3-2</i>
cDNA <i>driver</i> digerido por <i>Rsa</i> I	1,5 µL	1,5 µL
<i>Tester 1-1, 1-2 e 1-3</i> ligado ao adaptador 1	1,5 µL	-
<i>Tester 1-2, 2-2 e 3-2</i> ligado ao adaptador 2R	-	1,5 µL
Tampão de hibridização 4X	1,0 µL	1,0 µL
Volume final	4,0 µL	4,0 µL

9.4. Cultivo Celular

Meio Essencial Mínimo Sigma®

MEM 1 frasco

Água Milli-Q q.s.p 1000 mL

pH 7,2; conservar a 4 °C por até 6 meses, para conservar as características físicas do meio como a cor. Vedar com parafilme e aliquotar em garrafas de vidro estéril de 90 mL.

9.5. Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

Água Milli-Q autoclavada q.s.p 5 mL

Solução II

NaOH 200 mM

SDS 1 %

Água Milli-Q autoclavada q.s.p 5 mL

Solução III

CH₃COOK pH 4,8 3 M

Ácido acético pH 4,8 2 M

Água Milli-Q autoclavada q.s.p 5 mL

Todos os reagentes deverão ser estocados a 4 °C, em frasco estéril, exceto a solução II que deverá ser preparada no momento do uso.

9.6. Primers TOPO utilizados na PCR de colônia

TOPOF: 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'

TOPOR: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

9.7. Meios de crescimento bacteriano

Meio SOB

Triptona 20 g

Extrato de levedura 5 g

NaCl 0,5 g

Água destilada q.s.p 100 mL

Autoclavar e adicionar:

KCl 0,25M filtrado 1 mL

MgSO₄ 2M filtrado 0,5 mL

NaOH 5 M autoclavado 10 µL

Meio SOC

Meio SOB acrescido de 2 mL de glicose (1 M).

Meio LB líquido

Triptona	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
NaCl	5 g
Água Milli-Q q.s.p.	500 mL

Meio LB sólido

Triptona	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
NaCl	5 g
Ágar bacteriológico	10 g
Água Milli-Q q.s.p.	500 mL

9.8. Eletroforese

9.8.1. Gel para corrida de RNA

Tampão NBC 20 X

Ácido bórico	1 M
Citrato de sódio	100 mM
NaOH	100 mM
Água Milli-Q q.s.p	1000 mL

Acertar o pH 7,5 e autoclavar.

Tampão NBC 1 X

Para 1 litro de NBC 1 X, adicionar 50 mL de NBC 20 X e completar com água Milli-Q autoclavada 2 vezes.

Gel de agarose 1,2 %

Agarose	0,24 g
NBC 1X	20 mL
Formaldeído 37 %	0,5 mL

Tampão da amostra

Formamida (1:1)

Água DEPC

Para 1 litro de água Milli-Q, adicionar 1 mL de dietilpirocabomol (DEPC) e autoclavar duas vezes.

Toda a vidraria utilizada deverá ser tratada previamente a 150 °C por 4 horas. Cuba, pentes e suportes deverão ser previamente tratados com NaOH 0,1 M e lavados com água Milli-Q autoclavada e água DEPC.

9.8.2. Gel para corrida de DNA

Tampão TBE 5 X

Tris-base	27 g
-----------	------

Ácido bórico	13,75 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	10 mL
Água Milli-Q q.s.p.	500 mL

Autoclavar.

Tampão TBE 0,5 X

Para 1 litro de TBE 0,5 X, adicionar 100 mL de TBE 5X e completar com água Milli-Q.

Gel de agarose	0,8 %	1 %	1,2 %	2 %
Agarose	0,24 g	0,3 g	0,36 g	0,6 g
TBE 0,5X q.s.p.	30 mL			

Gel de acrilamida 6 %

Componentes	10 mL
TBE 0,5 X	5,3 mL
Mix acrilamida 30 %	2,0 mL
Persulfato de amônio 10 %	0,1 mL
TEMED	0,008 mL

Tampão de corrida para DNA

6 X concentrado azul-bromofenol 0,25 %
Xilenocianol FF 0,25 %
Glicerol 30 %

9.9. Coloração de géis

9.9.1. Brometo de etídeo

Adicionar 1 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em 100 mL de tampão TBE 0,5 X.

9.9.2. Prata

Solução de fixação

Etanol 10 %
Ácido acético glacial 0,5 %

Solução de Coloração

Etanol 10 %
Ácido acético glacial 0,5 %
Nitrato de prata 12 mM

Solução de desenvolvimento

NaOH 0,75 M
Formaldeído 37 % a 2,6 µL/mL