

LUCIANA HELENA ANTONIASSI DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ADENOVÍRUS
RECOMBINANTES EXPRESSANDO AS GLICOPROTEÍNAS
F E G DO METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO (aMPV) E DO
VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (bRSV)**

CAMPINAS

Unicamp

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCIANA HELENA ANTONIASSI DA SILVA

“DESENVOLVIMENTO DE ADENOVÍRUS RECOMBINANTES EXPRESSANDO AS GLICOPROTEÍNAS F E G DO METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO (aMPV) E DO VÍRUS RESPORATÓRIO SINCICIAL BOVINO (bRSV)”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luciana Helena Antonias
da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de estra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS
Coorientador: Prof. Dr. FERNANDO ROSADO SPILKI

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Sl38d	<p>Silva, Luclana Helena Antonlassi da, 1977- Desenvolvimento de adenovirus recombinantes expressando as glicoproteínas F e G do metapneumovirus aviário (aMPV) e do virus respiratório sincicial bovino (bRSV) / Luclana Helena Antonlassi da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Clarice Wels Ams. Coorientador: Fernando Rosado Spilki. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Metapneumovirus aviário. 2. Virus respiratório sincicial bovino. 3. Adenovirus humanos. 4. Glicoproteínas. 5. Vacinas recombinantes. I. Ams, Clarice Wels, 1956-. II. Spilki, Fernando Rosado. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Development of recombinant adenoviruses expressing the F and G glycoproteins of avian metapneumovirus (aMPV) and bovine respiratory syncytial virus (bRSV)

Palavras-chave em Inglês:

Avian metapneumovirus

Bovine respiratory syncytial virus

Human adenovirus

Glycoproteins

Recombinant vaccines

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Wels Ams [Orientador]

Liana Maria Cardoso Verinaud

Sandra Martha Gomes Dias

Edison Luis Durigon

Bergmann Morais Ribeiro

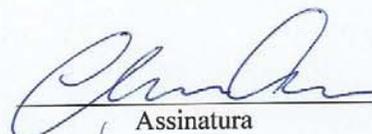
Data da defesa: 22-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

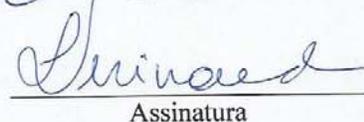
Campinas, 22 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

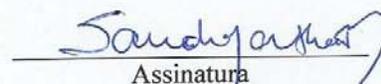
Profa. Dra. Clarice Weis Arns (orientadora)


Assinatura

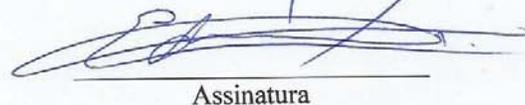
Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud


Assinatura

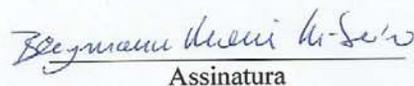
Dra. Sandra Martha Gomes Dias


Assinatura

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon


Assinatura

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro


Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Assinatura

Prof. Dr. Joao Pessoa Araujo Junior

Assinatura

DEDICATÓRIA

Para minha querida mãe

AGRADECIMENTOS

Mãe, mais uma conquista! Mas está foi muito árdua, pois foram longos os caminhos percorridos. Mas hoje percebo como foram bons estes caminhos, neste percurso aprendi tantas coisas, aprendi que sozinha eu consigo chegar onde desejo e que a cada obstáculo que encontramos no caminho, é para fortalecer e não desistir do sonho.

Ao meu querido pai (in memoriam), sempre vou lembrar com muita saudade das suas palavras, “tenha sempre amigos, assim você terá uma vida repleta de pessoas queridas a sua volta”.

A minha tia Marta, meu exemplo, de conquista, perseverança, paciência e doçura.

Ao vô José Casado, por ser esse vô maravilhoso!

À minha querida orientadora Profa Dra Clarice, pela confiança depositada em mim, nesse projeto tão ousado para o laboratório. Clarice, eu sei que não foi fácil este meu doutorado, eu acredito que te deixei muitas vezes preocupada. Mas lembre-se que sempre serei muito grata por acreditar em mim.

Agradeço a você Clarice, pela oportunidade concebida de conhecer outro País, outro Laboratório de Pesquisa, outra Cultura, aperfeiçoar o Idioma e de Aprender sempre!

As pessoas queridas que encontrei na minha temporada nos Estados Unidos, numa cidadezinha chamada “Athens”. Lá conheci pessoas incríveis e maravilhosas.

Agradeço ao Dr. Cláudio Afonso por me receber em seu laboratório, a Dra Patti Miller, Stivalis, Dawn, Dr. Yu, Mariana Sá e Silva e Diego Diel e as pessoas que convivi no Southeast Poultry Research Laboratory.

Quero agradecer a Profa Dra Corrie Brown, por me acolher na sua casa e na Universidade da Geórgia (UGA).

Pelos amigos queridos que vou lembrar com muito carinho e saudade: Diego, Camila e o fofo Bernardo Diel, Mariana Sá e Silva, Larissa Paula, Maria Teixeira, Monique Franca e Ana Carolina Chagas.

Ao meu querido co-orientador Prof. Dr. Fernando Spilki.

A minha mãe postiça Maria Ângela Orsi, pelas nossas aventuras nos EUA (eu vou lembrar com muito carinho) e pelo seu incentivo comigo por sua determinação e coragem. Mazinha pela sua ajuda com as aves, a troca de experiências, às conversas de incentivo e as boas gargalhadas com você!

Aos amigos do laboratório: Profa Dra Márcia, Matheus, Marina, Bianca, Juliana, Ana, Ricardo e Leonardo, pela paciência e pelos bons momentos no Laboratório.

Lu Konh, Paula, Paulinho (do meu coração), e Geneci pelas boas conversas!

A querida e meu anjinho Ana Paula Dalla Costa.

As pessoas queridas do Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Brocchi, a começar pelo professor Brocchi muito obrigada pela disponibilidade e a disposição de me ajudar e de abrir o seu Laboratório para trabalhar com os adenovírus recombinantes.

Agradeço os meus queridos: Bruna, Gui, Marquito, Marcela, Diego, Tamires, Meire, Jéssica, Camila os IC (a Aline), e minha querida companheira de corrida Catita (obrigada com a ajuda com os BALB/c, com os Elisás e as nossas conversas).

Agradeço aos funcionários do IB, Ana, Estelinha, Evandro e Sandra.

A Profa Dra Silvia Gatti e a Profa Dra Cristina Pontes.

A Lourdes pela paciência na secretária da pós-graduação.

A minha prima Samanta, Fabiano e a fofa Maria Luisa.

A Beatriz minha amiga querida!

Aos meus sobrinhos Leo e Edu, a tia Lu pedi mil desculpas por estar ausente, mas mil desculpas por não estar presente no dia-dia de vocês para ver como vocês cresceram.

Ao meu irmão José Luiz pelos cuidados com a mãe.

Zé e Andressa como fico feliz de ver o crescimento dos meninos, e a educação deles. Eu peço a vocês que sempre incentivem eles a ler, estudar e aprender sempre! E que vocês mostrem a eles que é importante sonhar e acreditar que podemos concretizar os nossos sonhos.

À vó Augusta, pelas suas preocupações, tias, tios, primas, primos e amigos.

*Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
pelo apoio financeiro.*

A Fundação de Desenvolvimento da Unicamp (Funcamp.)

Ao Laboratório Biovet.

*As pessoas que me ajudaram diretamente e indiretamente nesta caminhada para a
realização deste trabalho.*

*Ao meu querido Deus por colocar sempre esperanças nos momentos de aflição ou de
desânimo e de colocar pessoas maravilhosas na minha vida.*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

Deus nos fez perfeitos, e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.

Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança”.

Albert Eistein.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1- Família <i>Paramyxoviridae</i>	14
1.2. Classificação	16
1.3. Estrutura dos vírions	16
1.4. O genoma	17
1.5. A Proteína F	18
1.6. A Proteína G	20
1.7- Replicação viral	23
2.1. O metapneumovírus aviário	24
2.2. Epidemiologia	25
2.3. Sinais Clínicos	27
2.4. Perdas econômicas	28
2.5. Controle	28
2.6. Proteção vacinal	29
3.1. O Vírus respiratório sincicial bovino	31
3.2. Epidemiologia	32
3.3. Sinais Clínicos	33
3.4. Perdas econômicas	34

3.5. Controle.....	34
3.6. Proteção vacinal	34
4.1. Os vetores adenovirais	35
4.2. Os Ad5 infectam células de galinhas	38
2- OBJETIVOS.....	41
2.1- Objetivos gerais.....	41
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4- RESULTADOS.....	60
5- DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÃO GERAL.....	86
ANEXOS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

Os membros da família *Paramyxoviridae* são vírus que causam infecções em humanos e animais de importância econômica global. Entre os membros desta família incluem patógenos de importância mundial para os humanos, como o vírus respiratório sincicial humano (hRSV), o metapneumovírus humano (hMPV) e vírus de importância em Medicina Veterinária, como o vírus respiratório sincicial bovino (bRSV) e o metapneumovírus aviário (aMPV). Os membros da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* são vírus envelopados, não-segmentados dotados de genoma de RNA de fita simples com sentido negativo.

Na primeira parte do estudo, desenvolvemos um adenovírus recombinante expressando a proteína F do aMPV. A expressão da proteína F foi determinada por *Western Blot*. Os níveis de transcrição do gene F foram avaliados por RT-PCR em tempo real, em células HEK-293 e células HEP-2. Foi realizada a imunização experimental de Ad-aMPV-F e foi analisada a indução de resposta de anticorpos em camundongas BALB/c. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram detectados após a imunização com Ad-aMPV-F.

Na segunda parte do trabalho o objetivo foi a construção de adenovírus recombinantes expressando a proteína F do bRSV. A proteína F parece ser um antígeno ideal para fins de diagnóstico. Utilizando anticorpo anti-V-5, uma banda de ~90 kDa foi detectada no sobrenadante de cultura de células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F.

Na terceira parte do estudo, o objetivo foi a construção de dois vetores adenovirais expressando as proteínas G do aMPV e bRSV, a expressão destas proteínas em células HEK-293 infectadas foram analisadas pela expressão do gene repórter, da proteína verde fluorescente (GFP).

The members of the family *Paramyxoviridae* are viruses that cause infectious in human and animals of importance to global economics. Among the member of this family include pathogens of importance global for humans such as human respiratory syncytial virus (hRSV), the human and metapneumovirus (hMPV) and of viruses importance in veterinary medicine, such as bovine respiratory syncytial virus (bRSV) and avian metapnemovirus (aMPV). The members of the *Paramyxoviridae* are enveloped, non-segmented viruses, with negative-sense single stranded genomes.

In the first part of the study, we developed a recombinant adenovirus expressing the F protein of AMPV. The expression of F gene was determined by *Western Blot*. The levels of transcription were evaluated by RT-PCR in real time in HEK-293 cells and HEP-2 cells. Immunization experiment was carried out Ad-AMPV-F was analyzed and the induction of antibody response in BALB/c mice. The neutralizing antibody titers detected after immunization with Ad-AMPV-F.

In the second part, the objective was to construct recombinant adenoviruses expressing the F protein of bRSV. Protein F appears to be an ideal antigen for diagnostic purposes. Using the anti-antibody AdV-5, a single band of ~ 90 kDa was detected in the culture supernatant in 293 cells infected with Ad-bRSV-F.

In the third part of the study, the objective was to build two adenoviral vectors expressing the G protein of aMPV and bRSV and the expression of these proteins in infected HEK-293 cells were analyzed for expression of the reporter gene, green fluorescent protein (GFP).

1.1. Família *Paramyxoviridae*

Os membros da família *Paramyxoviridae* são vírus que causam infecções em humanos e animais de importância econômica global (CHANG & DUTCH, 2012). Entre os membros desta família incluem patógenos altamente contagiosos e de importância mundial para os humanos, como os vírus do sarampo (MeV), da caxumba (MuV), o vírus respiratório sincicial humano (hRSV), o metapneumovírus humano (hMPV), e os vírus de potencial zoonóticos Hendra (HeV) e Nipah (NiV) (CHANG & DUTCH, 2012).

Os paramixovírus são responsáveis por algumas doenças de grande importância em Medicina Veterinária, pela sua prevalência e pelo impacto econômico na produção animal. São vírus que causam doenças em várias espécies, como o vírus respiratório sincicial bovino (bRSV), ovino (oRSV), o vírus da pneumonia murina (MPV), o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPiv-3), o vírus da cinomose canina (CV), o vírus da peste bovina (Rinderpest virus, RPV) e os vírus aviários, metapneumovírus aviário (aMPV) e o vírus da doença de Newcastle (NDV) (LE BAYON *et al.*, 2013).

Análises filogenéticas (Figura 1) distinguem esta família em duas subfamílias: a subfamília *Paramyxovirinae* que inclui cinco gêneros: *Rubulavirus* (MuV, PIV5), *Avulavirus* (NDV), *Respirovirus* (SeV, hPIV3), *Henipavirus* (HeV, NiV) e *Morbillivirus* (MeV); e a subfamília *Pneumovirinae* no qual incluem dois gêneros os *Pneumovirus* (hRSV, bRSV) e *Metapneumovirus* (hMPV, aMPV) (LE BAYON *et al.*, 2013).

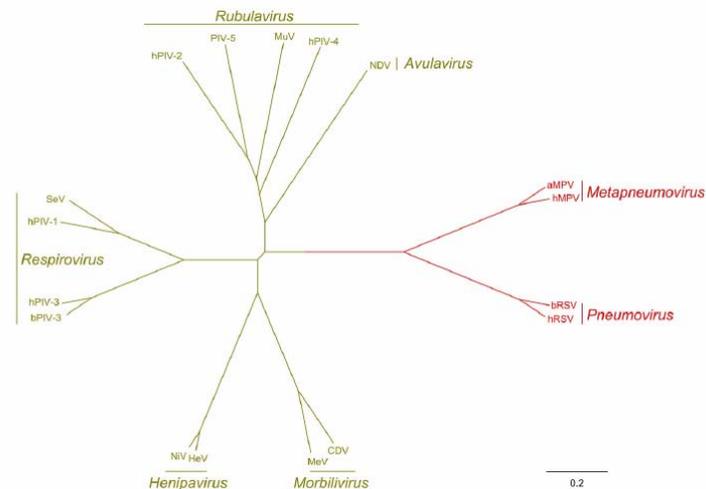


Fig. 1- Árvore Filogenética representando os membros da família *Paramyxoviridae*. A subfamília *Paramyxovirinae* que incluem os gêneros, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Henipavirus* e *Morbillivirus*. A subfamília *Pneumovirinae* inclui dois gêneros, *Pneumovirus* e *Metapneumovirus* (LE BAYON *et al.*, 2013).

O gênero *Metapneumovirus* difere do gênero *Pneumovirus* (Figura 2) na ausência das proteínas não estruturais NS1 e NS2 e na ordem dos genes F e M2 (COLLINS *et al.*, 2001). O genoma do aMPV é constituído por oito genes virais dispostos na seguinte ordem: Nucleocapsídeo - Fosfoproteína - Matriz - Glicoproteína F - Segunda Matriz - Pequena proteína hidrofóbica - Glicoproteína G e Grande polimerase (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5), flanqueado pelas sequências *leader* e *trailer* nas posições 3 e 5, respectivamente (EASTON *et al.*, 2004). Cada um destes mRNAs contém uma única fase aberta de leitura (ORF, open reading frame), exceto o gene M2, que contém as ORFs M2-1 e M2-2 (COLLINS *et al.*, 2001).

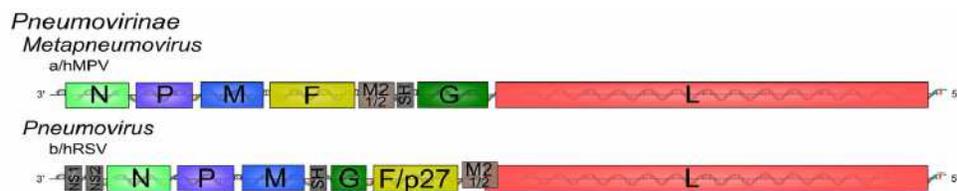


Fig. 2- Estrutura esquemática dos genomas de vírus da subfamília Pneumovirinae, gêneros Pneumovirus e Metapneumovirus. Esta ilustração compara os genes em comum nos dois gêneros indicando a ausência das proteínas não estruturais NS1 e NS2 no gênero Metapneumovirus e a ordem dos genes F e M2. Modificada de LE BAYON *et al.*, 2013. Review Medical Virology, 23(1):15-34.

1.2. Classificação

O aMPV e bRSV são membros da família *Paramyxoviridae*, são classificados na ordem Mononegavirales e subfamília *Pneumovirinae*. São vírus envelopados, não-segmentados dotados de genoma de RNA de fita simples com sentido negativo.

1.3. Estrutura dos vírions

Os membros da subfamília *Pneumovirinae* apresentam uma estrutura que consiste de um envelope lipoprotéico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (COLLINS *et al.*, 2001), um nucleocapsídeo e uma proteína de matriz. São vírus pleomórficos de tamanho variável: as partículas esféricas medem 150 a 300 nm de diâmetro; as partículas filamentosas medem entre 60 e 100 nm de diâmetro com aproximadamente 10 µm de comprimento (COLLINS *et al.*, 2001).

Sua superfície possui três glicoproteínas (Figura 3), a proteína de ligação ao receptor celular (G), a proteína de fusão (F) e a pequena proteína hidrofóbica

(*small hydrophobic*; SH). As glicoproteínas F e G estão intimamente relacionadas com a proteína de matriz (M) localizada na camada interna do envelope viral (COLLINS *et al.*, 2001; EASTON *et al.*, 2004).

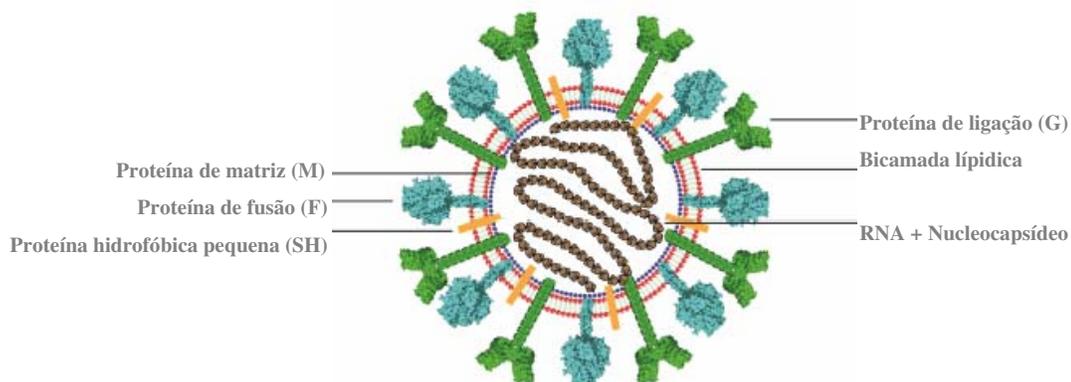


Fig. 3- Representação esquemática da partícula viral dos pneumovírus com as proteínas de matriz (M), de fusão (F), a hidrofóbica pequena (SH), de ligação (G), a bicamada lipídica, o RNA e as proteínas associadas ao nucleocapsídeo. Modificada de CHANG & DUCH (2012). *Viruses Review*, 4:613-636

1.4. O genoma

O genoma dos metapneumovírus possui aproximadamente 13.000 nucleotídeos (nt) e o genoma dos pneumovírus consiste de aproximadamente 15.000 nt. Por possuir polaridade negativa, o genoma desnudo não é infeccioso quando introduzido em células permissivas. O RNA genômico é utilizado por um lado na síntese de um mRNA, que por sua vez é traduzido em novas proteínas virais; por outro lado, ocorre a síntese de antígenomas que irão servir como moldes na síntese de um novo RNA genômico (EASTON *et al.*, 2004).

Em ambos os vírus, a transcrição do genoma se processa no sentido 3'→5'. O genoma contém sequências não-codificantes na extremidade 3' que consiste de uma região extragênica de aproximadamente 50 nt, conhecida como *leader*, onde se localiza o promotor viral havendo também uma região *trailer* com 50 a 160 nt na extremidade 5' (MINK *et al.*, 1991). Essas regiões são importantes para a transcrição e replicação do genoma.

O início de cada gene contém um sinal de 10 nt, altamente conservado 3' – CCCCGUUUA (U/C), exceto o gene L que apresenta diferenças em dois nt (negrito e sublinhado): 3' – CCCUGUUUUA, e termina com um sinal de 12 a 13 nt, semiconservado que elicia a poliadenilação e a liberação do mRNA viral completo (COLLINS *et al.*, 2001). Regiões intergênicas de 56 nt estão presentes entre os genes dos *Pneumovirus* - NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F - à exceção dos genes M2 e L, no qual o gene L sobrepõe em 68 nt o gene M2 (VALARCHER & TAYLOR, 2007). Deste modo, a sobreposição em 68 nt, é transcrita duas vezes, uma durante a síntese do mRNA M2; a segunda, durante a síntese do mRNA L (COLLINS *et al.*, 2001).

1.5. A Proteína F

A proteína F é uma glicoproteína transmembrana do tipo I (WEI *et al.*, 2012), ou seja, a sua porção de ancoragem à membrana celular está localizada na porção carboxi-terminal (localizada no citoplasma), e contém um sinal de clivagem próximo à porção amino-terminal (localizado externamente à membrana) (COLLINS *et al.*, 1996). A proteína F está inserida no envelope viral sendo responsável pela fusão, penetração e formação de sincícios, portanto determinando características estreitamente associadas ao efeito

citopático do vírus (COLLINS *et al.*, 2001). A proteína F dos pneumovírus apresenta características semelhantes com aquelas descritas em outros membros da família *Paramyxoviridae* (MORRISON, 1988; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo F0, posteriormente clivado por proteases celulares semelhantes à tripsina, no compartimento trans-Golgi, dando origem ao heterodímero F2 e F1, que consiste de subunidades protéicas ligadas por pontes dissulfeto (COLLINS *et al.*, 2001). A clivagem libera o peptídeo de fusão (₁₃₁KKRKRR₁₃₆), um fragmento hidrofóbico localizado na porção amino-terminal da subunidade F1, estando diretamente envolvido à inserção da proteína na membrana celular (ELLIS *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 2001; EARP *et al.*, 2004; RUIZ-ARGUELO *et al.*, 2004; SCHICKLI *et al.*, 2005). A subunidade F2 demonstrou-se como determinante de especificidade nas infecções por vírus respiratórios sinciciais (SCHLENDER *et al.*, 2003).

Adjacente à proteína F existem duas regiões contendo sequências repetidas de sete aminoácidos (aa) denominadas HR-N e HR-C. Estas regiões repetidas são necessárias para o processo de fusão viral (CHAMBERS, *et al.*, 1990; BUCKLAND & WILD, 1989; LAMB, 1993; VAN DEN HOOGEN *et al.*; 2002; WEI *et al.*, 2012). As regiões HR-N e HR-C são consideradas candidatos, como alvo para o desenvolvimento de drogas direcionadas contra a proteína F, inibindo a ligação de peptídeos à região HR-C e prevenindo a mudança conformacional necessária para a fusão do envelope viral à membrana celular (LAMBERT *et al.*, 1996).

A proteína F também interage com uma proteína da família Ras chamada RhoA (PASTEY *et al.*, 1999). RhoA é uma pequena GTPase que possui inúmeras funções biológicas, tais como: secreção de interleucinas (IL), especificamente IL-1 β ; IL-6 e IL-8;

interferência com a reorganização da actina no citoesqueleto; modulação da expressão gênica; alterações na morfologia, mobilidade e proliferação celular (NARUMIYA, 1996; PASTEY *et al.*, 1999).

1.6. A Proteína G

A proteína G foi identificada como a principal responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira, pela observação de que anticorpos específicos contra a mesma inibem esse processo (LEVINE *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 2001). A proteína G é análoga às proteínas hemaglutinina (H) e neuroaminidase (N) presentes em membros da subfamília *Paramyxoviridae*, porém não possui ação hemaglutinante ou neuramínica (COLLINS *et al.*, 2001). A glicoproteína G é uma proteína transmembrana do tipo II, ou seja, a mesma possui uma região hidrofóbica localizada próxima a sua porção amino-terminal, sendo esta localizada no citoplasma, enquanto seu fragmento carboxi-terminal permanece exposto externamente à membrana (LANGEDIJK *et al.*, 1998). A massa molecular da proteína G estimado é de 32 kDa, aumentando para 90 kDa na sua forma madura devido à intensa glicosilação do tipo *mucin-like* (ligação de glicídios por ligações glicosídicas do tipo O), existente nas regiões amino e carboxi-terminal da proteína (COLLINS *et al.*, 2001; HACKING & HULL, 2002). O ectodomínio é altamente variável, sendo rico em serina, treonina, prolina e potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações glicosídicas *mucin-like* e tipo N. As regiões *mucin-like* são separadas por uma região conservada de 13 aa (164 a 176) incluindo quatro resíduos de cisteína (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸², C¹⁸⁶) e são conservados em praticamente todas as amostras do hRSV (COLLINS *et al.*, 2001; HACKING & HULL, 2002). A proteína G não é essencial à replicação viral *in*

vitro; todavia, a mesma parece desempenhar importante papel na infecção *in vivo* (KARGER *et al.*, 2001).

A proteína SH é somente encontrada em alguns paramixovírus, como os vírus da caxumba, o parainfluenza do tipo 5, os pneumovírus e os metapneumovírus de importância para os humanos e animais (DENG *et al.*, 2012).

A proteína SH é uma proteína pequena, integral de membrana, inserida no envelope viral, sua região C-terminal é voltada ao compartimento interno do envelope, correspondente à face citoplasmática da membrana (COLLINS *et al.*, 2001). A mesma pode ser encontrada em quatro formas diferentes: SH₀, SH_G, SH_P e SH_T (COLLINS *et al.*, 2001). Tais conformações, exceto SH_T, são encontradas nas células infectadas associadas entre si na forma de oligômeros (PEREZ *et al.*, 1997), os quais se acumulam nas membranas do complexo de Golgi formando estruturas do tipo *lipid-raft* e a expressão de tais proteínas é capaz de alterar a permeabilidade de membrana. A função exata da proteína SH ainda permanece desconhecida; entretanto, a expressão da mesma em sistemas heterólogos induz a um desequilíbrio osmótico na célula que a expressa, sugerindo que a proteína SH forme canais de membrana, modificando também as propriedades do complexo de Golgi (RIXON *et al.*, 2004).

A proteína de matriz (M) é uma proteína pequena não-glicosilada, interna à partícula viral, sendo composta por 256 aa (COLLINS *et al.*, 2001). A proteína M tem como função promover a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral nascente (GHILDYAL *et al.*, 2002; EASTON *et al.*, 2004). A proteína possui um domínio hidrofóbico localizado na porção C-terminal da molécula, este domínio é responsável pela interação da mesma com membranas da célula hospedeira (GHILDYAL *et al.*, 2006).

As proteínas N, P e L são proteínas do nucleocapsídeo viral. A proteína N se liga fortemente ao RNA genômico e antígenômico na formação do nucleocapsídeo resistente a RNAses (COLLINS et al., 2001). A proteína N do hRSV possui alto nível de identidade com aquela encontrada em outros membros do gênero *Pneumovirus*, tais como o vírus da Pneumonia dos camundongos (BARR et al., 1991). A proteína possui regiões específicas na sua sequência de aa que apresentam identidade com as proteínas homólogas do aMPV e hMPV (LI et al., 1996; VAN DEN HOOGEN et al., 2002; EASTON et al., 2004).

A proteína P é uma fosfoproteína que atua como chaperonina para a forma solúvel da proteína N (COLLINS et al., 2001). A fosforilação da proteína P se deve ao alto teor de serina, constituindo aproximadamente 80% dos 241 aa (COLLINS et al., 2001). É aceito que a proteína P também atue como co-fator para a polimerase viral após sua fosforilação (COLLINS et al., 2001). Na ausência de fosforilação da proteína P, a polimerase produz uma série de curtos oligonucleotídeos a partir da extremidade 3' do genoma sugerindo que a proteína P funcional é necessária para converter a polimerase em um complexo estável (COLLINS et al., 2001). A proteína L é a polimerase viral, componente do complexo RNA polimerase RNA – dependente; a proteína possui 2.165 aa constituintes no hRSV e 2.000 aa constituintes para o hMPV (RANDHAWA et al., 1996; VAN DEN HOOGEN et al., 2001).

As proteínas N, P e L são responsáveis e suficientes para a replicação do RNA viral, requerendo a associação da proteína M2-1 (COLLINS et al., 2001). A proteína M2-1 funciona como um fator de alongação durante o processo de transcrição viral

(COLLINS et al., 2001). A proteína M2-2 tem como função a regulação da síntese do RNA viral (COLLINS et al., 2001).

As proteínas não-estruturais NS1 e NS2 estão presentes somente nos membros do gênero *Pneumovirus*. O papel destas proteínas é de inibir a ação dos interferons (IFNs) alfa (α) e beta (β) pela célula hospedeira, por meio do bloqueio da ativação do fator regulatório 3 dos IFNs, e de inibir a expressão de Stat2, diminuindo a resposta da célula à ação dos IFNs (VALARCHER et al., 2003).

1.7. Replicação viral

A adsorção desses vírus à célula é mediada pela ligação da proteína G a receptores celulares. Após a ligação da proteína G, a proteína F promove a fusão do envelope viral à membrana celular da célula hospedeira através de um mecanismo no qual se envolve principalmente a porção hidrofóbica amino-terminal de F1. O processo de fusão introduz o nucleocapsídeo viral dentro do citoplasma da célula hospedeira. A replicação se inicia com a transcrição do genoma viral pela polimerase (COLLINS *et al.*, 2001). Os genes são transcritos de forma sequencial a partir da extremidade 3', onde se localiza o promotor viral, terminando e reiniciando a cada uma das junções intergênicas. A expressão de cada mRNA está relacionada com a posição do gene no sentido 3'→5', ocorrendo um maior acúmulo dos mRNAs, quanto mais próximos se encontram do promotor viral (COLLINS *et al.*, 2001; KREMPL *et al.*, 2002). Na junção entre a região intergênica não-transcrita e o gene seguinte, o complexo polimerase reinicia a transcrição, pelo reconhecimento de sítios indutores da replicação que estão presentes na região inicial de cada gene. Durante o processo de transcrição ocorre a síntese de mRNAs antigenômicos, que são cópias

complementares completas do genoma viral, com adição de um sítio CAP na extremidade 5'. Durante a atividade antiterminação durante o processo de transcrição, ocasionalmente acontece uma falha do complexo RNA polimerase em reconhecer o sinal de terminação dos genes localizados mais próximo à extremidade 5', no que pode resultar no acúmulo de mRNAs próximos à extremidade 3' (EASTON *et al.*, 2004). Os antigenomas (genoma viral intermediário positivo) são 10 a 20 vezes menos abundantes no citoplasma de uma célula infectada que o genoma viral propriamente dito (COLLINS *et al.*, 2001).

A montagem dos nucleocapsídeos acontece no citoplasma, sendo que a mesma acontece em etapas distintas. Primeiramente ocorre com a associação da proteína N aos genomas ou antigenomas, formando o complexo ribonucleoproteína (RNP) subsequente às proteínas P e L se associam ao complexo formando o nucleocapsídeo. A proteína M direciona os nucleocapsídeos as regiões da membrana celular onde se localizam as glicoproteínas virais, já modificadas durante o seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O nucleocapsídeo alcança a superfície viral realizando então o processo de brotamento da partícula viral, com a liberação do vírus, no qual este adquire o envelope protéico na superfície da célula hospedeira (WECHSLER *et al.*, 1985; KINGSBURY, 1990).

2.1. O metapneumovírus aviário

O aMPV é reconhecido como um dos principais patógenos de doenças respiratórias em aves, é o agente etiológico da Rinotraqueíte dos perus (TRT, do inglês *Turkey rhinotracheitis*) e está associado à Síndrome da cabeça inchada (SHS, do inglês *Swollen head syndrom*) em aves comerciais (DANI *et al.*, 1999; DENG *et al.*, 2012). O vírus causa

uma doença aguda e altamente contagiosa, que afeta o trato respiratório de aves comerciais e populações de aves silvestres com distribuição mundial (MUNIR & KAPUR, 2003).

2.2. Epidemiologia

Os primeiros relatos da presença do aMPV em produções avícolas de galinhas e perus foram realizados no final dos anos 70, na África do Sul (BUYS & DU PREEZ, 1980a; DU PREEZ *et al.*, 1989b). Logo após foram relatados casos em frangos na Espanha (DIAZ DE ESPADA & PERONA, 1984), em galinhas e galinhas d'Angola na França (DROUIN *et al.*, 1985) em frangos de corte na Inglaterra (O'BRIEN, 1985; WYETH, *et al.*, 1987), em poedeiras e matrizes na Holanda (GOREN, 1985), e em matrizes em Israel (PERELMAN, *et al.*, 1988).

Sorologia positiva para o aMPV também foi descrita no Chile e América Central (JONES, 1996; TORO, *et al.*, 1998), em avestruzes no Zimbábue (CADMAN, *et al.*, 1994) e em gaivotas no mar Báltico (HEFFELS-REDMANN, *et al.*, 1998). Nos EUA, as primeiras confirmações de surtos por estes vírus ocorreram em perus, em 1997 (SEAL, 1998). No Brasil, seu isolamento foi realizado a partir de material proveniente de matrizes antes da introdução da vacina no país (ARNS & HAFEZ, 1995).

Embora não existam dados disponíveis sobre a circulação do aMPV em diversas áreas geográficas, dois países se declararam como livres destes vírus: Austrália (BELL & ALEXANDER, 1990) e Canadá (HECKERT & MYERS, 1993).

A disseminação viral da África para Europa e o seu primeiro aparecimento na costa leste da Inglaterra sugere que as aves migratórias desempenham um papel importante na transmissão global do aMPV (STUART, 1989). Esta hipótese é corroborada pelo

aparecimento do vírus em Minnesota, EUA, onde há uma grande população de aves migratórias (ANON, 1998).

Inicialmente, acreditava-se que havia apenas um sorotipo de aMPV, contendo dois subtipos A e B diferenciados pela análise da sequências de nt ou utilizando anticorpos monoclonais (COLLINS *et al.*, 1993). Entretanto, o surgimento de um diferente tipo de aMPV nos Estados Unidos, designado como subtipo C, mudou essa situação (COOK, 1999). Além disso, há um quarto subtipo encontrado na França, uma estirpe de aMPV geneticamente distinta dos subtipos A, B e C referida como tipo D (BÄYON-AUBOYER *et al.*, 2000). Até o ano de 2005, todos os isolados brasileiros existentes foram descritos como similares ao isolado europeu CVL14/1 (ARNS & HAFEZ, 1995; DANI *et al.*, 1999; D'ARCE *et al.*, 2005) e, portanto, se enquadram no subtipo A descrito por JUHASZ & EASTON (1994). A evidência da presença do subtipo B no Brasil foi relatada por CHACÓN, *et al.* (2007) em isolados no Estado de São Paulo, sendo observados problemas respiratórios e na produção de ovos em aves comerciais.

As infecções envolvendo os aMPV dos subtipos A, B e C em espécies de aves diferentes dos perus e das galinhas, foi relatado por CATELLI *et al.* (2001), no qual encontraram anticorpos em faisões de criações comerciais e de vida livre reativos aos subtipos A e B. O subtipo C tem sido encontrado em uma grande variedade de espécies de aves não domésticas, como pombas, ganso canadense, gansos da neve, marrecos de asas azuis, pardais e gaivotas (SHIN *et al.*, 2000; BENNETT *et al.*, 2002; BENNETT *et al.*, 2004; TURPIN *et al.*, 2008). Em análises filogenéticas de diferentes fragmentos do genoma o aMPV C se demonstra mais relacionado ao hMPV do que aos demais subtipos do aMPV (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002).

FELIPPE *et al.* (2011) relatou em seu estudo a presença do aMPV dos subtipos A e B a partir de material proveniente de espécies de aves selvagens, pombos selvagens de espécimes diferentes de *Columba livia* e de aves comerciais de diferentes regiões do Brasil. Os subtipos A e B do aMPV tem sido relatados na Europa, Ásia e Brasil, o subtipo C nos Estados Unidos, recentemente na França em isolados de anatídeos selvagens (TOQUIN *et al.*, 2006) e em faisões na Coreia (LEE *et al.*, 2007) e o subtipo D somente na França (CHACÓN, *et al.* 2011).

2.3. Sinais Clínicos

O aMPV causa infecção respiratória severa em perus. A enfermidade é caracterizada por espirros, estertores traqueais, edema dos seios infraorbitais, nasais e muitas vezes frontais, com descarga ocular abundante. A descarga nasal pode se tornar mucopurulenta devido à infecção bacteriana secundária. Apesar da replicação do vírus ocorrer na traquéia e pulmões, é mais limitado ao trato respiratório superior, onde as partículas virais podem ser detectadas mais facilmente (COOK, 2000).

Em poedeiras e matrizes de perus, a infecção pelo aMPV provoca queda na qualidade e na produção de ovos (STUART, 1989; COOK *et al.*, 1996). A recuperação pode ser alcançada em até três semanas, e um aumento na incidência de ovos com casca fina pode ser vista durante esse período. Peritonite por ruptura de ovos também já foi relatada (JONES *et al.*, 1988). Ainda não está esclarecido se o tecido do oviduto é susceptível à infecção pelo vírus, ou se as alterações no trato reprodutivo são causadas por efeitos sistêmicos (COOK, 2000). O vírus já foi isolado a partir de frangos e galinhas em todas as idades (PICAULT *et al.*, 1987; DU PREEZ *et al.*, 1989b).

2.4. Perdas econômicas

As doenças respiratórias são causadoras de grandes perdas econômicas na criação de aves em todo o mundo, tanto na produção de carne, quanto na produção de ovos. Tais perdas são representadas por gastos com o uso de medicamentos, aumento de mortalidade, elevação dos índices de condenação de carcaças, quedas na produção e incubabilidade de ovos férteis, diminuição da espessura da casca de ovos e diminuição da viabilidade das ninhadas.

Com a criação intensiva de aves, grandes populações vivendo em espaços confinados, a entrada de patógenos virulentos podem causar alta mortalidade e grandes perdas econômicas, em especial alguns vírus respiratórios que afetam o plantel avícola (MORLEY & THOMSON, 1984; O'BRIEN, 1985). São doenças transmissíveis consideradas de importância sócio-econômica e de relevância em tratados internacionais no comércio de animais e produtos.

2.5. Controle

As boas práticas de manejo e a biossegurança são fundamentais para o controle de surtos causados pelo aMPV, especialmente em perus. Porém somente estas medidas por si só, não controlam a infecção causada pelo vírus, indicando que uma intervenção urgente para controlar a doença em aves comerciais era necessária. A erradicação da doença normalmente não é possível, provavelmente devido ao tamanho e a complexidade da indústria avícola na maioria das áreas afetadas. Apesar disso, existe um exemplo de erradicação da doença no Estado de Minnessota-EUA, onde nenhum caso clínico ou isolamento do vírus é feito há mais de quatro anos (JONES *et al.*, 2009).

Curiosamente, enquanto na Europa considerava-se essencial vacinar 100% do lote, nos EUA resultados satisfatórios foram obtidos em lotes onde apenas duas aves em um grupo de 1000 receberam a vacina (GULATI *et al.*, 2001). Contudo, em Minnessota apenas as áreas ou granjas afetadas pela doença foram vacinadas e a administração da vacina foi cancelada assim que os surtos foram controlados. Aparentemente, em regiões onde a densidade nos lotes é baixa, a infecção por aMPV pode ser erradicada com a aplicação da vacina seguida de monitoramento cuidadoso e estrita atenção a bioseguridade (Cook, 2009; JONES, 2009).

2.6. Proteção vacinal

A utilização de vacinas vivas atenuadas através de passagens seriadas em culturas de células ou de vacinas inativadas é o principal método de controle da infecção pelo aMPV. O uso destas vacinas, se administradas cuidadosamente e corretamente, demonstram conferir excelente proteção em aves comerciais contra o aMPV (COOK, 2009). Uma única dose de vacina pode oferecer proteção aos perus durante toda a vida. Entretanto, pode ocorrer re-infecção na fase tardia da vida. Por isso, em alguns casos, os perus são revacinados depois de aproximadamente 10-12 semanas (COOK, 2000). Em frangos, a proteção é durante toda a vida e também pode ser obtida com uma única dose de vacina.

Em galinhas, as vacinas vivas contra o aMPV e o Vírus da bronquite infecciosa (VBI) devem ser administradas em momentos diferentes, devido à ocorrência de interferência na proteção contra ambas (COOK *et al.*, 2001), entretanto a vacinação

simultânea contra aMPV e o NDV, não interfere a eficácia de nenhuma das duas vacinas (GANAPATHY *et al.*, 2005).

O programa completo de vacinação composto por uma dose de vacina viva seguida de uma vacina inativada é necessário para uma proteção completa de aves adultas (COOK *et al.*, 1996). O que se observa que após a administração da vacina viva, a vacina inativada oferece uma redução dos efeitos da infecção pelo aMPV durante o período de postura. No Brasil estão disponíveis vacinas dos subtipos A e B do aMPV. As vacinas contra os subtipos A e B têm sido utilizadas com sucesso na maioria dos países afetados pela doença e oferecem boa proteção cruzada entre os dois subtipos (COOK *et al.*, 1995; ETERRADOSSI *et al.*, 1995; TOQUIN *et al.*, 1996; VAN DE ZANDE *et al.*, 2000).

Estas vacinas também oferecem proteção contra o isolado do subtipo C, porém a proteção não ocorre no sentido contrário (COOK *et al.*, 1999). Vários relatos sugerem que uma maior atenção deve ser dada ao desenvolvimento e método de administração das vacinas contra o aMPV. Por exemplo, em perus, algumas semanas após a vacinação contra o aMPV, observou-se a ocorrência de doença respiratória diagnosticada como TRT.

Segundo CATELLI *et al.* (2006) este fenômeno acontece devido à recirculação do vírus vacinal entre as aves que não receberam ou receberam uma dose inadequada da vacina, levando à reversão de sua virulência. Um estudo epidemiológico longitudinal feito em Israel revela que tanto amostras vacinais quanto amostras de campo do aMPV dos subtipos A e B podem ser detectados simultaneamente em perus (BANET-NOACH *et al.*, 2009). No Brasil (VILLARREAL *et al.*, 2009) e na Itália (CECCHINATO *et al.*, 2009) evidências a campo sugerem que as vacinas existentes no mercado podem não oferecer proteção completa (CHACÓN *et al.*, 2011) contra novas amostras circulantes do vírus. E

finalmente, na Itália o desafio de aves vacinadas com uma amostra viral recente demonstrou que a proteção é inferior à conferida para uma amostra viral isolada em 1987.

Os autores sugerem que as mudanças ocorridas em regiões antigênicas fundamentais do vírus, permitindo que este se replique e cause doença em animais vacinados (CATELLI *et al.*, 2010). As falhas no desempenho vacinal podem ser atribuídas a uma série de fatores, incluindo: atenuação exacerbada da amostra vacinal (a baixa replicação implica em incapacidade de induzir resposta imune protetora), atenuação insuficiente (com possível reversão da virulência do vírus vacinal), administração vacinal inadequada (ocorrência de falha na proteção ou reação severa) e em alguns casos, divergência genética entre as amostras vacinais e de campo (COOK, 2009; CATELLI *et al.*, 2010). As vacinas em circulação são eficazes se administradas corretamente, mas problemas relacionados à reversão de virulência podem surgir e existe evidência de possível evolução viral.

Embora estas vacinas vivas e atenuadas sejam eficazes quando administradas com precisão, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas vacinas mais seguras e eficazes e que não revertam à virulência.

A imunidade de curta duração, conferida após a infecção natural, deixa dúvidas sobre a durabilidade da proteção conferida pelas vacinas. E a necessidade de que a vacina induza imunidade protetora contra as diferentes variantes antigênicas encontradas a campo.

3.1. O vírus respiratório sincicial bovino

O bRSV foi isolado pela primeira vez em 1967 (PACCAUD & JACQUIER, 1970), o vírus apresenta distribuição mundial e causa severa doença respiratória em bovinos

jovens, caracterizada por bronquiolite e pneumonia intersticial, de forma similar à enfermidade decorrente da infecção pelo hRSV em crianças (BAKER, 1991; KIMMAN, 1993).

3.2. Epidemiologia

Independentemente da localização geográfica, taxas de infecção pelo bRSV são geralmente bastante elevada, sugerindo que a transmissão viral é um evento comum entre os rebanhos. Os bovinos são o principal reservatório de infecção, no entanto, as ovelhas também podem ser infectados (MASOT *et al.*, 2000; SARMIENTO-SILVA *et al.*, 2012).

A transmissão do bRSV, provavelmente ocorre por aerossóis por via aérea o contato direto entre animais (intra-rebanho) (LARSEN, 2000). Após a infecção natural pelo bRSV, a proteção contra reinfecções é de curta duração e as reinfecções são comuns. Em humanos as reinfecções apresentam sinais clínicos brandos, sugerindo que a severidade da doença diminui após reinfecções consecutivas (VAN DER POEL *et al.*, 1994). Em bovinos, os sinais clínicos evidentes normalmente só são observados na primeira infecção (VAN DER POEL *et al.*, 1994).

Os surtos de bRSV ocorrem geralmente durante o inverno (VALARCHER & TAYLOR, 2007). Em climas temperados, a maioria dos surtos associados ao vírus ocorre durante o outono e inverno (BIDOKHTI *et al.*, 2012). No entanto, tem sido observada infecção causada pelo bRSV durante o verão (BIDOKHTI *et al.*, 2012). Alterações climáticas podem aumentar a incidência da infecção principalmente o clima úmido e a presença de vento.

A morbidade da doença pode atingir 80 a 100% dos animais. A taxa de mortalidade observada é de aproximadamente 5 a 10%, dependendo das condições sanitárias do rebanho. No entanto a soroprevalência da infecção varia muito entre as diferentes regiões geográficas (SAA *et al.*, 2012). Os rebanhos que foram previamente expostos ao vírus tendem a ter infecções que são limitadas a animais mais jovens no qual são mais susceptíveis. Em consequência, a morbidade é geralmente elevada, durante a ocorrência de focos (RAAPERI *et al.*, 2012).

No Brasil, o bRSV foi detectado pela primeira vez por GONÇALVES *et al.* (1993), a partir de amostras de pulmões de bezerros no Estado do Rio Grande do Sul (RS). O isolamento e a caracterização ocorreram em 1995 por ARNS *et al.*, (2003), a partir de amostras de secreção naso-traqueais de animais com sintomas respiratórios procedentes do RS. Há relatos de casos de infecção por bRSV nas regiões Sudeste e Norte do país (SPILKI & ARNS, 2008). A doença em nosso país ocorre em bovinos de corte e em animais destinados à produção leiteira, envolvendo animais alojados tanto em criações extensivas quanto em condições semi-extensivas (SPILKI & ARNS, 2008).

3.3. Sinais Clínicos

A infecção primária pelo vírus induz severa doença respiratória do trato inferior em bovinos suscetíveis, tanto jovens quanto adultos. Após a infecção natural pelo bRSV, os sinais clínicos incluem apatia, anorexia, aumento de temperatura corporal (>39,5°C), descargas nasais abundantes, tosse, taquipnéia, respiração bucal e abdominal, enfisema pulmonar e subcutâneo, e acarretando na morte do animal (VERHOEFF *et al.*, 1984, DRIEMEIER *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os animais, muitas vezes, apresentam dor ao toque da parede torácica e abdominal anterior. É comum encontrá-los em posição ortopnéica, com membros torácicos e pescoço estendido para frente, respirando quase exclusivamente pela boca. Infecções bacterianas secundárias são frequentes em surtos de bRSV, bem como o isolamento concomitante de outros vírus, formando o que constitui, no hemisfério norte, no chamado Complexo da Doença Respiratória dos Bovinos (CDRB) (ELLIS *et al.*, 2001).

3.4. Perdas econômicas

O impacto da infecção causada pelo bRSV resulta para a indústria de gado em perdas econômicas devido à morbidade, mortalidade, gastos com tratamento e prevenção. Ocasionalmente, eventualmente à perda de produção e o valor da carcaça é reduzida (SARMIENTO-SILVA *et al.*, 2012).

3.5. Controle

Os programas de controle são baseados em melhorias de manejo, biossegurança, no controle do trânsito de animais e na utilização de vacinas. Apesar de a vacinação prevenir a doença e suas consequências econômicas, não garante que a circulação viral seja suprimida (mesmo que em pequenas quantidades).

3.6. Proteção vacinal

Inúmeras são as vacinas inativadas e vivas disponíveis comercialmente para o controle das infecções pelo bRSV. Estudos utilizando o desafio experimental e a campo

têm levado a resultados inconclusivos quanto à eficácia destas vacinas (VAN DONKERSGOED *et al.*, 1991; FRANKENA *et al.*, 1994; WEST *et al.*, 1999).

Recentemente, uma vacina utilizando o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) como vetor para a proteína G do bRSV diminuiu os sinais clínicos e a excreção viral após o desafio por bRSV (SCHRIJVER *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 1998). A proteína G como antígeno alvo de uma vacina de DNA também foi testada com relativo sucesso (SCHRIJVER *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 2005).

A literatura apresenta poucas informações a respeito do potencial uso imunorregulador de adjuvantes em vacinas para bRSV; assim fazem-se necessários estudos quanto ao uso potencial de adjuvantes, hoje utilizados em larga escala em outras vacinas para a espécie bovina tais como o óleo mineral e saponinas (ELLIS *et al.*, 2001; ELLIS *et al.*, 2005).

4.1. Os vetores adenovirais

Os vetores adenovirais são ferramentas versáteis na investigação da expressão e regulação gênica assim como na terapia gênica. Diversas são as vantagens para a utilização destes vetores. Uma destas vantagens inclui a incapacidade dos adenovírus de integrar o genoma da célula alvo. Sendo descritas outras vantagens como o amplo espectro de aplicações, o alto nível de expressão do gene de interesse, a capacidade de produzir altos títulos do vírus recombinante, e a capacidade de transferir o gene independente da divisão da célula (TAN *et al.*, 2006).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a construção direta ou indireta de adenovírus recombinantes (MULLAN *et al.*, 2004). Em geral, a construção direta utiliza-se

somente de uma etapa de clonagem em plasmídeo, são construções limitadas na escolha dos sítios de enzimas de restrição e são encontradas dificuldades na manipulação de grandes plasmídeos. Na construção indireta utilizam-se dois sistemas de plasmídeos, um plasmídeo do tipo *pShuttle*, contendo o cassete de expressão, e após uma segunda clonagem em um segundo plasmídeo contendo o genoma de adenovírus, usualmente com deleções dos genes promotores da transcrição E1 e E3.

O vetor de adenovírus humano sorotipo 5 (Ad5) pertencem à primeira geração, possuindo as deleções dos genes E1 e E3 (RUSSEL, 2000). Estes vetores têm a capacidade de expressar genes de até 6.5 kb (kilo base) de DNA sob um controle de um promotor heterólogo, neste sistema, o citomegalovírus (CMV). O vetor é incapaz de se replicar em células *in vitro* ou *in vivo*, a menos que a célula infectada contenha a região E1, já que este gene é indispensável para a sua replicação. As células HEK-293, que são utilizadas para a replicação do Ad5 defectivo, possui, em seu genoma a região E1 (GRAHAN *et al.*, 1977).

Devido a deleção dos genes da região E1 onde se encontram as defesas pró-apoptóticas bem como a região E3 que tem funções semelhantes, as células hospedeiras se tornam um alvo para as defesas inatas do sistema imune.

A expressão gênica dos adenovírus divide-se em duas fases: iniciais e tardias. As proteínas que são necessárias para a transcrição dos genes virais e replicação do DNA, também estão envolvidas com a interferência nos mecanismos inflamatórios e de apoptose desencadeados pelo hospedeiro.

Os produtos dos genes de expressão imediata (E1A) estão envolvidos no controle do ciclo celular, pela expressão de fatores de transcrição e de replicação. Nesta região se encontram os genes que modulam a resposta imune inata do hospedeiro e o ciclo celular

interferindo na atividade de interleucinas (IL), como o fator de necrose tumoral (TNF), na produção de moléculas de complexo de histocompatibilidade maior tipo 1 (MHC-I).

As proteínas E1A desempenham um papel importante na indução do ciclo celular, focalizando a sua ação nos reguladores principais do ciclo celular, os genes pRb e p53. A interação entre E1A e pRb resulta na dissociação dos complexos E2F-pRb e na ativação da transcrição de genes que promovem a entrada na fase S do ciclo celular. A E2F também se liga e ativa os promotores das regiões E1 e E2, o que provavelmente represente um mecanismo do vírus para coordenar a progressão do ciclo celular com a expressão gênica e replicação do DNA viral.

Nas fases iniciais da infecção, os adenovírus induzem apoptose na célula hospedeira, principalmente através de efeitos indiretos da E1A e também várias proteínas virais, como as E1B/55kDa, E1B/19kDa e E4orf6, atuam bloqueando a apoptose por vários mecanismos. A E1B e E4orf6 bloqueiam o mecanismo pró-apoptótico dependente da p53, ligando-se e inativando essa proteína. A E1B/19kDa é semelhante à proteína celular antiapoptótica Bcl-2, que se localiza na membrana mitocondrial e impede a ativação da caspase 9, uma efetora da apoptose.

A sobrevivência das células infectadas também depende da interferência com sinais de morte celular induzidos pela resposta imune. A região E3 19kDa é uma glicoproteína transmembrana que fica retida no retículo endoplasmático (RE), o seu domínio luminal se liga em moléculas do MHC-I, provocando a sua retenção no RE. Essa região também se liga no complexo TAP e o impede de transferir peptídeos ao MHC-I. O efeito destas atividades é a proteção das células infectadas do reconhecimento e lise mediada por linfócitos T citotóxicos (CTLs). Os CTLs também podem induzir lise celular,

desencadeando sinais através do receptor de *Fas*, induzindo a degradação do seu receptor. Esse complexo também inibe a lise celular pelo fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), uma citocina antiviral potente.

Um das respostas mais precoces contra infecções virais é aquela mediada pelos interferons (IFNs) α e β , que agem de forma autócrina e parácrina, induzindo um estado de resistência antiviral nas células. Os IFNs atuam por meio de seu receptor, provocando a ativação da transcrição de genes cujos os seus produtos possuem ações antivirais. E os elementos nesse mecanismo são as quinases citoplasmáticas denominadas STATs, uma vez ativadas, são translocadas para o núcleo, onde se ligam e ativam os promotores responsivos ao IFN. As proteínas E1A atuam diretamente nos mecanismos mediados pelos IFNs, ligando-se e inativando a STAT1 e, bloqueando a ativação dos genes responsáveis aos IFNs (MORAES & COSTA 2007).

Os Ad5 tem sido amplamente utilizados como vetores para o desenvolvimento de vacinas para a Medicina Veterinária. Os mesmos têm sido utilizados para os vírus da imunodeficiência felina, vírus da raiva, vírus da bronquite infecciosa, vírus da diarreia bovina, vírus parainfluenza bovino do tipo 3, herpes vírus bovino 1 e o vírus da febre aftosa (FERREIRA *et al.*, 2005, DRAPPER & HEENEY, 2009). O Ad5 tem sido usado como um vetor para febre aftosa, conferindo proteção completa em suínos contra o sorotipo A após uma única dose (MORAES *et al.*, 2002).

4.2. Os Ad5 infectam células de galinhas

O Ad5 com deleções dos genes E1/E3 foi utilizado como vetor para a expressão do gene hemaglutinina (HA) do vírus Influenza aviária (VIA) cepa A/Vietman/1203/2004, foi

testada a sua habilidade em proteger camundongos e galinhas após desafio com a amostra virulenta H5N1 (GAO *et al.*, 2006). Neste estudo a utilização de vacinas baseadas em Ad5, demonstrou uma resposta rápida na indução de imunidade protetora. As galinhas podem ser protegidas contra a cepa H5N1 por administração em ovos com vetor Ad5 contendo o gene HA (H5) em uma dose única, utilizando a administração em massa (TORO *et al.*, 2007).

A imunidade protetora contra o VIA foi demonstrada no trabalho citado acima (TORO *et al.*, 2007) e TORO *et al.*, (2008) em seu segundo trabalho utilizou vacinas administradas em ovos, demonstraram que esta metodologia pode ser utilizada em populações de aves dentro de um perfil de segurança e de uma alta resposta a uma pandemia emergente do VIA. O uso de Ad5 na imunização de aves poedeiras fornece uma barreira imunológica contra as várias cepas do VIA. Essa barreira imunológica não só poderá proteger esta importante fonte de proteína para o consumo humano, como também significativamente reduziria o risco de uma pandemia em humanos do vírus.

TANG *et al.* (2009) concluíram em seu trabalho, que o rápido e custo efetivo da produção de vacinas para VIA utilizando o vetor Ad5 em conjunto com a administração em massa é uma importante ferramenta para a imunização tanto para humanos quanto para a avicultura no caso de uma pandemia de influenza aviária (IA).

SINGH *et al.* (2010) avaliaram vacinas utilizando Ad5 o gene HA do VIA e o mesmo induziu resposta imune humoral e celular contra o vírus em galinhas. Já RAMOS *et al.* (2010) exploraram em seu estudo a possibilidade de exarcebar a resposta imune utilizando como adjuvante o gene CD154, uma glicoproteína integral de membrana do tipo II estimulador da ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), fusionada ao gene da HA do VIA.

ZESHAN *et al.* (2010) demonstraram pela primeira vez a construção de adenovírus recombinantes expressando a proteína S1 do VBI das galinhas, induzindo resposta humoral e celular, além da proteção após o desafio com cepa virulenta depois da administração em ovos.

1.1. Objetivos gerais

- Construir recombinantes adenovirais expressando as glicoproteínas F e G do aMPV e bRSV.

1. Propagação viral

A estirpe viral **SHS/669/03** isolada por D'ARCE *et al.*, 2005 (pertencente ao subtipo A do aMPV), foi replicada em células da linhagem CER (*Chicken embryo related*), gentilmente doadas por Hafez Mohamed Hafez (Institute for Poultry Diseases, Free University of Berlin, Alemanha), seguindo metodologia previamente descrita (SMITH *et al.*, 1977; COSWIG *et al.*, 2010).

A estirpe viral **bRSV-25-BR** isolada por ARNS & CAMPALANS, proveniente de casos clínicos de bRSV ocorridos no Rio Grande do Sul em 2003, foi replicada em células da linhagem CRIB (Cell resistant to the infection with BVDV), um clone de células MDBK (ATCC CRL-11883), resistente à contaminação pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (FLORES & DONIS, 1996).

As titulações da infectividade viral, foram realizadas seguindo o método recomendado por REED & MUNCH (1938).

1.2. Amplificação do gene F do aMPV e bRSV

O RNA de cultivos de aMPV e bRSV com 72 horas após a inoculação foi extraído por meio do kit de extração High Pure Viral Nucleic Acid Extraction Kit® (Roche Diagnostics, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

O RNA viral dos vírus foram convertidos a uma cópia complementar de DNA (cDNA), por amplificação enzimática utilizando o kit (High capacity cDNA kit Applied Biosystems™, Foster City, USA), seguindo as instruções do fabricante.

1.4. Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para flanquear toda *Open Reading Frame* (ORF) do gene codificador da glicoproteína F do aMPV e bRSV (quadro 1) e (quadro 2) respectivamente, a partir das sequências completas dos genes depositadas no *GenBak* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Quadro 1 - Descrição dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene que codifica para a glicoproteína F do aMPV

<i>primers</i>	sequência (5'→3')	posição
FF2+	<i>ATGGATGTAAGAATCTGTCTCC</i>	1-1617
FR2-	<i>TAACTGACATAAGCCATGC</i>	

Quadro 2 - Descrição dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene que codifica para a glicoproteína F do bRSV

<i>primers</i>	sequência (5'→3')	posição
bRSVF5+	<i>ATAAGGATGGCGACAACAGC</i>	1-1538
bRSVF3-	<i>AGGCCAGGCTTTGGTTTATT</i>	

1.5. PCR para o gene F do aMPV

A reação de PCR consistiu de 1µL de cDNA diluído em 14,5µL de H₂O, 2,5µL de tampão 10X, 2µL (4 mM) de MgCl₂ 50 mM, 0,75µL (0,3 mM) de dNTP 10mM, 2µL

(0,8pmol) de *primer* **FF2+** (10pmol) e 2 μ L (0,8pmol) de *primer* **FR2-** (10pmol) e 0,25 μ L (1,25 unidade) *Taq Polimerase* (5 unidades) Invitrogen.

A reação compreendeu uma etapa inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação das cadeias, 30 segundos seguindo de 54°C de T° de anelamento dos iniciadores e 1 minuto a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TEB 1X com adição de Brometo de etídio numa concentração final de 0,5 μ g/mL e posteriormente visualizados sob luz ultravioleta (UV).

1.5.1. PCR para o gene F do bRSV

As reações foram realizadas em volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L de cDNA diluído em 31,8 μ L de H₂O, 5 μ L de tampão 10X, 1,5 μ L (4 mM) de MgSO₄ 50mM, 1,5 μ L (0,2mM) de dNTP 10mM, 2,5 μ L (0,5pmol) de *primer* **bRSVF5+** (10pmol) e 2,5 μ L (0,5pmol) de *primer* **bRSVF3-** (10pmol) para o gene F e 0,2 μ L (1unidade) *Taq Platinum Pfx* (5 unidades) Invitrogen.

A reação compreendeu uma etapa inicial de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação das cadeias, 1 minuto a 56°C para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TEB 1X com adição de Brometo de etídio numa concentração final de 0,5 μ g/mL e posteriormente visualizados sob luz UV.

Construção Indireta dos adenovírus recombinantes

2. Primeira clonagem do Gene F do aMPV e bRSV

2.1. Vetor de Clonagem do produto de PCR

O primeiro vetor utilizado foi pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® (Invitrogen), possui duas sequências denominadas AttL1 e AttL2, que possibilita a recombinação deste vetor com o vetor adenoviral que possui as regiões AttR1 e AttR2 (Figura 4). O fragmento codificante dos genes F foram clonados no vetor pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® conforme as instruções do fabricante. Bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5α (Clontech, Heidelberg, Germany) competentes foram transformadas com o vetor recombinante por choque térmico. Os clones bacterianos contendo os plasmídeos dotados dos insertos dos genes F foram selecionados pelo crescimento em meio contendo o antibiótico *spectinomycin* (Sigma). Após extração do DNA plasmidial com a utilização do Kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A presença dos insertos foi confirmada pela técnica de PCR, seguindo o protocolo anteriormente descrito.

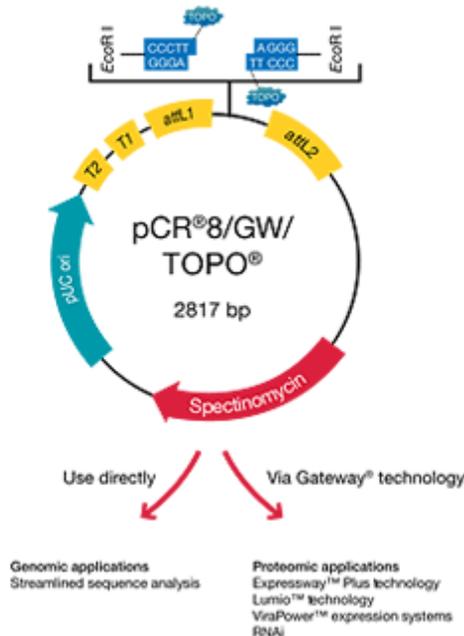


Fig. 4- A figura ilustra o Vetor de Clonagem pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning®

2.2. Sequenciamento de nucleotídeos do produto de PCR e do inserto gênico nos clones bacterianos transformantes selecionados

Para confirmar a identidade e orientação dos fragmentos clonados, o sequenciamento dos produtos de PCR e dos clones transformantes foram realizados utilizando-se os *primers* sentido positivo e negativo específicos para os genes e os *primers* M13 para o vetor, fazendo cada sentido em triplicata para os *primer* específicos e para os *primers* do vetor.

As reações foram realizadas utilizando sequenciador automático ABI PRISM 3700 DNA (Applied Biosystems, Foster - City, EUA), com o kit *ABI PRISM Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye - Applied Biosystems)*, seguindo as instruções do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram manipuladas utilizando o programa Bioedit versão 7.0.5.2 (HALL *et al.*, 1999), alinhadas usando-se o programa

Clustal W versão 1.83 (THOMPSON *et al.*, 1994) e foram comparadas, a similaridade dos produtos de PCR e de cada clone, com as sequências depositadas no *GenBak*.

3. Segunda clonagem do Gene F do aMPV e bRSV

3.1. Preparação de Bactérias Eletrocompetentes

Para a preparação das bactérias eletrocompetentes foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* da linhagem DH10B seguindo o protocolo AUSUBEL *et al* (1995), com modificações para as melhores condições ideais para preparação, transformação e crescimento da bactéria com o plasmídeo recombinante.

Foi realizado um pré-inóculo da bactéria crescido *overnight* em 5mL de meio LB (*Luria-Bertani*) a 37°C por 250 g, foi feito um repique da bactéria do pré-inóculo de 1/100 em 100mL de meio LB com crescimento aproximadamente de três horas durante este período foi medido a OD₆₀₀. As bactérias foram crescidas sob agitação vigorosa até atingir a OD₆₀₀ (absorbância 0,6), após o frasco contendo as bactérias foi colocado em banho de gelo por 30 minutos. As bactérias foram então centrifugadas a 4200 g por 15 minutos a 4°C. Neste passo foi removido o máximo possível do sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 20mL de glicerol 10%, seguido de uma centrifugação a 4200 g por 15 minutos a 4°C.

Novamente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 2mL de glicerol 10%, seguindo a centrifugação a 4200 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 200µL de glicerol 10%. Foram preparadas alíquotas de aproximadamente 40µL de bactérias, sendo utilizadas em seguida para a transformação por eletroporação dos plasmídeos pShuttle F

aMPV e bRSV. Para verificar a eficiência das bactérias eletrocompetentes foi utilizado o vetor PUC 18.

3.2. Vetor de expressão pAd/CMV/V-5-DESTM Gateway Vectors

Para expressar a proteína F do aMPV e bRSV foi utilizado o sistema PA d/CMV/V-5-DESTM Gateway Vectors (Invitrogen) (Figura 5). Os genes foram inseridos no primeiro plasmídeo pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kits (Invitrogen) e denominados pShuttle F: paMPV-F e pbRSV-F. Após esta etapa, foram inseridos do primeiro para o segundo plasmídeo (através de recombinação) utilizando a enzima Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen), seguindo o protocolo abaixo.

Os plasmídeos pShuttle foram utilizados em concentrações de 50 a 150ng por reação, 1µL do vetor, a reação foi completada com tampão TE pH 8.0 para um volume de 8µL. Em seguida, foi adicionada a esta reação 2µL da enzima Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen) e a reação foi incubada por 8 horas a 25°C. Após este período, foi adicionada 1µL de proteinase K na reação, sendo incubada novamente por 10 minutos a 37°C. As bactérias foram transformadas através de eletroporação, em seguida as células foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, e plaqueadas em meio LB-Ágar contendo 100µg de ampicilina para a seleção dos clones de expressão. Após o crescimento dos clones de expressão, os mesmos foram plaqueados novamente por duas vezes em meio LB-Ágar contendo 100µg de ampicilina para a verificação da presença de colônias satélites e contaminação.

Confirmação dos clones de expressão, foi realizada após extração do DNA plasmidial com a utilização do Kit *PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), seguindo as

instruções do fabricante. A presença dos insertos foi confirmada pela técnica de PCR, seguindo o protocolo para a amplificação do gene F do aMPV e bRSV, utilizando os *primers* específicos descritos nos quadros 1 e 2. A reação foi realizada como citada nos itens: 1.5. PCR para o gene F do aMPV e 1.5.1. PCR para o gene F do bRSV.

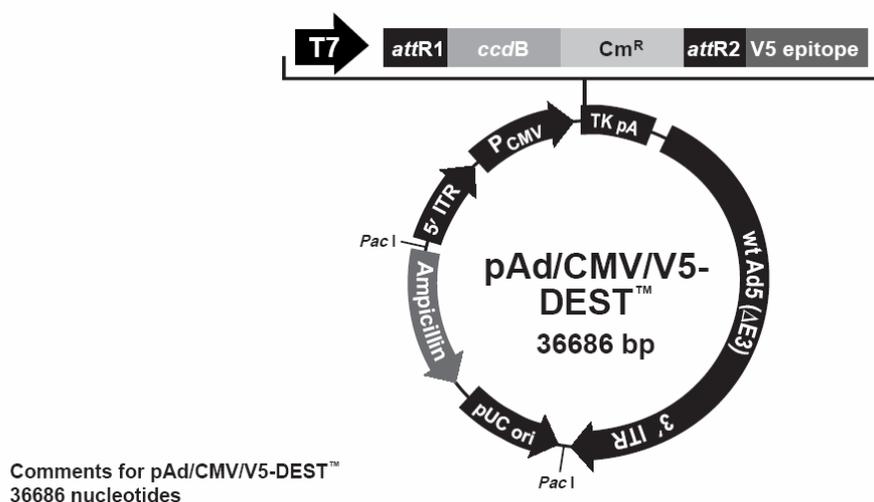


Fig. 5- A figura ilustra o mapa do Vetor pAd/CMV/V-5-DESTM (Invitrogen).

3.3 Sequenciamento de nucleotídeos do inserto gênico nos clones de expressão selecionados

Para confirmar a identidade e orientação dos clones de expressão foram utilizados os *primers* sentido positivo e negativo específicos para o gene e os *primers* T7 para o vetor, fazendo cada sentido em triplicata. As reações foram realizadas utilizando sequenciador automático ABI PRISM 3700 DNA (Applied Biosystems, Foster - City, EUA), com o kit *ABI PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye - Applied Biosystems)*, seguindo as instruções do fabricante. As sequências de nt foram analisadas como descrito no item 2.2. sequenciamento de nt.

3.4. Transfecção em células da linhagem HEK-293 (Rim de embrião humano)

3.4.1. Preparação para transfecção

Pré-Transfecção: Extração DNA plasmidial "Midi Prep"

Para a extração do plasmídeo foi utilizado o kit S.N.A.PTM (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Seguindo o protocolo acima, foi adicionado no DNA plasmidial 1mL de fenol, misturado vigorosamente por 5 minutos a temperatura ambiente, e foi centrifugado a 14000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e adicionado 1mL de clorofórmio, em seguida foi misturado vigorosamente por 5 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação de 14000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e adicionado 10µL de 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 1mL de etanol absoluto gelado o conteúdo foi misturado gentilmente e incubado *overnight* a -20°C.

Seguida de centrifugação a 14000 g por 30 minutos a 4°C e, o *pellet* lavado com etanol 70%, deixando secar o DNA plasmidial, e então ressuspendido em 20µL de água destilada (MilliQ, RNase/ DNase free water system).

Para a digestão com a enzima *PacI* (New England Biolabs), o DNA plasmidial precipitado foi quantificado utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e foi utilizado na concentração de 5µg/µL, a reação foi incubada por 3 horas seguindo as orientações do fabricante. A digestão do vetor com a enzima *PacI* expõem as regiões invertidas repetidas (ITRs) do adenovírus e remove as sequências da bactéria. Após a digestão o DNA plasmidial foi purificado por fenol/clorofórmio e em seguida quantificado novamente utilizando NanoDrop 2000.

Para a transfecção foi utilizado Lipofectamine 2000TM (Invitrogen), e DNA plasmidial na concentração 1µg/µL. A reação compreendeu um volume final de 250µL (230µL de Opti-MEMTM Invitrogen + 20µL de Lipofectamine 2000TM) que foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi então adicionado formando o complexo e novamente incubado por 40 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi colocada em placa de seis orifícios contendo células HEK-293 semi-confluente. E seis horas após a transfecção foi adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 48 horas, foi realizada a tripsinização das células transfectadas, sendo diariamente observadas para a verificação do início do efeito citopático (ECP) dos adenovírus recombinantes.

3.5. Western Blot

Para a confirmação da tradução das proteínas transfectadas foi realizado a técnica de *Western Blot*. Para o gene F do aMPV, foi utilizado o PCR em tempo real para quantificar o RNA mensageiro nas células HEK-293 transfectadas e o *Western Blot* da proteína, foi realizado a partir da produção de antissoro policlonal anti-aMPV inoculado com a cepa SHS/669/03 em camundongas da linhagem BALB/c por via intraperitoneal.

Para o gene F do bRSV, não inserimos *stop codon* na sequência dos *primers* e como apresentado na figura 2 o mapa do vetor, este possui uma região denominada epítipo V-5. Para a proteína F do bRSV foi utilizado anticorpo contra o epítipo V-5 Anti-V5-HRP AntibodyTM (Invitrogen) na diluição 1:1000 para as análises do o *Western Blot*.

As amostras transfectadas foram coletadas da seguinte forma: as transfecções foram realizadas em placas de seis orifícios, um dos orifícios era um controle de célula, outro orifício um controle somente com lipofectamina e quatro orifícios com amostra.

Para o gene F do aMPV foi utilizado DNA plasmidial na concentração de 5µg/µL onde foram coletadas amostras de controle de célula, de lipofectamina e com duas coletas diferentes de amostra, a saber: 1) após 48 horas de transfecção o sobrenadante foi coletado e realizado a inoculação em garrafa de 25cm² contendo células HEK-293 semi-confluentes.

O sobrenadante (1mL) foi adicionado às células e incubadas do sobrenadante por 1 hora para adsorção das partículas virais nas células e adicionado meio completo Meio Dulbecco MEM (DMEM - enriquecido com alta glicose) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e após 48 horas, foi coletada a amostra; 2) a segunda coleta foi realizada também após 48 horas da transfecção de forma diferente da primeira, ou seja, foi realizada a tripsinização das células e colocadas em garrafa 25cm². Após seis dias da transfecção foi realizado um raspado da monocamada e coletada a amostra.

Para o gene F do bRSV foi utilizado DNA plasmidial também na concentração de 5µg/µL. Foram realizadas coletas do controle de célula e lipofectamina, e foram realizadas quatro coletas das amostras, a saber: 1) 24 horas após a transfecção; 2) após 48 horas de transfecção o sobrenadante foi coletado e realizado a inoculação em garrafa de 25cm² contendo células HEK-293 semi-confluentes. Após este passo, foi adicionado 1mL do sobrenadante seguido de incubação por 1 hora para adsorção das partículas virais nas células e adicionado meio completo DMEM contendo 10% de SFB e após 48 horas foi coletada a amostra; 3) 48 após a transfecção foi realizado a tripsinização das células e 4) a coleta foi após 48 horas da transfecção utilizando células HEK-293 doadas pelo Laboratório Nacional Luiz Sincrotron (LNLS).

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida-bis-acrilamida a 12%, juntamente com o padrão de massa molecular. Após corrida em tampão TrisHCl-

Glicina pH8,3 e 1% de SDS, foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose (Hybond C-Amersham Life Science). Para controle das proteínas foi utilizado o anticorpo contra a proteína GADPH para a proteína F do aMPV e β -actina para F do bRSV.

A imunomarcção com anticorpo foi realizada após bloqueio da membrana com leite desnatado a 5% em TBS-T (Tris HCl 0,1M pH7,5, NaCl 0,9%, Tween 20 0,1%). A reação com anticorpo diluído 1:1000 em TBS por 120 min em estufa umida a 37°C, a reação antígeno e anticorpo foi revelada com anticorpo anti IgG de camundongo

4. Construção direta dos adenovírus recombinantes

4.1. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados para a proteína G do aMPV e bRSV (quadro 3) e (quadro 4) respectivamente, a partir das sequências completas dos genes depositadas no *GenBak* e com o auxílio do programa DNASTAR ([http:// www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)), sendo inserida 15 bases de sequência com homologia com o vetor.

Quadro 3 - Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação do gene que codifica para a proteína G do aMPV

<i>primers</i>	sequência (5'→3')	Posição
G aMPV+	gtaactataacggtcATGGGGTCCAAACTATATATGG	1-1175
G aMPV-	attaccttttctccTAACTAGTGCAACACCACTCAA	

Quadro 4 - Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação do gene que codifica para a proteína G do bRSV

<i>primers</i>	sequência (5'→3')	posição
G bRSV+	gtaactataacggtcATGTCCAACCATACCCACCATCT	1-773
G bRSV-	attaccttttctccTTAGATCTGTGTAGTTGATTGAT	

Após a amplificação dos genes, os produtos destas reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose, seguido da purificação dos mesmos utilizando NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, seguindo as instruções do fabricante.

4.2. Vetor de expressão Adeno – X Adenoviral Systems (Clontech) e *In-Fusion*[®] reação.

Para expressar as proteínas G do aMPV e bRSV foi utilizado o sistema **Adeno – X Adenoviral Systems 3TM (Clontech) *In-Fusion*** no qual os genes foram inseridos diretamente no vetor de expressão utilizando a enzima *In-FusionTM* (Clontech), seguindo as instruções do fabricante.

Após foi feita a transformação das bactérias StellarTM (Clontech) quimicamente competentes seguindo as instruções do fabricante. A confirmação dos clones de expressão foi realizada após triagem por intermédio de PCR de 10 a 11 colônias utilizando os primers específicos para cada gene.

Os insertos foram confirmados através de PCR de colônias foi feita a extração do DNA plasmidial com o NucleoBond Xtra MidiTM e para confirmação novamente dos clones foram realizadas digestões individuais com as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI*.

4.3. Digestão com a enzima *PacI* foi realizada como citado no item **3.4.1. Pré-Transfecção.**

4.3.1. Transfecção

Para a transfecção foi utilizado Lipofectamine 2000TM (Invitrogen), e DNA plasmidial na concentração 5µg/µL, seguindo as orientações do fabricante e como foi citado no item **3.4.1. Pré-Transfecção.**

Com a expressão do gene GFP foi possível verificar a produção de adenovírus recombinantes nas células transfectadas, o uso do microscópio de fluorescência foi realizado no Laboratório de Proteômica (IB-UNICAMP), utilizando contraste de fase Axio Observer Z1 (Zeiss) com filtros Brightfield e GFP, com o auxílio da Profa Dra Cristina Vicente Pontes.

4.5. Efeito Citopático dos adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV em células HEK-293

Para a produção dos vetores adenovirais, as células HEK-293 foram cultivadas em garrafas (25cm²) e infectadas com os vetores e, após a completa destruição da monocamada de células (aproximadamente 72 horas após a infecção), o meio de cultura contendo as células foi congelado a -80°C. Após o congelamento foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento em banho a 37 °C com a suspensão de células, com a finalidade de romper as membranas das células e liberar as partículas virais. Esse material foi centrifugado a 2000 g por 15 min e o sobrenadante foi coletado.

Foram realizadas passagens em células permissivas HEK-293 até o aparecimento do efeito citopático (ECP) na segunda passagem. Após a segunda passagem e a confirmação

do ECP dos adenovírus recombinantes foram realizadas duas passagens em células não-permissivas HEp-2.

4.6. PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real (*Real time PCR*) foram realizadas utilizando o equipamento ABI7500[®] (Applied Biosystems, CA, EUA). Os iniciadores utilizados foram direcionados para as regiões do gene F do aMPV, descritos no quadro 5 (FERREIRA *et al.*, 2007). Os primers foram desenhados a partir de sequências completas do gene com o auxílio do software Primer Express 2.0.

Quadro 5 - Descrição dos iniciadores e probes desenhados para a amplificação do gene que codifica para a proteína F do aMPV

Iniciador	sequência (5'→3')
Primer AMPVF+3643 f	ATGCCAACTTCATCAGGACAGA
Primer AMPV -3721 r	TCAATATACCAAACCCCTTCCTTCT
Probe AMPV+3667	FAM -AGTTTGATGTTGAACAATCGTGCCATGGT- TAMRA

Foram realizados dois experimentos diferentes um para verificar a transcrição do gene F do aMPV em células permissivas e não-permissivas utilizando como material a extração do RNA total das células infectadas com os adenovírus recombinantes utilizando kit de extração de RNeasy Mini, RNA isolation kit (Qiagen), foi utilizado como controle interno da reação de PCR em tempo real o gene GAPDH (human glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) como *house keeping gene*.

O segundo experimento foi realizado a partir da extração de DNA total das células permissivas e não-permissivas infectadas, com o intuito de quantificar o número partículas virais, foi utilizado o kit DNA preparation kit (Qiagen), utilizando os iniciadores descritos no quadro 5, neste experimento foi realizado curvas *Standard* utilizando diluições seriadas na base 10 do primeiro plasmídeo contendo o gene F do aMPV (paMPV-F) descrito no item **2.1. Vetor de Clonagem do produto de PCR.**

A amplificação foi realizada utilizando o kit Quantitec Probe PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), com as concentrações de 900nM para cada primer e 300nM para a probe Taqman. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.7. Titulação dos adenovírus recombinantes

As titulações dos mesmos foram determinadas utilizando o Adeno-X rapid titer kit[®] (Clontech), e seguindo o método de REED & MUENCH (1938).

4.8. Imunização experimental de camundongas BALB/c

A imunização foi realizada utilizando camundongas da linhagem BALB/c com seis a oito semanas de vida. Estes foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram acondicionados em microisoladores de policarbonato em racks ventilados (Alesco, Brasil), em condições livres de patógenos, no Laboratório de Experimentação Animal, composto por uma sala com ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial (Labina-Purina, Brasil) e água a vontade, ambos esterilizados por autoclavagem.

Os animais foram imunizados experimentalmente, com duas doses via intramuscular (IM). Foram realizados três grupos, cada grupo com cinco animais. O primeiro grupo: os animais foram inoculados com 50µL Ad-aMPV-F com TCID₅₀10^{5,3}/mL (Dose infectiva para 50% dos cultivos celulares), segundo grupo: animais inoculados com adenovírus expressando GFP foi utilizado como grupo controle Ad-GFP com TCID₅₀10^{5,8}/mL no volume de 50µL, e o terceiro grupo: foi inoculado 50µL PBS grupo controle da imunização. Após 14 dias da primeira imunização os animais receberam um *booster* seguindo a mesma via de inoculação e dose. As coletas de soros foram realizadas nos dias 0, 7, 14 e 21 dias de experimentos pela via retro-orbital.

4.9. Elisa Indireto

As placas de Elisa foram sensibilizadas com 100µL do antígeno SHS/669/03 log 10 TCID₅₀10^{5,8}/mL, previamente diluído em tampão carbonato 0,015M Bicarbonato 0,035M pH 9.6), e mantida a 4 °C por 18 horas. Após a incubação a placa foi lavada duas vezes (200µL cada) com PBS 1X + Tween 20 (0,05%). Após as lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubando-se com PBS 1X adicionado de 5% SFB por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas duas lavagens (200µL cada) com PBS + Tween 20 (0,05%). Em seguida as diluições seriadas dos soros dos animais, (1:25 a 1:1280) foram realizadas em PBS 1 X adicionado de 2% SFB, e 100µL de cada diluição, foram adicionados em cada orifício da placa deixando por 1 hora a temperatura ambiente.

Seguiram-se três lavagens com PBS 1 X + Tween 20 (0.05%), e foi utilizada a diluição de 1:2000 do conjugado (HRP Conjugated Goat anti-Mouse - Sigma) em 100µL

de PBS 1 X adicionado de 2% SFB, em cada orifício da placa, deixando reagir por 1 hora em temperatura ambiente. Três novas lavagens foram realizadas com PBS 1X + Tween 20 (0.05%) e foi adicionado em cada orifício 100 μ L do revelador o-Phenylenediamine dihydrochloride (oPd) (Sigma Aldrich, VA, USA), incubando-se por 15 minutos. Seguido este período foi realizada a leitura a OD_{492nm}. Todos os soros foram avaliados em duplicata.

A determinação do ponto de corte (“*cut off point*”), para soro não-reagente definido foi calculada utilizando a média de dois soros pré-ímmunes multiplicado por três, deste modo aumentando a confiabilidade do teste.

1. Construção indireta dos adenovírus recombinantes

1.1. Clonagem do gene F do aMPV e bRSV

1.2. Obtenção dos genes F do aMPV e bRSV

O RNA viral foi obtido a partir das células infectadas, conforme descrito em Material e Métodos, e submetido a uma reação de RT-PCR utilizando gradiente de temperatura e iniciadores desenhados visando à amplificação do gene alvo para ambos os vírus.

Para a amplificação da região codificante completa do gene F, e avaliação dos produtos de RT-PCR revelou a amplificação do fragmento de acordo com o tamanho esperado a região do gene F correspondente de 1617 pb (oligonucleotídeos FF2+ For e FF2- Rev (quadro 1) do aMPV) (Figura 6) a partir da amostra SHS/669/03.

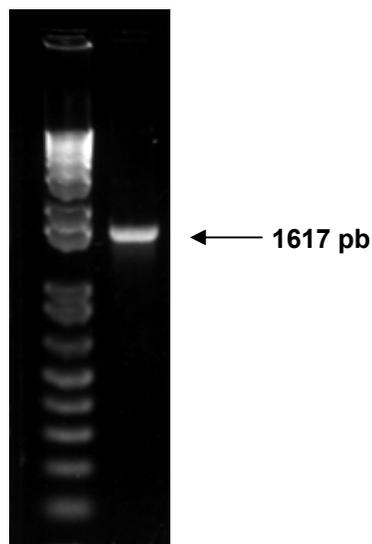


Fig. 6- Obtenção do gene de fusão (F) do aMPV. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o produto de amplificação do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos FF2+ For e FF2- Rev (Poço 2) e marcador de massa molecular 1Kb Plus™ (Invitrogen) (Poço 1). A seta indica o fragmento de 1617 pb referente ao tamanho do gene F.

Para a amplificação da região codificante completa do gene F do bRSV, e avaliação dos produtos de RT-PCR revelou a amplificação do fragmento de acordo com o tamanho esperado a região do gene F correspondente de 1538 pb (oligonucleotídeos bRSVF5+ For e bRSVF3- Rev (quadro 2) do aMPV) (Figura 7) a partir da amostra bRSV-25-BR.

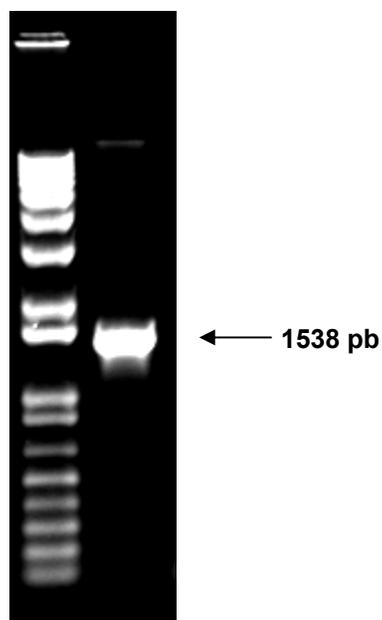


Fig. 7- Obtenção do gene de fusão (F) do bRSV. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o produto de amplificação do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos bRSVF5+ For e bRSVF3- Rev (Poço 2) e marcador de massa molecular 1Kb PlusTM (Invitrogen) (Poço 1). A seta indica o fragmento de 1538 pb referente ao tamanho do gene F.

1.3. Clonagem e sequenciamento dos genes F do aMPV e bRSV

Os fragmentos amplificados para os genes F (1617 pb e 1538 pb do aMPV e bRSV, respectivamente) foram clonados no plasmídeo pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] (Invitrogen). Os dois plasmídeos obtidos após a transformação de células competentes

(paMPV-F e pbRSV-F) foram avaliados por sequenciamento. Os clones foram sequenciados (Figuras 8 e 9) e a análise da sequência mostrou que os clones paMPV-F e pbRSV-F possuíam a sequência correta.

```

paMPV-F      GCTCCGAATT CGCCCTTATG GATGTAAGAA TCTGTCTCCT ATTGTTCCCTT
AY640317/LAH -----GGGAC AAGTAGGATG GATGTAAGAA TCTGTCTCCT ATTGTTCCCTT

paMPV-F      ATATCTAATC CTAGTAGCTG CATACAAGAA ACATACAATG AAGAATCCTG
AY640317/LAH ATATCTAATC CTAGTAGCTG CATACAAGAA ACATACAATG AAGAATCCTG

paMPV-F      CAGTACTGTA ACTAGGGGTT ATAAGAGTGT GTTAAGGACA GGGTGGTATA
AY640317/LAH CAGTACTGTA ACTAGGGGTT ATAAGAGTGT GTTAAGGACA GGGTGGTATA

paMPV-F      CGAATGTATT TAACCTCGAA ATAGGGAATG TTGAGAACAT CACTTGCAAT
AY640317/LAH CGAATGTATT TAACCTCGAA ATAGGGAATG TTGAGAACAT CACTTGCAAT

paMPV-F      GATGGACCCA GCCTAATTGA CACTGAGTTA GTACTCACAA AGAATGCTTT
AY640317/LAH GATGGACCCA GCCTAATTGA CACTGAGTTA GTACTCACAA AGAATGCTTT

```

Fig. 8- Sequência gênica parcial da região dos genes de fusão (F) do aMPV SHS/669/03 e da amostra referência LAH (AY640317). Na confirmação das sequências de nt obtidas através de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13 forward e reverse e os oligonucleotídeos específicos para o gene (1-1617 nt).

ATGAGCTGAC ATCAGCATT A TCCTCATCTC TACCTATGTG CCACATATCA CTTTATGCCA
GAACATAACA GAAGAATTTT ATCAATCGAC ATGCAGTGCA GTTAGTAGAG GTTACCTTAG
TGCATTAAGA ACTGGATGGT ATACAAGTGT GGTAACAATA GAGTTGAGCA AAATACAAAA
AAATGTATGT AACGGTACTG ATTCAAAAGT GAAATTAATA AAGCAAGAAC TAGAAAGATA
CAACAATGCA GTAGTGGAA T TGCAATCACT TATGCAAAAT GAACCGACCT CCTCTAGTAG
AGCAAAAAAGA GGGATACCAG AGTCGATACA TTATACAAGA AACTCTACAA AAAAGTTTTA
TGGACTAATG GGCAAAAAAGA GAAAAAGGAG ATTTTTAGGA TTCTTGCTAG GTATTGGATC
TGCTATTGCA AGTGGTGTAG CAGTGTCCAA AGTACTACAC TTGGAGGGAG AGGTGAACAA
AATTAACAAT GCACTGCTAT CCACAAATAA AGCAGTGGTT AGTCTGTCCA ATGGAGTTAG
TGTCCTTACT AGCAAAGTAC TTGATCTAAA AGACTATATA GACAAAGAGC TTCTACCTAA
AGTTAACAAT CATGATTGTA GGATATCCAA CATAGCAACT GTGATAGAAT TCCAACAAAA
AAACAATAGA TTGTTGAAAA TTGCTAGGAA TTTTTTAGTG TAAATGCTGG TATTACCACA
CCCTTCAGTA CATACATGTT ACCCAAATAG GTGAGTACTA TTAAATAAATT AAAGATATGT
CCTTTAACGA ATGACCCACA AAATTCCAGT ATGTCATATG TCAGCTAACA GAGTGTGCA
TCATGTCAGT GCTAAAGAAG AGTCATAAGC TTATGTAGTA CACTCGCCTC TCTATGGAGT
CATAGACTAC CCCTCGTTGG ATACTACGCA CCTTTCCTTT ATGCACAGCT GATACTAAAG
AAGGGTCAAG CATCTGCTTA CTTAGGACAG ATCGTGCCTG GTATTGTGAT AATGCAGGCT
CTGTGTCTCT GCTCCACAC GCAGAGTCGT GTAAGGTACA ATCAACCAGA GTGTTCTGTG
ACACAATGAA CAGTTTAACT TTGCCTACTG ATGTTAACTT ATGCAACACT GACATATTCA
ATGCAAAGTA TGATTGTAAA ATAATGACAT CTAAAAC TGA CATAAGTAGC TCTGTGATAA
CTTCAATAGG AGCTATTGTA TCATGCTATG GGAAGACAAA ATGTACAGCC TCTAATAAAA
ATCGTGGAA T CATAAAGACT TTTTCCAATG GGTGTGATTA TGATCAAAC AAAGGAGTTG
ATACTGTATC AGTTGGTAAC ACACTATATT ATGTAAATAA ACTAGAGGGG AAAGCACTCT
ATATAAAGGG TGAACCAATT ATTAATTACT ATAATCCACT AGTATTTGCT TCTGATGAGT
TTGATGCATC AATTGCTCAA GGAAACAACG

Fig. 9- Sequência gênica completa do gene de fusão (F) do bRSV da amostra bRSV-25-BR.

Na confirmação das sequências de nt obtidas através de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13 forward e reverse e os oligonucleotídeos específicos para o gene (1-1538 nt).

1.4. Obtenção dos adenovírus recombinantes utilizando o vetor pAd/CMV/V-5-DESTM

Os plasmídeos paMPV-F e pbRSV-F foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH10B competentes e, através de um evento de recombinação, os insertos foram transferidos para o genoma de um adenovírus presente na forma plasmidial. A recombinação pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR.

A reação de PCR utilizando 1µL do DNA do adenovírus recombinante Ad-aMPV-F amplificou um fragmento de 1617 pb conforme esperado quando os oligonucleotídeos FF2+ For e FF2- Rev foram utilizados. Já a reação de PCR utilizando 1µL do DNA do adenovírus recombinante Ad-bRSV-F amplificou um fragmento de 1538 pb quando os oligonucleotídeos bRSVF5+ For e bRSVF3- Rev, foram utilizados. A confirmação dos genes que codificam as proteínas F do aMPV e bRSV nos adenovírus recombinantes, também foram avaliadas por sequenciamento. E a análise das sequências mostrou que os Ad-aMPV-F e Ad-bRSV-F possuíam a sequência correta.

1.5. Análise dos genes F expressos em células HEK-293

1.5.1.Preparação para transfecção

Para a transfecção dos genes F nas células HEK-293, cinco micrograma de DNA do Ad-aMPV-F foram digeridos com a enzima *PacI*. A enzima expõe as regiões invertidas repetidas (ITRs) dos adenovírus e remove as sequências da bactéria, gerando um fragmento de aproximadamente 2 Kb (Figura 10).

O mesmo foi feito com cinco micrograma de DNA do Ad-bRSV-F que, uma vez transfetado em células HEK-293, deu origem aos adenovírus recombinantes.

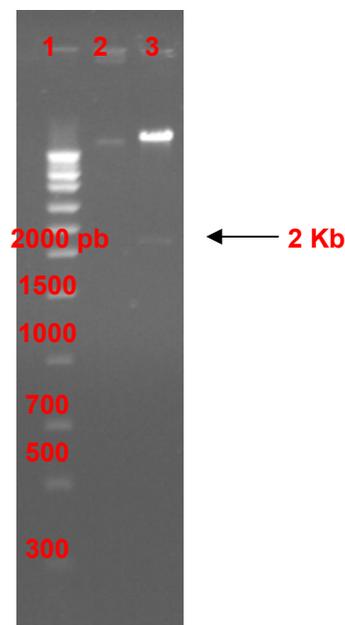


Fig. 10- Análise de cinco micrograma de DNA do Ad-aMPV-F digeridos com a enzima *PacI*, gerando um fragmento de aproximadamente 2 Kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. (Poço 1) Marcador de massa molecular de 1Kb (Novargen); (Poço 2) tamanho do Ad-aMPV-F intacto e (Poço 3) tamanho do Ad-aMPV-F digerido com a enzima *PacI*.

1.5.2. Transfecção em células da linhagem HEK-293

A transfecção em células da linhagem HEK-293 foi utilizado Lipofectamine 2000TM (Invitrogen), foram utilizadas as concentrações de cinco microgramas e as células foram coletadas com 48, 72 e 96 horas após a inoculação a 37°C.

1.6. Análise da expressão da proteína F do aMPV e do bRSV em Imuno-deteccção (Western Blot)

As células HEK-293 foram utilizadas para a análise da expressão das proteínas F em dois géis desnaturantes de poliacrilamida SSD-PAGE a 12% para cada análise de expressão. Foram analisados, também extrato de células (HEK-293) não infectadas, extrato

de células infectadas com Ad-aMPV-F (contendo o gene F do aMPV) e o extrato de células infectadas com Ad-bRSV-F (contendo o gene F do bRSV). Os géis foram corados e fixados em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético e Coomassie blue e posteriormente descorado e utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose para o experimento de imuno-deteção.

A membrana foi marcada com antissoro policlonal anti-aMPV inoculado com a cepa SHS/669/03 em camundongas da linhagem BALB/c por via intraperitoneal. A imuno-marcação com antissoro policlonal anti-aMPV foi capaz de detectar uma banda correspondente à massa molecular de 50 kDa (Figura 11). Contudo, a proteína F do aMPV possui uma massa molecular de 70 kDa e o que observamos foi uma proteína de tamanho correspondente à proteína na sua forma F1 com massa molecular de aproximadamente 47 kDa. A proteína F é sintetizada primeiramente em F0, que se torna ativa por uma clivagem em duas subunidades F1 e F2 (COLLINS, *et al.*, 1984; GONZÁLEZ-REYES, *et al.*, 2001).

Para o gene F do bRSV a membrana foi marcada com anticorpo contra o epítipo V-5 Anti-V5-HRP AntibodyTM (Invitrogen). A imuno-marcação com anticorpo contra o epítipo foi capaz de detectar uma banda correspondente à massa molecular de 90 kDa (Figura 12). No entanto, a proteína F do bRSV possui uma massa molecular de 70 kDa, indicando possíveis alterações na estrutura protéica da proteína, durante o processo de replicação viral, como glicosilação e processamento pós-tradução.

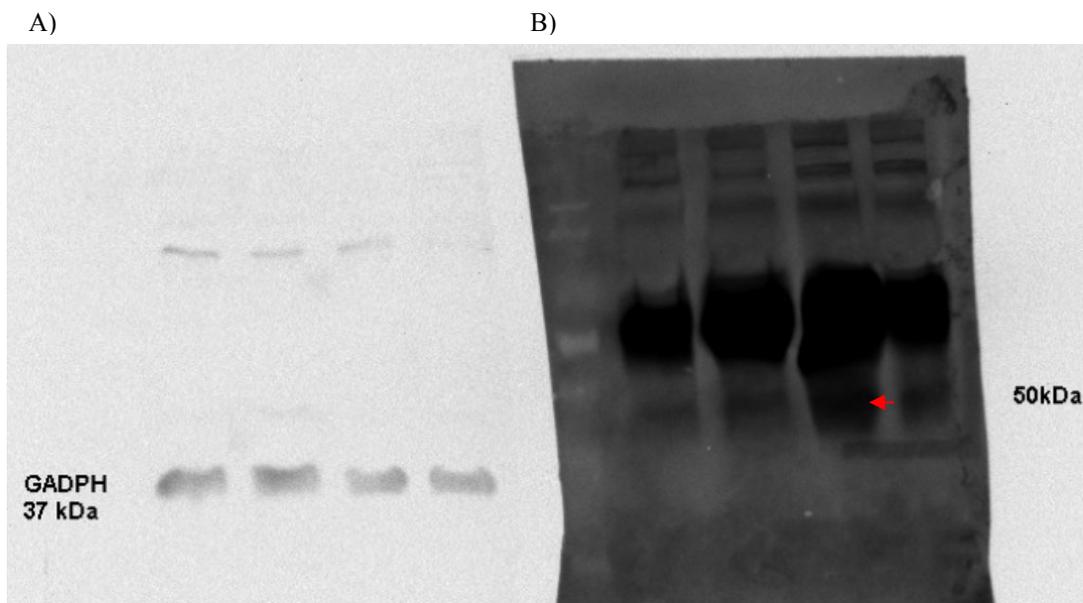


Fig. 11- Análise da expressão da proteína F do aMPV, utilizando antissoro do aMPV produzido em camundonga. Imuno-marcação de extratos de células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV-F. (A) A imuno-marcação com anticorpo anti-GADPH. Poço 1: Marcador de massa molecular; Poço 2: células HEK-293 não infectadas; Poço 3: controle de lipofectamina; Poço 4: células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV 48 horas após inoculação e Poço 5: células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV 6 dias após inoculação.

(B) A imuno-marcação com antissoro policlonal anti-aMPV. Poço 1: Marcador de massa molecular; Poço 2: células HEK-293 não infectadas; Poço 3: controle de lipofectamina; Poço 4: células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV 48 horas após inoculação e Poço 5: células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV 6 dias após inoculação. A seta indica a marcação na altura de 50 kDa.

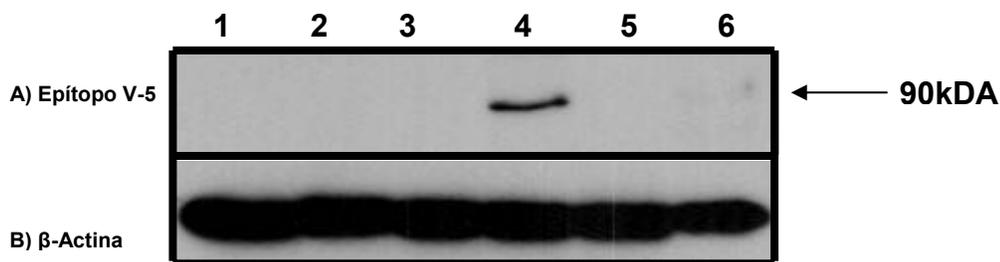


Fig. 12- Análise da expressão da proteína F do bRSV, utilizando anticorpo contra o epítipo V-5. Imuno-marcação de extratos de células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F. (A) A imuno-marcação com anticorpo anti- β -actina (Sigma). Poço 1: células HEK-293 não infectadas; Poço 2 controle de lipofectamina; Poço 3: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação; Poço 4: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 24 horas após inoculação coletadas do sobrenadante; Poço 5: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação e Poço 6: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação células doadas pelo Laboratório Nacional Luis Sincrotron (LNLS).

(B) A imuno-marcação com anticorpo anti- V-5. Poço 1: células HEK-293 não infectadas; Poço 2 controle de lipofectamina; Poço 3: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação; Poço 4: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 24 horas após inoculação coletadas do sobrenadante; Poço 5: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação e Poço 6: células HEK-293 infectadas com Ad-bRSV-F 48 horas após inoculação células doadas pelo Laboratório Nacional Luis Sincrotron (LNLS). A seta indica a marcação na altura de 90 kDa.

2. Construção direta do vetor de expressão pAdeno-X Adenoviral Systemes 3™

In-Fusion

O fragmento dos genes G do aMPV (1175 pb) e bRSV (773 pb), foram clonados no vetor de expressão pAdeno-X Adenoviral através de recombinação. A recombinação foi confirmada por meio de reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes G aMPV+ For e G aMPV- Rev para o aMPV e G bRSV+ For e G bRSV- Rev para o bRSV. Os produtos amplificados deram origem a bandas já esperadas de 1175 e 773 pb respectivamente aMPV e bRSV (Figuras 13 e 14). A confirmação dos genes que codificam as proteínas G do aMPV e bRSV nos adenovírus recombinantes, também foram avaliadas por sequenciamento. E a análise das sequências mostrou que os Ad-aMPV-G-GFP e Ad-bRSV-G-GFP possuíam a sequência correta. E também foram cortados com as enzimas *XhoI* e *NheI* para a confirmação da clonagem dos genes.



Fig. 13- Confirmação da clonagem do gene G do aMPV em pAdeno-X Adenoviral. Gel de agarose 1%. Poço 1: Marcador de massa molecular 1Kb Plus™ (Invitrogen); Poço 2 a 12, produto de PCR a partir de colônias dos clones utilizando oligonucleotídeos específicos G aMPV+ For e G aMPV- Rev para o gene G do aMPV e confirmando a inserção do gene pela banda de 1175 pb (indicada pela seta). O tamanho corresponde ao gene G (1175 pb).

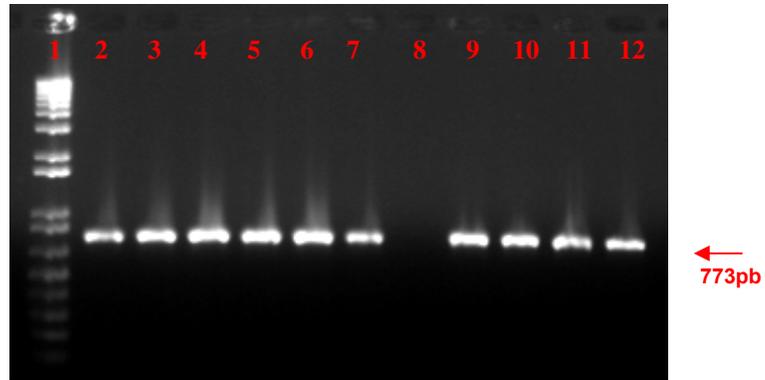


Fig. 14- Confirmação da clonagem do gene G do bRSV em pAdeno-X Adenoviral. Gel de agarose 1%. Poço 1: Marcador de massa molecular 1Kb PlusTM (Invitrogen); Poço 2 a 12, produto de PCR a partir de colônias dos clones utilizando oligonucleotídeos específicos G bRSV+ For e G b-BRSV Rev para o gene G do bRSV e confirmando a inserção do gene pela banda de 773 pb (indicada pela seta). O tamanho corresponde ao gene G (773 pb).

2.1. Análise dos genes G em células HEK-293

2.1.1.Preparação para transfecção

Para a transfecção dos genes G nas células HEK-293, cinco micrograma de DNA do pAdeno-GaMPV-GFP foram digeridos com a enzima *PacI*, gerando um fragmento de aproximadamente 3 Kb (Figura 15).

O mesmo foi feito com cinco micrograma de DNA do pAdeno-GbRSV-GFP que, uma vez transfectado em células HEK-293, deu origem aos adenovírus recombinantes.

2.1.2. Transfecção em células da linhagem HEK-293

A transfecção em células da linhagem HEK-293 foi utilizado Lipofectamine 2000TM (Invitrogen), foram utilizadas as concentrações de cinco microgramas e as células foram coletadas com 48 e 96 horas após a inoculação a 37°C.

Apesar da confirmação do gene, após infectar as células permissivas HEK-293, a recombinação homóloga entre o genoma viral e o cassete de expressão contendo o transgene foi verificada através do aparecimento de fluorescência devido à expressão do gene repórter GFP (Figura 16).

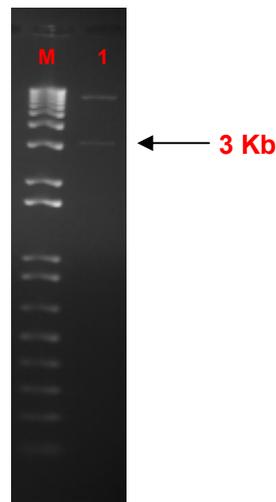


Fig. 15- Análise de cinco micrograma de DNA do pAdeno-GaMPV-GFP digeridos com a enzima *PacI*, gerando um fragmento de aproximadamente 3 Kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. (Poço 1) Marcador de massa molecular de 1Kb (Novargen); (Poço 2) tamanho do pAdeno-GaMPV-GFP digerido com a enzima *PacI*.

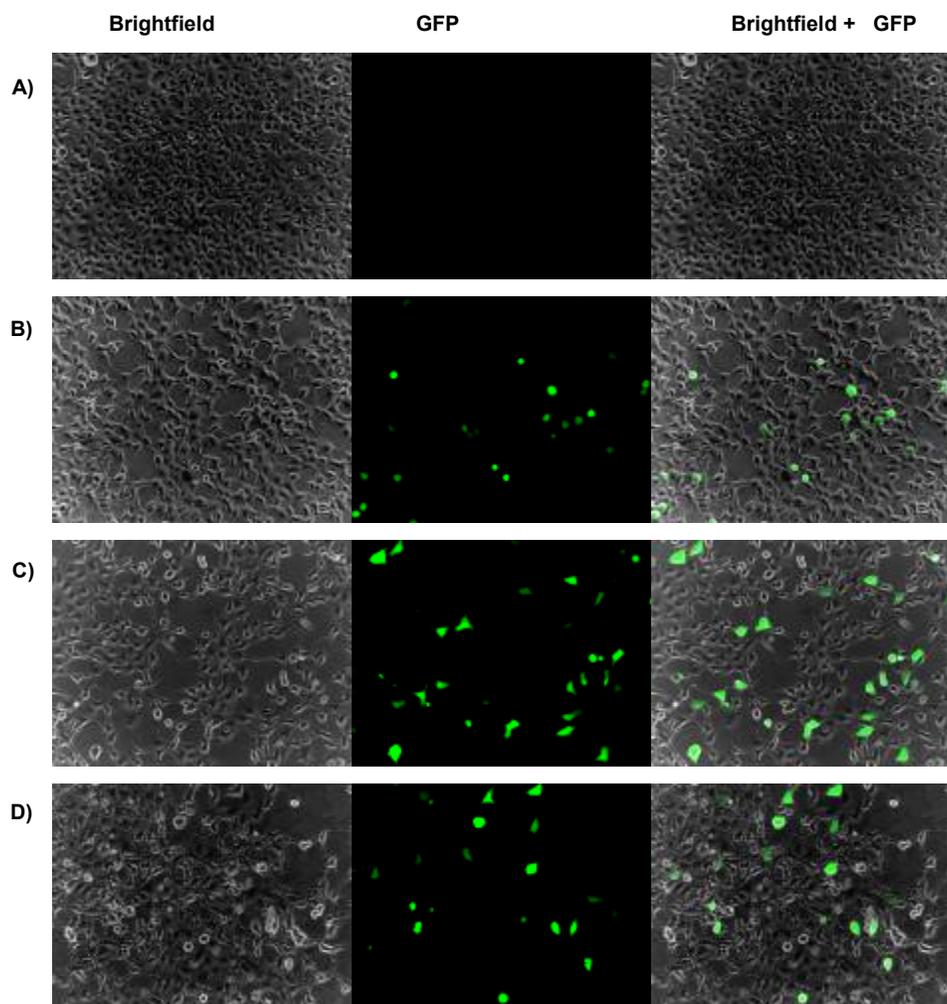


Fig. 16- Células HEK-293 infectadas com pAdeno-GaMPV-GFP e pAdeno-GbRSV-GFP. A) células HEK-23 não infectadas; B) células HEK-293 infectadas com adenovírus sorotipo 5; C) células HEK-293 infectadas com pAdeno-GaMPV-GFP e D) células HEK-293 infectadas com pAdeno-GbRSV-GFP. As células foram mantidas a 37°C por 48 horas (Objetiva 20X).

3. Efeito citopático dos adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV e análise transcricional dos em células permissivas e em células não-permissivas

Os adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV, foram observadas por microscopia óptica o aparecimento do ECP na segunda passagem dos vírus recombinantes nas células permissivas HEK-293, após 24 horas de inoculação (Figura 17). Por base de comparação, das células HEK-293 não infectadas e células infectadas com adenovírus recombinantes.

Somente, em duas passagens dos vírus recombinantes nas células HEp-2, não foram observados o ECP, o que já era esperado neste sentido, pois o vetor é incapaz de se replicar em células que não contenha a região E1, que é indispensável para a sua replicação.

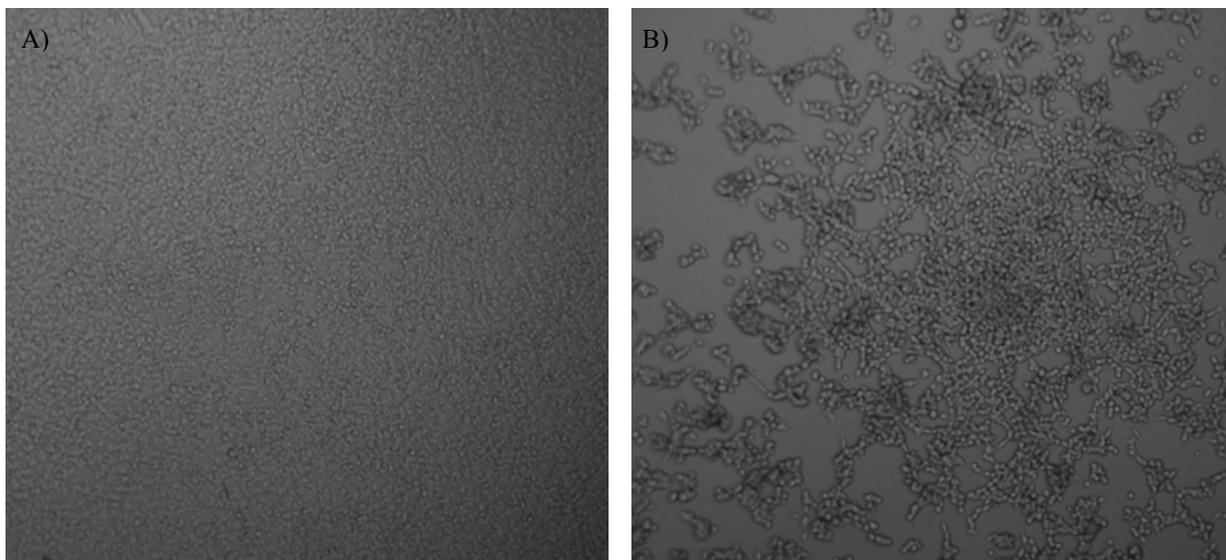


Fig. 17- Células HEK-293 infectadas com paMPV. A) células HEK-293 não infectadas; B) segunda passagem dos vírus recombinantes nas células permissivas HEK-293, após 24 horas de inoculação. As células foram mantidas a 37°C por 24 horas (Objetiva 20X).

3.1. PCR em tempo real

Células permissivas HEK-293 e células não-permissivas Hep-2 foram infectadas com adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV. A partir do RNA foi obtido o cDNA, das células infectadas com os adenovírus recombinantes. Foi feita uma reação de PCR em tempo real para amplificar o cDNA correspondente ao RNA mensageiro do gene F. O par de oligonucleotídeos e probe utilizado (Materiais e métodos quadro 5) e como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH como *house keeping gene*.

Neste experimento das passagens nas células HEK-293, foi observado um aumento na transcrição do gene F, na primeira passagem para a segunda passagem (Figura 18), momento em que foi visualizado o ECP nas células, as passagens foram comparadas com o controle de células não infectadas.

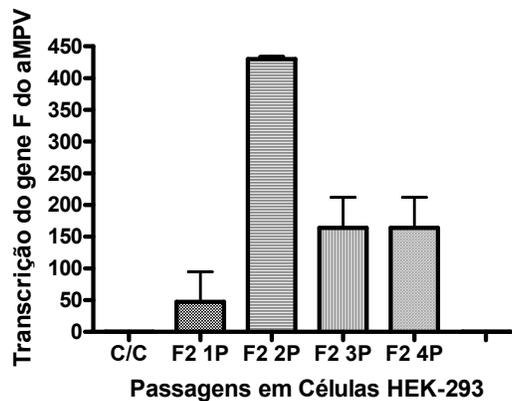


Fig. 18- Comparação dos níveis de transcrição do gene F do aMPV nas passagens em células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV-F; (1) Controle de Células; (2) Ad-aMPV-F primeira passagem; (3) Ad-aMPV-F segunda passagem; (4) Ad-aMPV-F terceira passagem; (5) Ad-aMPV-F quarta passagem.

Nas passagens nas células HEp-2, também foi observado um aumento no nível de transcrição do gene F do aMPV, da primeira passagem para a segunda passagem (Figura 19). No entanto, a transcrição transiente do gene F nas células não-permissivas, acontece somente na presença da precursora proteína terminal (pTP), que se encontra ligada covalentemente às extremidades do genoma viral dos adenovírus no qual a mesma ajuda a estabilizar o genoma viral no núcleo da célula infectada (RUSSEL, 2000).

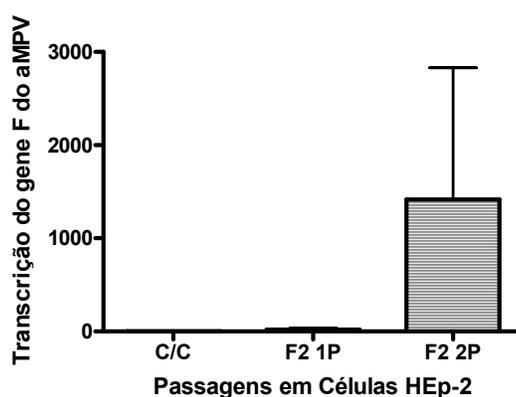


Fig. 19- Comparação dos níveis de transcrição do gene F do aMPV nas passagens em células HEp-2 infectadas com Ad-aMPV-F; (1) Controle de Células; (2) Ad-aMPV-F primeira passagem; (3) Ad-aMPV-F segunda passagem.

O segundo experimento foi realizado a partir da extração de DNA total das células permissivas e não-permissivas infectadas, com o intuito de quantificar o número partículas virais para a análise da transcrição do gene F do aMPV. Neste experimento, foi observado o menor número de Ct na quarta passagem nas células HEK-293 (Figura 20) (o Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene alvo em uma determinada amostra, quanto menor o número inicial do Ct obtido do gene-alvo existente na amostra, comparativamente com outro gene, acontece porque houve uma maior

amplificação do gene-alvo, o mesmo apresenta maior transcrição). Quando foi observado o resultado nas células HEP-2 o Ct apresentou um menor valor na primeira passagem quando comparada com a segunda passagem (Figura 21). Demonstrando um maior número de partículas virais presentes na primeira passagem.

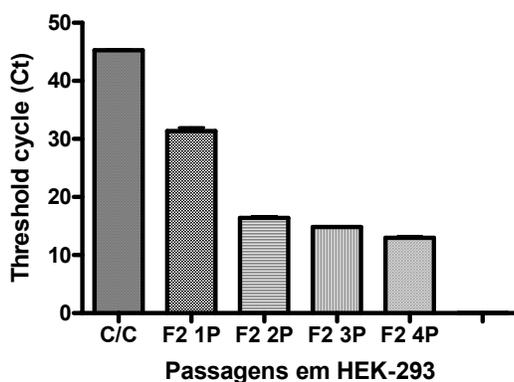


Fig. 20- Comparação da quantificação do número de cópias de DNA do Ad-aMPV-F. Passagens em células HEK-293 infectadas com Ad-aMPV-F; (1) controle de células; (2) Ad-aMPV-aMPV-F primeira passagem; (3) Ad-aMPV-F segunda passagem; (4) Ad-aMPV-F terceira passagem; (5) Ad-aMPV-F quarta passagem.

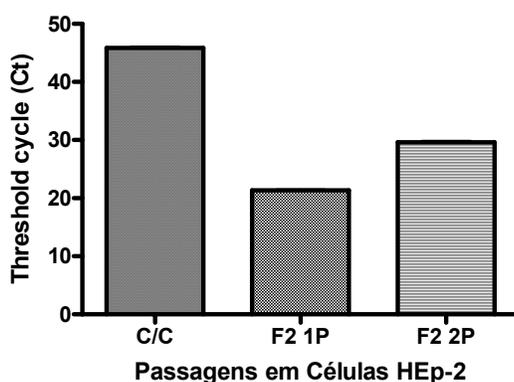


Fig. 21- Comparação da quantificação do número de cópias de DNA do Ad-aMPV-F. Passagens em células HEp-2 infectadas com Ad-aMPV-F; (1) controle de células; (2) Ad-aMPV-F primeira passagem; (3) Ad-aMPV-F segunda passagem.

4. Imunização em camundongas BALB/c e ELISA indireto

Com relação à aplicação do método ELISA indireto usando-se as imunizações nas camundongas com $TCID_{50}10^{5.3}/mL$ de Ad-aMPV-F, para a mensuração de anticorpos IgG, colocando-se diluições sérica do soro para reagir com o vírus SHS/669/03, previamente adsorvidas às cavidades da microplaca. Verificou-se que os níveis de anticorpos na segunda colheita realizada no décimo quarto dia (Figura 22), e após 14 dias da primeira dose os animais receberam um *booster*. A colheita realizada com 7 dias após *booster*, demonstrou que os níveis de anticorpos mostrou uma elevação de forma marcante da segunda colheita (21 dias) para a primeira colheita (14 dias).

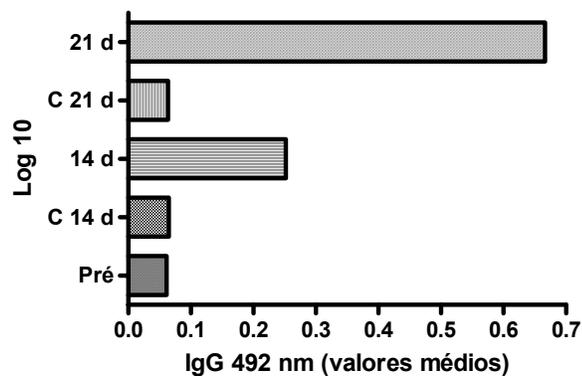


Fig. 22- Mensuração de anticorpos IgG, colocando-se diluições sérica do soro para reagir com o vírus SHS/669/03, previamente adsorvidas às cavidades da microplaca. Verificou-se resposta induzida após a imunização em BALB/c com Ad-aMPV-F expressando a proteína F do aMPV. Pré (animais pré-ímmes); C 14 d (Controle 14 dias); 14 d (Imunização com 14 dias); C 21 d (Controle 21 dias) e 21 d (Imunização com 21 dias).

Um grande esforço tem sido realizado para entender a resposta imune contra os vírus respiratórios que acometem os humanos e os animais. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas modalidades de vacinas tem sido explorado como alternativa aos métodos tradicionais de vacinação.

A expressão de proteínas heterólogas em sistemas procariotos, eucariotos e vetores virais, para a produção de antígenos isolados, pode contribuir não somente na produção de vacinas, como também na produção de imunoreagentes ou imunoenaios. Na literatura, encontram-se as vantagens e desvantagens de utilizar cada um desses sistemas de expressão e, principalmente, se são apropriados ou não para a expressão de um determinado antígeno viral.

Os sistemas são constituídos por procariotos, como *E. coli*, ou por eucariotos, como as leveduras *Saccharomyces spp.*, *Pichia spp.*, e por vetores virais, como os adenovírus, baculovírus e poxvírus, dentre outros, juntamente com células animais em culturas *in vitro*.

A utilização de proteínas recombinantes e vetores virais tem sido uma grande promessa para o futuro das vacinas, tanto na ativação da resposta imune, quanto na imunização segura e efetiva. Por outro lado, as proteínas recombinantes possuem a capacidade de indução de resposta imune limitada, e a maioria dos protocolos que as utilizam necessitam de adjuvantes para a ativação do sistema imune em níveis significativos.

Neste cenário, os vetores adenovirais são potenciais candidatos para o desenvolvimento de vacinas para o uso na indústria veterinária, pois são capazes de induzir resposta imune humoral e celular. A indução de linfócitos T CD8⁺ foi comprovada após o uso desses vetores em modelos murinos, expressando as proteínas do vírus influenza aviária (VIA)

(HOESCHER et al., 2007; HOLMAN et al., 2008; SINGH et al., 2008; SINGH et al., 2010).

Neste trabalho, o sistema adenovírus foi utilizado para expressar as proteínas dos vírus aMPV e bRSV. Os genes de fusão (F) e os genes de ligação (G) foram isolados por RT-PCR de culturas de células previamente infectadas com os isolados brasileiros SHS/669/03 e bRSV-25-BR dos vírus aMPV e bRSV, respectivamente. Os genes F foram inseridos no plasmídeo pCR®8/GW/TOPO®, o qual possui sequências que possibilitam a recombinação deste plasmídeo com o vetor adenovírus.

Foi utilizado, para a expressão dos genes de interesse através de recombinação, o sistema conhecido como Gateway Vectors PAd/CMV/V-5-DESTM (Invitrogen). O mesmo sistema Gateway Vectors já foi usado para expressar outras proteínas com sucesso, como descrito na literatura: por Morimoto e colaboradores (2005), para a produção endógena dos ácidos graxos n-3 e n-6 em células de mamíferos; por Scott e outros pesquisadores (2008), para elucidar o papel do gene TMPRSS-2ERG no câncer de próstata; e por Sharmon e colaboradores (2008), que o utilizaram para demonstrar que Sinvastatina inibe *Staphylococcus aureus* em células de invasão no hospedeiro, através da modulação de isoprenóides intermediários.

Lee e colaboradores (2009) também utilizaram o sistema em questão para demonstrar a superexpressão de SIRT1, que protege as células- β do pâncreas contra a toxicidade de citocinas, pela supressão do fator nuclear-kB via de sinalização. Li e outros autores (2004) usaram tal sistema como ferramenta para elucidar o rompimento de glicose e o sensoramento da secreção de insulina pelo gene da ribozima Kir6.2, alvo das células

secretoras de insulina. George & Eo (2011) utilizaram-no para o desenvolvimento de adenovírus recombinantes, expressando a proteína E do vírus da Dengue do tipo 2.

Neste trabalho, foram produzidos dois vírus recombinantes utilizando o sistema Gateway, Ad-aMPV-F e Ad-bRSV-F, contendo os genes F do aMPV e bRSV. Os vírus recombinantes obtidos foram usados para infectar células permissivas HEK-293. Tais células possuem a região E1 do genoma do adenovírus, que é indispensável para a replicação dos vírus recombinantes. As células em questão foram utilizadas em todas as etapas de transfecção e replicação dos adenovírus recombinantes, sendo observado o ECP nestas células. Uma análise transcricional foi feita para avaliar a presença do gene F do aMPV no RNA mensageiro celular, em células HEK-293 e nas células não-permissivas Hep-2.

A análise transcricional revelou que as células permissivas HEK-293 e as células não permissivas Hep-2 estavam, sim, produzindo RNA mensageiro (mRNA) contendo o gene F do aMPV, a partir do amplificado pelo oligonucleotídeo interno ao gene, nas reações de PCR em tempo real, utilizando o gene GAPDH como controle interno da reação. Neste contexto, a utilização das células não-permissivas Hep-2 confere uma vantagem na facilidade e manutenção destas células.

Takahashi e colaboradores (2010), em seus estudos, também investigaram o uso de células não-permissivas A549, em um modelo *in vitro* de replicação do adenovírus recombinante, pertencente ao sorotipo 5 humano (Ad5), na expressão dos genes (gag, pol e nef) do HIV. A habilidade de um adenovírus, baseado em uma vacina, de elicitar uma resposta clínica depende da habilidade do sistema carreador apropriado para a expressão do transcrito, que determina os níveis de expressão do transgene e oferece, como resultado *in vitro*, a relativa potência de uma vacina. Contudo, a expressão do transgene em células não-

permissivas pode reproduzir a modulação dos adenovírus de replicação incompetente, considerando-se o desenvolvimento de uma vacina de adenovírus, a sua dose e a sua potência.

Os adenovírus recombinantes, Ad5, também foram analisados em um gel de poli-acrilamida e, posteriormente, para uma imunomarcação utilizando antissoro contra aMPV produzido em camundongo. Esse anticorpo reconheceu a proteína F (com massa molecular de aproximadamente 50 kDa) na sua forma F1 (com massa molecular de aproximadamente 47 kDa). A proteína F é sintetizada, primeiramente, em F0, que se torna ativa por uma clivagem em duas subunidades, F1 e F2 (COLLINS et al., 1984; GONZÁLEZ-REYES et al., 2001).

Taylor e colaboradores (2007) também utilizaram antissoros para aMPV, preparados em aves infectadas, para análises por *Western Blot*, sendo observado uma forte banda na altura de 55 kDa, que foi previamente identificado como a proteína F (CAVANAGH & BARRET, 1998; COLLINS & COUGHE, 1998; LING & PRINGLE, 1998).

Os baixos níveis de expressão da proteína F e a falta de anticorpo específico contra a proteína resultaram em uma dificuldade para as análises por *Western Blot*. Uma pequena quantidade da proteína F, secretada em células, foi investigada por Boxus e colaboradores (2007), que observaram o impacto do códon otimizado na expressão das proteínas F e N do bRSV, tranfectadas em células COS-7, comparadas com a proteína nativa. Os autores observaram que, 24 horas após a transfecção, a expressão das proteínas foram reveladas com soros contra bRSV e a expressão da proteína F foi detectada nas células que receberam a proteína nativa. Porém, os resultados demonstraram que os níveis de expressão foram maiores nas células tranfectadas com o plasmídeo contendo as sequências do códon otimizado.

No entanto, esse trabalho nos indica que a utilização do códon otimizado pode aumentar os níveis de expressão da proteína F do aMPV.

Para avaliar a resposta de anticorpos IgG, foi desenvolvido um Elisa indireto para a detecção dos adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV, utilizando a estratégia de vacinação de *prime-boost* para a imunização dos animais, que foram capazes de gerar resposta imune humoral, com produção de IgG em todos os animais analisados. A utilização dessa estratégia apresentou um título maior nos níveis de IgG na segunda dose em relação à primeira dose.

A resposta humoral tem um papel importante na proteção curta e de longo prazo contra infecções virais (PRINCE et al., 1985; WEISMAN et al., 2009; FU et al., 2010). Em estudos anteriores, foi demonstrada a imunização com a estratégia *prime-boost*, utilizando adenovírus de replicação defectiva como vetor, expressando a proteína de fusão do vírus respiratório sincicial humano (hRSV). A detecção de IgG no soro e IgA nas mucosas e anticorpos específicos contra hRSV; a resposta de células T CD8⁺ e a proteção em camundongos e cobaias, foram demonstradas por Hsu e colaboradores (1994) e Fu e outros autores (2009).

Os adenovírus recombinantes expressando a proteína F do aMPV induziram uma resposta imune, através da imunização em um modelo murino, e a proteína mostrou-se importante na indução de imunidade (FU et al., 2010).

A patente PCTEP99/07400, depositada na *International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty* (PCT) por Cook, J.K. e colaboradores (1999), foi baseada na expressão da proteína F do aMPV, através da construção de uma vacina de DNA recombinante, sinalizando a importância deste modelo. A imunidade, neste caso, é definida

como uma indução de alto nível de proteção na população animal, depois da vacinação, comparando-se ao grupo não vacinado.

Com base nos nossos resultados, a proteína F do bRSV também foi expressa em um vetor de adenovírus humano. A proteína foi caracterizada como expressa com 90 kDa, o que difere da sua forma inativa F0, que apresenta um peso molecular de 70 kDa. A proteína F é modificada após a tradução por dobragem, clivagem e glicosilação, antes de ser transportada para a superfície celular (COLLINS & MOTTET, 1991). Dependendo da estirpe de bRSV, a proteína F pode ter de três ou quatro locais de N-glicosilação (LERCH et al., 1991).

A glicosilação é uma modificação importante, que pode afetar o transporte, dobra e imunogenicidade de proteínas (DOMS et al., 1993). Porções de hidrato de carbono em glicoproteínas de superfícies, tais como a proteína F, podem modular a imunogenicidade. É também possível que a remoção de hidratos de carbono possa causar uma mudança na conformação do polipeptídeo (KLINK et al., 2003). No entanto, o estudo de Naylor (2006) demonstrou que as alterações são possíveis, sem a perda da viabilidade da proteína.

As razões para essa diferença de tamanho da proteína, comparada com a proteína parental do bRSV, são muito importantes na continuação dos estudos da expressão da proteína F, utilizando o sistema de adenovírus para caracterizar os efeitos de glicosilação e imunogenicidade.

A proteína recombinante pode ser testada em ensaios de proteção contra o bRSV e, potencialmente, para o desenvolvimento de uma vacina. Em adição, pode determinar a habilidade dos vetores adenovirais de indução de anticorpos e uma resposta imune efetiva contra o bRSV em um modelo murino proposto por Spilki e colaboradores (2006).

Os genes G do aMPV e bRSV foram inseridos no vetor de expressão Adeno - X Adenoviral Systems, utilizando *In Fusion* reação, que possibilita a recombinação com o gene de interesse. Os vírus recombinantes obtidos foram utilizados para infectar as células HEK-293 e uma análise transcricional foi realizada para avaliar a presença do gene no RNA mensageiro celular, após infectar as células permissivas HEK-293. Apesar da confirmação do gene, após infectar as células permissivas HEK-293, a recombinação homóloga entre o genoma viral e o cassete de expressão contendo o transgene foi verificada através do aparecimento de fluorescência devido à expressão do gene repórter GFP.

Infelizmente, não foi possível a detecção da proteína pela análise por *Western Blot*, devido ao baixo rendimento na expressão das proteínas. Santos e colaboradores (2007) relataram que são diversos os parâmetros que devem ser considerados para o aperfeiçoamento no processo de expressão do gene de interesse.

Outros autores testaram a capacidade antigênica destas proteínas recombinantes em modelos animais, sendo que a glicoproteína G destes vírus é altamente imunogênica e representa um importante alvo para a resposta imune. Taylor e outros pesquisadores (1997), em seus estudos utilizando recombinantes do vírus vaccinia expressando as proteínas F, G ou N, mostraram que essas proteínas induziram uma resposta específica de anticorpos e de células T, bem como a proteção contra o desafio de uma cepa virulenta do bRSV. Neste estudo e de Antonis e colaboradores (2007), teve-se o uso de recombinantes utilizando o vírus vaccinia, baseado em uma vacina para bRSV e, ao mesmo tempo, houve a utilização destes recombinantes, por exemplo, para um Elisa específico, como foi proposto por Samal e outros autores (1993), que utilizaram a proteína N do bRSV.

Hu e colaboradores (2011) expressaram a proteína G do aMPV do subtipo C utilizando o vírus da doença de Newcastle como vetor e propondo uma vacina bivalente para a vacinação em perus. Em tal estudo, a proteína G induziu parcial proteção e, com estes dados, os autores observaram que a expressão de uma única proteína não é capaz de conferir proteção completa contra o aMPV. Especula-se, portanto, que a coexpressão de mais de uma proteína, por exemplo, às proteínas F, G e ou M, será capaz de induzir uma resposta eficaz e protetora.

Poucos são os estudos que descrevem a expressão das proteínas F e G dos vírus aviário e bovino. Pela primeira vez, as proteínas F destes vírus foram expressas em vetores adenovirais humano e houve a construção de adenovírus recombinantes contendo os genes G do aMPV e bRSV.

O uso destes vetores para expressar proteínas heterólogas tem sido amplamente utilizado para imunização de aves induzindo imunidade local por mucosa e mediada por células. Estes vetores têm sido uma promessa para a indústria avícola, pois induzem proteção e são eficazes contra uma variedade de doenças aviárias (ZESHAN et al., 2010).

CONCLUSÕES

- Este foi o primeiro estudo descrevendo a expressão das proteínas F e G dos vírus aviário (aMPV) e bovino (bRSV) em vetores adenovirais humano;
- A proteína F expressa no sistema adenoviral induziu resposta humoral em camundongas BALB/c;
- Foi demonstrado o ECPs dos adenovírus recombinantes adAMPV-F em células HEK-293;
- A transcrição do gene F do aMPV foi quantificada por PCR em tempo real nas células permissivas HEK-293 e nas células não-permissivas HEp-2;
- A expressão da proteína F do bRSV apresentou uma massa molecular de aproximadamente 90 kDa, indicando alterações na estrutura protéica, estas alterações são possíveis durante o processo de replicação viral, tais como glicosilação e processamento pós-tradução;
- Infelizmente, não foi possível a detecção das proteínas G do aMPV e bRSV pela análise por *Western Blot*, devido ao baixo rendimento na expressão das proteínas. Uma análise transcricional foi realizada para avaliar a presença do gene no RNA mensageiro celular. E a confirmação da recombinação homóloga entre o genoma adenoviral e o cassete de expressão contendo o transgene, foi verificada através do aparecimento de fluorescência devido à expressão do gene repórter GFP.

- E finalmente, a expressão destas proteínas constituirá ferramentas importantes, podendo auxiliar nos experimentos futuros visando a conformação destas proteínas, a identificação de sítios antigênicos, imunização e estudos funcionais tanto como vacinas, quanto na produção de insumos para o imunodiagnóstico de aMPV e bRSV.

**CLONING OF THE TRANSMEMBRANE GLYCOPROTEINS G AND F FROM A
BRAZILIAN ISOLATE OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN A
PROKARYOTIC SYSTEM**

Luciana Helena Antoniassi da Silva, Kiara Cristina Cardoso, Márcio José Da Silva, Fernando
Rosado Spilki, Clarice Weis Arns

Publicado na revista, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Cloning of the transmembrane glycoproteins G and F from a Brazilian isolate of bovine respiratory syncytial virus in a prokaryotic system

[Clonagem das glicoproteínas transmembrana G e F de um isolado brasileiro do vírus respiratório sincicial bovino em sistema procarioto]

L.H.A. Silva¹, K.C. Cardoso², M.J. Silva², F.R. Spilki³, C.W. Arns^{1*}

¹Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Caixa Postal 6109

Rua Monteiro Lobato, 255
13083-970 - Campinas, SP

²Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas, SP

³Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale,
Novo Hamburgo, RS

ABSTRACT

The aim of this work was the cloning of those transmembrane glycoproteins G and F from an isolate bovine respiratory syncytial viruses (BRSV) – a Brazilian isolate of BRSV, named BRSV-25-BR in previous studies, in a prokaryotic system to proceed the sequencing of larger genomic fragments. The nucleotide substitutions were confirmed and these clones may also be used in further studies regarding the biological effects of those proteins *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: bovine respiratory syncytial virus, calves, glycoproteins G and F

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a clonagem das glicoproteínas transmembrana G e F de um isolado de vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) - um isolado brasileiro denominado BRSV-25-BR- que já demonstrou possuir mutações em regiões altamente conservadas do gene da proteína G - em sistema procariótico, com o intuito de sequenciar fragmentos genômicos maiores. As substituições de nucleotídeos foram confirmadas e tais clones podem ser utilizados em futuros estudos sobre os efeitos biológicos destas proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palavras-chave: vírus respiratório sincicial bovino, bezerras, glicoproteínas G e F

INTRODUCTION

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) was first isolated in 1967 (Paccaud and Jacquier, 1970) from calves presenting respiratory distress. The distribution of BRSV is worldwide and it causes severe respiratory disease in young calves, characterized by bronchiolitis and interstitial pneumonia. BRSV is closely related to human respiratory syncytial virus (hRSV), which is a major cause of respiratory disease in young children, and the epidemiology and

pathogenesis of infection for these viruses are similar (Valarcher and Taylor, 2007).

The BRSV belongs to the genus *Pneumovirus*, subfamily *Pneumovirinae*, family *Paramyxoviridae*, *Mononegavirales* order (Vainionpää *et al.*, 1989; Larsen, 2000; Easton *et al.*, 2004). Members of the *Mononegavirales* order possess genomes constituted by a single strand of negative-sense RNA (3' sense). The subfamily *Pneumovirinae* of *Paramyxoviridae* has two genera: the genus *Pneumovirus* contains bovine (RSV) as well as

Recebido em 23 de agosto de 2010
Aceito em 12 de abril de 2011
E-mail: arns@unicamp.br

human, caprine, and ovine RSVs and pneumonia virus of mice; the genus *Metapneumovirus* consists of avian metapneumovirus (aMPV) and human metapneumovirus (hMPV). The genus *Metapneumovirus* differs from the genus *Pneumovirus* on the absence of non-structural proteins NS1 and NS2, and in gene order for the F and M2 genes (Collins *et al.*, 2001).

The BRSV virion consists of a nucleocapsid contained within a lipid envelope. The envelope is a lipid bilayer that is derived from the host plasmatic membrane. It contains three virally encoded transmembrane surface glycoproteins; the attachment protein (G), the fusion protein (F), and the small hydrophobic SH protein (Collins *et al.*, 2001).

The G protein was identified as the major attachment protein because antibodies specific to the G protein blocked the binding of the virus to cells (Levine *et al.*, 1987), playing an important role in the immune response against BRSV infection (Bastien *et al.*, 1997; Buchholz *et al.*, 2000; Spilki *et al.*, 2006a). The G protein is a heavily glycosylated, type II membrane protein that does not share any sequence or structural homologies with attachment proteins of other paramyxoviruses (Wertz *et al.*, 1985) and lacks haemagglutinating and neuraminidase activities (Easton *et al.*, 2004).

Glycoprotein G is composed of three domains: cytoplasmic (AA 1-37) transmembrane (AA 38-65) and extracellular ectodomain (AA 66-257) (Langedijk *et al.*, 1996). The cytoplasmic domain is placed inside the viral envelope; the transmembrane domain runs across the cytoplasmic membrane envelope. Both these sections of the protein are considerably conserved (Stine *et al.*, 1997; Valentova, 2003). The extracellular domain of glycoprotein G is responsible for binding the virus to the sensitive cells, and the greatest differences within all viral proteins are localized there (Lerch *et al.*, 1990). The ectodomain of the virus consists of hydrophobic variable regions and a central conserved region (Doreleijers *et al.*, 1996; Langedijk *et al.*, 1996). The variable regions of the protein are called mucin-like, due to their high content of carbohydrate side-chains bounded to Ser, Thr (O-linked sugars), and Pro (N-linked sugars). The central conserved region is the only relatively fixed and folded part of the

ectodomain of RSV-G, containing four conserved cysteine residues which can form two disulphide bridges. It is speculated that this structure may interact with the host immune system, due to its similarity with fractalkines (Doreleijers *et al.*, 1996; Langedijk *et al.*, 1996). A Brazilian isolate has a major substitution of amino acids in this same region (Spilki *et al.*, 2006a), and studies using this peptide may be of interest to discover whether these features may induce differences in the biological effects of the protein *in vivo*.

Experiments with mutant viruses possessing an induced deletion glycoprotein G coding gene showed that this glycoprotein is not necessary for virus replication *in vitro*, although its replication is considerably decreased in both cell cultures and the respiratory tract of mice. It also seems that glycoprotein G is not the only virus protein with attachment activity, but both the glycoproteins G and F play a role in attachment of the virus to cells (Karger *et al.*, 2001; Techaarpornkul *et al.*, 2001; Teng and Collins, 2002).

The F protein directs viral penetration through the fusion between the virion envelope and the host cell plasma membrane, delivering the nucleocapsid to the cytoplasm. Later in infection, the F protein expressed on the cell surface can mediate fusion with neighboring cells and form syncytia. This is a prominent cytopathic effect and is probably an additional mechanism of viral spread (Collins *et al.*, 2001). The protein is synthesized primarily as the uncleaved precursor F₀ that is cleaved by cellular proteases in the trans-Golgi network to yield the disulfide-linked heterodimer F₂-F₁ (Collins *et al.*, 2001). The F protein induces neutralizing antibodies and confers resistance to BRSV infection (Taylor *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1997; Thomas, *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2005). The F protein in BRSV is 574 AA in length (Lerch *et al.*, 1990; Pастey *et al.*, 1993) and is highly conserved between different BRSV isolates.

The objectives of the present work were to clone the transmembrane glycoproteins G and F from a Brazilian BRSV isolate (antigenic subgroup B) in a prokaryotic system, to examine the nucleotide sequences on the conserved central region G and on particular sites of the F protein in BRSV, furthermore, to show mutations which

are located in the conserved central region G protein demonstrated in previous work and to examine whether there were mutations on the F protein gene.

MATERIAL AND MEHTODS

The Brazilian strain BRSV-25-BR (Arns *et al.*, 2003), was propagated in CRIB cells (Flores and Donis, 1995), a clone of MDBK cells resistant to the infection with BVDV, which is highly susceptible to the infection with BRSV (Flores and Donis, 1995; Spilki *et al.*, 2006b). Cells were cultivated in Eagle's minimal essential medium (E-MEM) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum, free of antibiotics following routine protocols, and titrated through the visualization of syncytia formation in an inverted microscope (Zeiss Axyovert™, Oberkochen, Germany).

RNA was extracted from infected CRIB cultures using High Pure Viral Nucleic extraction kit™ (Roche Diagnostics™, Mannheim, Germany). cDNA was synthesized using SuperscriptIII FirstStrand Synthesis Super Mix™ (Invitrogen Ltd., California, USA) following kit instructions for use with random hexamers. Primer oligonucleotides were originally designed for the present work. PCR of BRSV genes were amplified using specific primers designed for the 3' and 5' flanking regions of the G protein gene, which was the target for polymerase chain reaction. The forward primer BRSVG5 (5' ATG TCC AAC CAT ACC CAC CAT CT 3'); the reverse primer BRSVG3 (5' GGT GAA GAG AGG ATG CCT TG 3') corresponding to amplified products of 752 bp.

For the F protein gene the forward primer BRSVF5 (5' ATA AGG ATG GCG ACA ACA GC 3' was used, annealing to the 3' F protein gene flanking region); the reverse primer BRSVF3 (5' AGG CCA GGC TTT GGT TTA TT 3'), near to the 5' F protein gene flanking region, corresponds to amplified products of 1538 bp.

PCR was done in a 5µL mixture containing 2.5µL of 10X PCR buffer (10mM Tris-HCl Ph 8.0, 50 mM KCl and 0.2mM MgCl2), 1µL of a 10mM dNTPs mixture, 10mM of each primer, 2.5mL of cDNA, and 0.2µL (5U/µL) of Platinum™ High Fidelity DNA Polymerase

(Invitrogen Ltd., California, USA). The amplification was pre-heated for 5min at 95°C, following for 35 cycles, each of them composed of 1min at 94°C (denaturation), 1min at 56°C (annealing), and 1min at 72°C (extension). After the completion of the 35 cycles, a final extension of 7min at 72°C was performed. Amplifications were carried out in a thermal cycler PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems, Perkin-Elmer, California, USA). The PCR products were run on 1% agarose gel and visualized under UV light after being stained with ethidium bromide.

The cloning of PCR product G and F genes was performed by using the plasmid vector pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® (Invitrogen Ltd., California, USA), procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

The cloning reactions pTOPOG and pTOPOF, which transformed pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® construct into competent *Escherichia coli* DH5α (Clontech, Heidelberg, Germany), following the transform heat-shock. The bacterial colonies containing recombinant plasmids were selected in LB medium containing antibiotic spectinomycin (Sigma) and the plasmid DNA was extracted and purified using by Kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Ltd., California, USA), according to the manufacturer's instructions. The presence inserts pTOPOG and pTOPOF, were confirmed by PCR, following the protocol described.

The confirmation of the identity and orientation inserts, the PCR products and pTOPOG and pTOPOF were sequenced using specific primers G and F genes and primers M13 vector were sequenced three times each, both in forward and reverse directions using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems™).

The BioEdit software, version 7.0.5.2 (Hall, 1999), was used to manipulate the nucleotide sequences. Nucleotide alignments were performed using the Clustal W software, version 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Similarity to the PCR products and inserts with complete gene sequences are deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). The BRSV nucleotide sequences and

pTOPOG and pTOPOF nucleotide sequences obtained were submitted to the *GenBank* with access numbers FJ543090 and FJ543091.

RESULTS AND DISCUSSION

The obtained PCR products (Figure 1) were cloned into vector pTOPO generating pTOPOG and pTOPOF. The nucleotide sequences G and F genes were obtained through the partial sequencing of the plasmids pTOPOG and pTOPOF with primer M13. Obtained nucleotide sequences were compared with homolog sequences deposited at *GenBank* using the NCBI BLAST N program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The similarity sequences have demonstrated the higher degree homology 98% for G protein gene and 96% for F protein gene, thus confirming the identity of the target genomic inserts.

Some differences were observed in the deduced amino acid level on the immunodominant region of the G gene. The two cysteins in positions 173 and 176 of the amino acid sequence were replaced by alanine residues, and there were also other substitutions at this site: Ser¹⁷⁴ was replaced by another alanine, Thr¹⁷⁵ was substituted for a histidine and Glu¹⁷⁷, and Gly¹⁷⁸ was replaced by lysine and arginine residues, respectively (Spilki *et al.*, 2006c). The amino acid changes were examined for putative structural changes on the central domain of the protein, and the result is that a major substitution occurred in the cysteine-noose coding region of the Brazilian strain BRSV-25-BR of the G protein (Spilki *et al.*, 2006c).

The mutations described earlier for the G gene protein based on a smaller fragment which was sequenced directly from PCR products were now confirmed using plasmid-cloning based sequencing. No relevant mutations were found on the F protein gene.

In this work the cloning and prokaryotic system was described for the transmembrane glycoproteins G and F of BRSV, which are the main targets of immune response. The neutralizing antibodies are induced by G and F proteins, as evaluated in calves vaccinated with recombinant vaccinia viruses (rVV) encoding these proteins. The high titre of neutralizing

antibodies are induced by F protein, but only a low level of complement-dependent neutralizing antibodies are induced by G protein (Taylor *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998). These antibodies provide predominantly strain-specific immunity, although recombinant vaccines which express only G protein BRSV are able to induce complete protective immunity of the lower and to a lesser extent upper respiratory tract (Shirijver *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998).

The ability to manipulate the genome of BRSV may increase the understanding of the role of different proteins in the pathogenesis of this virus in calves and has provided opportunities for the development of stable, live attenuated virus vaccines, vector vaccines and DNA vaccines. Especially regarding the G protein of the isolate presently cloned, this may be useful to check whether particular features of this protein in such viral isolate may play a biological role or not, since previous work has shown that there is a major mutation between amino acid residues 173 and 178, within the central hydrophobic conserved region, exactly on the site of two of the four cysteine-noose forming cysteine residues, which may interact with the cellular receptor (Valarcher *et al.*, 2000) and plays an important role in the induction of antiviral host immunity (Langedijk *et al.*, 1997).

It may be speculated that the mutations presented by BRSV-25-BR G protein may have been induced by the presence of active and passive naturally acquired immune response against viral infection itself, and the virus may have been selected by infection animals processing antibodies to the virus, which selects antibody escape mutants, as demonstrated *in vitro* for hRSV (Martinez *et al.*, 1997; Melero *et al.*, 1997; Spilki *et al.*, 2006c).

Despite these alterations on the central hydrophobic region of the attachment protein, this virus infects calves efficiently under experimental conditions inducing moderate lesions on the lungs of infected animals (Almeida *et al.*, 2005; Spilki *et al.*, 2006c).

An optimal BRSV vaccine would combine genetic stability, satisfactory growth *in vitro*, high attenuation *in vivo* and a satisfactory level of immunogenicity. Future studies with recombinant viruses represent a particularly

promising avenue for the development of vaccines and research, expressing antigens by virus vectors has proven to be a productive approach for studying *in vitro* and *in vivo* immune responses. An important feature of almost all recombinant viruses is the ability to induce not only humoral, but also cell-mediated immunity (Imler, 1995). Another possible use for the genes cloned on the present work may be as tools for the construction of recombinant vaccine candidates aiming BRSV immunization.

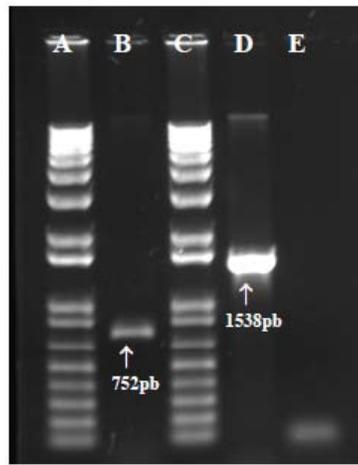


Figure 1. Bovine respiratory syncytial virus G and F gene amplification. RT-PCR was performed in RNA extracted from strain BRSV-25-BR infected CRIB cells for G and F genes. 1% agarose gel and visualized under UV light after being stained with ethidium bromide. A. 1Kb DNA Ladder (Invitrogen Ltd., California, USA); B. strain BRSV-25BR G gene; C. 1Kb DNA Ladder (Invitrogen Ltd., California, USA); D. strain BRSV-25BR F gene and E. Reaction control.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for Doctoral scholarship, process number 2007/07003-4, and Geneci F. Davi, Paula S. S. Porto and Daniela Stancato for technical assistance.

REFERENCES

- ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. *et al.* Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction in experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.*, v.105, p.131-135, 2005.
- ARNS, C.W.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.C.B. *et al.* Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.213-218, 2003.
- BASTIEN, N.; TAYLOR, G.; THOMAS, L.H. *et al.* Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV associated pneumonia in the natural host. *Vaccine*, v.15, p.1385-1390, 1997.
- BUCHHOLZ, U.J.; GRANZOW, H.; SCHULDT, K. *et al.* Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (hRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated hRSV vaccine. *J. Virol.*, v.74, p.1187-1199, 2000.
- COLLINS, P.L.; CHANOCK, R.M.; MURPHY, B.R. Respiratory syncytial virus. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). *Fields virology*, 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2001. p.1443-1486.
- DORELEIJERS, J.F.; LANGEDIJK, J.P.; HARD, K. *et al.* Solution structure of the immunodominant region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *Biochemistry*, v.35, p.14684-14688, 1996.
- EASTON, A.J.; DOMACHOWSKA, J.B.; ROSENBERG, H.F. Animal pneumoviruses: Molecular genetics and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.17, p.390-412, 2004.
- FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDBK Cell-Line resistant to bovine viral diarrhea virus-infection due to a block in viral entry. *Virology*, v.208, p.565-575, 1995.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.

- IMLER, J.L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine*, v.13, p.1143-1151, 1995.
- KARGER, A.; SCHMIDT, U.; BUCHHOLZ, U.J. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J. Gen. Virol.*, v.82, p.631-640, 2001.
- LANGEDIJK J.P.; SCHAAPER, W.M.; MELEON, R.H. *et al.* Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.1249-1257, 1996.
- LANGEDIJK J.P.; MELEON, R.H.; TAYLOR, G. *et al.* Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, v.243, p.293-302, 1997.
- LARSEN, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet. Scand.*, v.41, p.1-21, 2000.
- LERCH, R.A.; ANDERSON, K.; WERTZ, G.W. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, v.64, p.5559-5569, 1990.
- LEVINE, S.; KLAIBER FRANCO, R.; PARADISO, P.R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, v.68, p.2521-2524, 1987.
- MARTINEZ, I.; DOPAZO, J.; MELERO, J.A. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2001-2004, 1997.
- MELERO, J.A.; GARCIA-BARRENO, B.; MARTINEZ, I. *et al.* Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.2411-2418, 1997.
- PACCAUD, M.F.; JACQUIER, C.A. Respiratory syncytial virus of bovine origin. *Archiv. Gesamte Virusforschung*, v.30, p.327, 1970.
- PASTEY, M.K.; SAMAL, S.K. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein. *Virus Res.*, v.29, p.195-202, 1993.
- SCHRIJVER, R.S.; LANGEDIJK, J.P.M.; vander POEL, J.P.M. *et al.* Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.3, p.500-506, 1996.
- SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; DOMINGUES, H.G. *et al.* Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. *Virus Res.*, v.116, p.30-37, 2006a.
- SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; CAMPALANS, J. *et al.* Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods*, v.131, p.130-133, 2006b.
- SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; FERREIRA, H.L. *et al.* Effects of experimental inoculation of bovine respiratory syncytial virus in different inbred mice lineages: Establishment of a murine model for BRSV infection. *Vet. Microbiol.*, v.118, p.161-168, 2006c.
- STINE, L.C.; HOPPE, D.K.; KELLING, C.L. Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.201-221, 1997.
- TAYLOR, G.; STOTT, E.J.; FURZE, J. *et al.* Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, v.73, p.2217-2223, 1992.
- TAYLOR, G.; THOMAS, L.H.; FURZE, F.A.M. *et al.* Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.3195-3206, 1997.
- TAYLOR, G.; RIJSEWIJK, F.A.M.; THOMAS, L.H. *et al.* Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. *J. Gen. Virol.*, v.79, p.1759-1767, 1998.

- TAYLOR, G.; BRUCE, C.; BARBET, A.F. *et al.* DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccine*, v.23, p.1242-1250, 2005.
- TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M.E. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J. Virol.*, v.75, p.6825-6834, 2001.
- TENG, M.N.; COLLINS, P.L. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection *in vitro* or *in vivo*. *J. Virol.*, v.76, p.6164-6171, 2002.
- THOMAS, L.H.; COOK, R.S.; WYLD, S.G. *et al.* Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.*, v.177, p.874-880, 1998.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- VAINIONPÄÄ, R.; MARUSYK, R.; SALMI, A. The Paramyxoviridae aspects of molecular structure, pathogenesis, and immunity. *Adv. Virus Res.*, v.37, p.211-242, 1989.
- VALARCHER, J.F.; SCHELCHER, F.; BOURHY, H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, v.74, p.10714-10728, 2000.
- VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.*, v.38, p.153-180, 2007.
- VALENTOVA, V. The antigenic and genetic variability of bovine respiratory syncytial virus with emphasis on the G protein. *Med., Czech*, v.48, p.254-266, 2003.
- WERTZ, G.W.; COLLINS, P.L.; HUANG, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.82, p.4075-4079, 1985.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada **“DESENVOLVIMENTO DE ADENOVÍRUS RECOMBINANTES EXPRESSANDO AS GLICOPROTEÍNAS F E G DO METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO (aMPV) E DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (bRSV)”**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

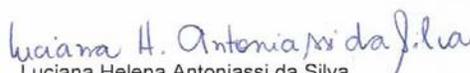
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

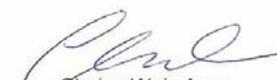
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2009/II-01 , Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2958-1 e 2959-1 , Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Luciana Helena Antoniassi da Silva
Aluno: (nome completo)


Clarice Weis Arns
Orientador: (nome completo)

Profª Drª Clarice Weis Arns
Laboratório de Genética
Depto. Genética, Evolução e Biogêntes
Instituto de Biologia - UNICAMP
13083-970 - Campinas - SP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido () Indeferido


Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

REFERÊNCIAS

Almeida R.S., Spilki F.R., Roehle P.M. & Arns C.W. Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction in experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology* 2005; (105): 131-135.

Anon. Roche Avian Pneumovirus Workshop. Roche Animal Nutrition and Health.

St Cloud, USA, 1998; 10.

Antonis, A.F.G., van der Most, R.G., Suezer, Y., Stockhofe-Zurwieden, N., Daus, F., Sutter, G., Schrijver, R.S. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves RSV challenge. *Vaccinia* 2007; 25(15):4818-4827.

Arns, C.W. & Hafez, H.M. Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. 44th Western Poultry Diseases Conference. Sacramento, California, USA., 1995; 124-125.

Arns, C. W., J. Campalans, *et al.* Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36(2): 213-218. 2003.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. & Struhl, K., Eds. *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY). 1995.

Baker, J. C. Human and Bovine Respiratory Syncytial Virus - Immunopathological Mechanisms. *Veterinary Quarterly* 1991; 13(1): 47-59.

Banet-Noach C., Simanov, L., Laham-Karam, N., Perk, S., Bacharach, E. Longitudinal survey of avian metapneumoviruses in poultry in Israel: infiltration of field strains into vaccinated flocks. *Avian Diseases* 2009; 53(2):184-189.

Bäyon-Auboyer, M. H., C. Arnauld, *et al.* Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *Journal of General Virology* 2000; 81(11): 2723-2733.

Bell, I. G. & D. J. Alexander. Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis virus in Australian poultry flocks. *Australian Veterinary Journal* 1990; 67(6): 232-3.

Bennett, R.S., McComb, B., Shin, H.J., Njenga, M.K. Nagaraja, K.V., Halvorson, D.A. Detection of avian pneumovirus in wild Canada geese (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*). *Avian Diseases* 2002; (46):1025-1029.

Bennett, R.S., Nezworski, J., Velayudhan, B.T., Nagaraja, K.V., Zeman, D.H., Dyer, N., Graham, T., Lauer, D.C., Nenga, M.K., Halvorson, D.A. Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Diseases* 2004; (48):902-908.

Bidokhti, M.R., Traven, M., Ohlson, A. Zarnegar, B., Baule, C., Belak, S., Alenius, S., Liu, L. Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. *Arch Virol* 2012; (157):601-607.

Buckland R & Wild, F. Leucine zipper motif extends. *Nature* 1989; 338:547.

Buys, S. B. & Du Preez, J. H. A preliminary report on the isolation of virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 1980a; (28):36-46.

Buys, S. B., Du Preez, J. H., *et al.* The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1989b; 56(2):87-98. .

Cadman, H. F., P. J. Kelly, *et al.* A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Diseases* 1994; 38(3): 621-625.

Catelli, E., De Marco, A., Delogu, M., Terregino, C., Guberti, V. Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Veterinary Record* 2001; (149):56-58.

Catelli E., M. Cecchinato, *et al.* Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine* 2006; (24): 6476–82.

Catelli E., Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Brown P., Naylor C. J. Field avian metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine* 2010; 28(4): 916-921.

Cananagh, D. & Barrett, T. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Research* 1988; 11(3):241-256.

Cecchinato M., E. Catelli, *et al.* Evidence of AMPV attachment protein evolution coincident with mass live vaccine introduction in Italy. Proceedings of the VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 2009.

Chacón, J.L., Brandão, P.E., Buim, M., Villarreal, L., Piantino Ferreira, A. J. Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. *Avian Pathology* 2007; 36(5): 383-387.

Chacón, J.L., Mizuma, M., Vejarano, M.P., Toquin, D., Eterradossi, N, Patnavak, D.P., Goyal, S.M., Ferreira, A.J. Avian metapneumovirus subtypes circulating in Brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey farms. *Avian Dis* 2011; 55(1):82-89.

Chambers, P., Pringle, C.R., Easton, A.J. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 1990; 71:3075:3080.

Chang, A & Dutch, R.E. Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses* 2012; 4:613-636.

Collins, P. L., Y. T. Huang, *et al.* Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81(24): 7683-7687.

Collins, P.L. & Mottet, G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 1991; (72):3095-3101.

Collins, M. S., R. E. Gough, *et al.* Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 1993; (22): 469-479.

Collins, P.L., Chanock, R.M., Murphy, B.R. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley PM, Editors *Fields virology*, 4th edn. Lippincott-Williams and Wilkns, Philadelphia: 2001 p1443:1486.

Hu, H., Roth, J.P., Estevez, C.N., Zsal, L., Liu, B., Yu, Q. Generation and evaluation of a recombinant Newcastle disease virus expressing the glycoprotein (G) of avian metapneumovirus subgroup V as a bivalent vaccine in turkeys. *Vaccine* 2011;3(39):8624-8633.

Cook, J. K., Huggins, M.B. *et al.* Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Record* 1995; (136): 392-393.

Cook, J. K. A., F. Orthel, *et al.* An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and the prevention of its clinical effects using live-attenuated and inactivated TRT vaccines. *Avian Pathology* 1996; (25): 231-243.

Cook, J. K. A., M. B. Huggins, *et al.* Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathology* 1999; (28): 607-617.

Cook, J. K. Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *The Veterinary Journal* 2000; (160):118-125.

Cook J. K., Huggins, M.B. *et al.* Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology* 2001; (30): 233-42.

Cook J. K. Avian Metapneumovirus – Nearly 30 years of vaccination. In *Proceedings of the VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens*. Rauschholzhausen, Germany, 2009.

Coswig, L.T., dos Santos, M.B., Hafez, H.M., Ferreira, H.L., Arns, C.W. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell systems. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1):1-4.

D' Arce, R.C., Coswing, L.T., Almeida, R.S., Trevisol, I.M., Monteiro, M.C.B., Rossini, L.I., Di Fabio, J., Hafez, H.M, Arns, C.W. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested - polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 2005; 34(2): 133-136.

Dani, M. A., E. L. Durigon., Arns, C.W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of Virological Methods* 1999; 79(2): 237-41.

Deng, Q., Song, M., Demers, A., Weng, A., Weng, Y., Lu, W., Wang, D., Kaushik, R.S., Yu, Q., Li, F. Biochemical characterization of the small hydrophobic protein of avian metapneumovirus. *Virus Research* 2012; 167:297-301.

Diaz De Espada, E. e M. E. Perona. Etiología del síndrome de cabeza hinchada. *Revista de la Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica* 1984; (40): 36-42.

Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K., Helenius, A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 1993;(193):545-562.

Draper, S., & Heeney, J. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. Reviews. 2009.

Driemeier, D., Gomes, M.J.P., Moojen, V., Arns, C.W., Vogg, G., Kessler, L., da Costa, U.M. Clinico-pathological aspects in the natural infection of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) in extensive management of cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. Pesquisa Veterinaria Brasileira 1997; (17): 77-81.

Drouin, P., J. Toux, Y. *et al.* Le Syndrome infectieux de la grosse lité chez L'.especie poule. L'.Aviculteur 1985; (460): 93-96.

Earp, L.J., Delos, S.E., Park, H.E., White, J.M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. Curr Trop Microbiol 2004; 285:25:66.

Easton, A.J., Domachowske, J.B., Rosenberg, H.F. Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. Clin Microb Rev 2004; 17:390:412.

Ellis, J.A., Russell, H., Cavender, J., Haven, T.R. Bovine Respiratory Syncytial Virus-Specific Immune-Responses in Cattle Following Immunization with Modified-Live and Inactivated Vaccines-Analysis of the Specificity and Activity of Serum Antibodies. Veter Immunol and Immunopat 1992; 34:35:45.

Ellis J.A. The immunology of the bovine respiratory disease complex. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice 2001; (17): 535.

Ellis, J., West, K. *et al.* Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. Journal of the American Veterinary Medical Association 2001; 218(12):1973-1980.

Ellis, J.A., West, K.H. *et al.* Efficacy of a saponin-adjuvanted inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne, 2005; 46(2): 155-162.

Eterradossi, N., D. Toquin, *et al.* Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. Zentralblatt für Veterinarmedizin, Reihe B 1995; (42): 175-186.

Felippe, P.A.N., da Silva, L.H.A., Santos, M.M.A.B., Sakata, S.T., Arns, C.W. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology* 2011; 40(5):445-452.

Ferreira, T.B., Alves, P.M., Aunins, J.G., Carrondo, M.J.T. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Therapy* 2005; (12): S73-S83.

Flores, E. F. e R. O. Donis. Isolation of a Mutant Mdbk Cell-Line Resistant to Bovine Viral Diarrhea Virus-Infection Due to a Block in Viral Entry. *Virology*, v.208, n.2, Apr, p.565-575. 1995.

Frankena, K., C. H. L. Klaassen, *et al.* Double-Blind Field-Evaluation of a Trivalent Vaccine against Respiratory-Disease in Veal Calves. *Veterinary Quarterly* 1994; 16(3): 148-152.

Ganapathy K, P. Cargill, *et al.* Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. *Avian Pathology* 2005; (34): 297-302.

Gao, W., Soloff, A.C., Lu, X., Montecalvo, A., Nguyen, D.C., Matsuoka, Y., Robbins, P.D., Swayne, D.E., Donis, R.O. Protection of Mice and Poultry from Lethal H5N1 Avian Influenza Virus through Adenovirus-Based Immunization. *Journal of Virology* 2006; 80(4): 1959-1964.

Gonçalves I.P.D., Simanke, A.T., Jost, H.C., Hötzel, I., Dal Soglio A. & Moojen, V.

Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 1993; (3):389-390.

Goren, E. A 'new disease' in chickens; diagnostic findings. *Tijdschr Diergeneeskd* 1985; (15): 1076-1077.

Graham, F.L., Smiley, J.S., Russel, W.C., Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal General Virology*. v.36, p.59-74.1977.

Gulati, B.R., Patnayak, D.P. *et al.* Protective efficacy of high-passage avian pneumovirus (APV/MN/turkey/1-a/97) in turkeys. *Avian Diseases* 2001; (45):593-597.

Hacking, D. & Hull, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Response. *J Infect* 2002; 45:18:24.

Heffels-Redmann, U., Neumann, U. *et al.* Serological_evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Rauischholshausen, Germany, 1998; 23-25.

Hoelscher, M.A., Jayashankar, L., Garg, S.,Veguilla, V., Lu, X., Singh, N., Kartz, J.M., Mittal., S.K., Sambhara, S. New pandemic influenza vaccines: an egg-and adjuvant-independent human adenoviral vector strategy induces long-lasting protective immune responses in mice. *Clin. Pharmacol. Therapy* 2007; 82(6):665-671.

Holman, D.H., Wang, D., Raja, N.U., Luo, M., Moore, K.M., Woraratanadharm, J., Mytle, N., Dong, J.Y. Multi-antigen vaccines based on complex adenovirus vectors induce protective immune responses against H5N1 avian influenza viruses. *Vaccine* 2008; (26):2627-2639.

Jones, R. C., R. A. Williams, *et al.* Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian Pathology* 1988; (17): 841-850.

Jones, R. C. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. *Avian Pathology* 1996; (25): 639-648.

Jones, R.C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections and IB): problems of vaccine control. XVI world veterinary poultry association congress, Marrakesh, Morocco, 2009; 35-44.

Juhasz, K. & Easton, A. J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology* 1994; 75(11): 2873-80.

Karger, A., Schimidt, U. & Buchholz, U. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J Gen Virol* 2001; 82:631:640.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; (41):95-98.

Heckert, R. A. & D. J. Myers. Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian poultry. *Veterinary Record* 1993; (132): 172. 1993.

Kimman, T.G. The Immune-Response to and Pathogenesis of Brsv Infections. *Veterinary Medicine* 1993; 88(12): 1196-&.

Kingsbury, D.W. Paramyxoviridae and Their Replication. In B N Fields, *Virology*. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia: 1990 p945:962.

Krempl, C., Murphy, B.R. & Collins, P.L. Recombinant Respiratory Syncytial Virus with the G and F Genes Shifted to the Promoter-Proximal Positions. *J Virol* 2002; 76:11931:11942.

Klink, H.A., Brady, R.P., Topliff, C.L., Eskridge, K.M., Srikumaran, S., Kelling, C.L. Influence of bovine respiratory syncytial virus F glycoprotein N-linked glycans on in vitro expression and on antibody responses in BALB/c mice. *Vaccine* 2006; (24):3388-3395.

Lamb, R.A. Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. *Virol* 1993; 197:1:11.

Lamberts, D.M., Barney, S., Lambert, A.L. *et al.* Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2186:2191.

Langedijk, J.P.M., Groot, B.L., Berendsen, H.J.C., van Oirschot, J.T. Structural Homology of the Central Conserved Region of the Attachment Protein G of Respiratory Syncytial Virus with the Fourth Subdomain of 55-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Virology* 1998; 243:293-302.

Larsen, L. E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): A review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2000; 41(1): 1-24.

Le Bayon, J.C., Lina, B., Rosa-Calatrava, M., Boivin, G. Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines. *Reviews in Medical Virology*. 2013; 23(1):15-34.

Lee, E.H., Song, M.S., Shin, J.Y., Lee, Y.M., Kim, C.J., Lee, Y.S., Kim, H., Choi, Y.K. Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market. *Virus Research* 2007;(128):18-25.

Lee, J.H., Song, M.Y., Song, E.K., Kim, E.K., Moon, W.S., Han, M, K., Park, J.W., Kwon, K.B., Park, B.H. Overexpression on SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 2009; 58(2): 344-351.

Lerch, R.A., Anderson, K., Amann, V.L., Wertz, G.W. Nucleotide sequence of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein of mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. *Virology* 1991; (181):118-131.

Levine S, Klaiber FR, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1987; (68):2521-2524.

Li, L., Rojas, A., Wu, J., Jiang, C. Disruption of Glucose Sensing and Insulin Secretion by Ribozyme Kir6.2-Gene Targeting in Insulin-Secreting Cells. *Endocrinology* 2004; (145): 4408-4414.

Masot, A.J., Kekking, C.L., Lopez, O., Sur, J.H., Redondo, E. In situ hybridization detection of bovine respiratory syncytial virus in the lung of experimentally infected lambs. *Vet Pathol* 2000; (37):618-625.

Mink MA, Stec DS, Collins PL. Nucleotide Sequences of the 3' Leader and 5' Trailer Regions of Human Respiratory Syncytial Virus Genomic RNA. *Virology* 1991; 186: 615:24.

Moraes, M.P., Mayr, G.A., Grubman, P.W. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* 2002; (20): 1631-1639.

Moraes & Costa. *Virologia Veterinária/ Eduardo Furtado Flores – Santa Maria: Ed da UFSM, 2007.*

Morimoto, K.C., Van Eenennaam A.L., DePeters, E.J., Medrano, J.F. Endogenous production of n-3 and n-6 fatty acids in mammalian cells. *J Dairy Sci* 2005; 88(3): 1142-1146.

Morley, A. J. e D. K. Thomson. Swollen head syndrome in broiler chickens. *Avian Diseases* 1984; (28): 338-343.

Morrison TG. Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 1988; 10:113:135.

Mullan, B., Dugué, C., Moutard, V., Raoux, D., Tremp, G., Denèfle, P., Perricaudet, M., Robert, J.J. Robust functional gene validation by adenoviral vectors: one-step Escheria coli-Derived Recombinant Adenoviral Genome construction. *Gene Therapy* 2004; (11): 1599-1605.

Munir, S. & Kapur, V. Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host-pathogen interactions. *Journal of Virology* 2003; (77): 4899-4910.

Narumiya S. The small GTPase Rhoa: cellular functions and signal transduction. *J Biochem* 1996; 120:215:228.

O'Brien, J. D. Swollen head syndrome in broiler breeders. *Veterinary Record* 1985; (117): 619-620.

Naylor, E.J. A method of exchanging RNA sequences between protective and unprotective candidate APV vaccines reveals some regions important in stimulating protection. V. In: *International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens* 2006; 98-102.

Paccaud, M.F. & Jacquier, C. A Respiratory Syncytial Virus of Bovine Origin. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung* 1970; 30(4): 327-342.

Pastey MK, Crowe JE, Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol* 1999; 73:7262:7270.

Perelman, B., M. Meroz, *et al.* Swollen Head Syndrome in broiler breeders in Israel. *Veterinary Record* 1988; (123): 444.

Picault, J. P., P. Giraud, *et al.* Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Veterinary Record* 1987; (121): 135. 1987.

Raaperi, K., Bougeard, S., Aleksejev, A., Orro, T., Viltrop, A. Association of heard BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Vet Scand* 2012; (54):4.

Ramos, O.S., Pose, A.G., Gómez-Puerta, S., Gómez, J.N., Redondo, A.V., Benites, J.C.A., Amarán, L.S., Parra, N.C., Alonso, J.R.T. Avian CD154 humoral and cellular immune responses induced by an adenovirus vector-based vaccine in chickens. *Comp. Immu. Micro. Infectious of. Diseases* 2011; (34):259-265.

Reed, L.J. & Muench, H.A. A simple methods of estimating fifty percent en points. *Am J Hyg* 1938; (27):493-497.

Ruiz-Arguello, MB, Martin D, Wharton SA, Calder LJ, Martin SR, Cano O, Calero M, Garcia-Barreno B, Skehel JJ, Melero JA. Thermostability of the human respiratory

syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J Gen Virol* 2004; 85:3677:3687.

Russel, W.C. Update on adenovirus and its vectors. *Journal General Virology* 2000; (81): 2573-2604.

Saa, L.R., Perea, A., Jará, D.V., Arenas, A.J., Garcia-Bocanegra, I., Borge, C., Carbonero, A. Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod* 2012; (44): 1423-1427.

Samal, S.K., Pastey, M.K., McPhillips, T., Carmel, D.K., Mohanty, S.B. Reliable confirmation of antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) by enzyme-linked immunosorbent assay using BRSV nucleocapsid protein expressed in insect cells. *Journal of Clinical Microbiological* 1993; (31):3147-3152.

Sarmiento-Silva, R.E., Nakamura-Lopez, Y., Vaughan, G. Epidemiology, Molecular and Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Viruses* 2012; (4): 3452-3467.

Schelender J, Zimmer G, Herrler G, Conszelmann KK. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* 2003; 77:4609:4616.

Schickli, JH, Kaur J, Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS. An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. *J Virol* 2005; 79:10678:10689.

Schrijver, R.S., Langedijk, J.P.M. *et al.* Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine* 1997; 15(17-18): 1908-1916.

Seal, B. S. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Research* 1998; 58(1-2): 45-52.

Singh, N., Pandey, A., Jayashankar, ., Mittal., S.K. Bovine adenoviral vector-based H5N1 influenza vaccine overcomes exceptionally high levels of pre-existing immunity against human adenovirus. *Mol.Ther* 2008; 16(5):965-971.

Singh, S., Toro, H., Tang, D. Briles, W.E., Yates, L.M., Kopulos, R.T., Collisson, E.W. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8⁺ T lymphocytes. *Virology* 2010; (405):62-69.

Shin, H.J., Njenga, M.K., McComb, B., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; (38):4282-4284.

Smith, A.L., Tignor, G.H., Mifune, K. & Motohashi, T. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology* 1977; (8):92-99.

Spilki, FR. Análise Filogenética de Isolados Autóctones do Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e Aprimoramento de um Modelo Experimental em Camundongos Dissertação (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 2006.

Spilki, F.R. & Arns, C.W. Vírus respiratório sincicial bovino. *Acta Scientiae Veterinarie* 2008; 36(3):197-214.

Stuart, J. C. Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. *Recent*

Advances in Turkey science, Poultry Science Symposium. London: Butterworth,

1989; 217-224.

Tan, R., Li, C., Jiang, S., Ma, L. A novel and simple method for construction of recombinant adenoviruses. *Nucleic Acids Research* 2006; 34(12): 1-8.

Tang, D.C., Zhang, J., Toro, H., Shi, Z., Van Kampen, K.R. Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(4):469-481.

Taylor, G., Thomas, L.H., Furze, J.M., Cook, R.S., Wyd, S.G., Lerch, R., Hardy, R., Wertz, G.W. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *Journal of General Virology* 1997;(78):3195-3206.

Taylor, G., Rijsewijk, F. A. *et al.* Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. *Journal General of Virology* 1998; 79(7):1759-1767.

Taylor, G., Bruce, C. *et al.* DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccine* 2005; 23(10):1242-1250.

Thompson JD, Higgins, DG, Gibson, TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; (22):4673-4680.

Toquin, D., N. Eterradossi, *et al.* Use of a related ELISA antigen for efficient RT serological testing following live vaccination. *Veterinary Record* 1996; (139): 71-72.

Toquin, D., Guionie, O., Jestin, V., Zwingelstein, F., Allee, C., Eterradossi, N. European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineales. *Virus Genes* 2006; (32):97-103.

Toro, H., H. Hidalgo, *et al.* Serologic evidence of pneumovirus in Chile. *Avian Diseases* 1998; (42): 815-817.

Toro, H., Tang, D., Suarez, D., Sylte, M., Pfeiffer, J., Van Kampen, K. R. Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine* 2007; (25): 2886-2891.

Toro, H., Tang, D., Suarez, Zhang, J., Shi, Z. Protection of chickens against avian influenza with non-replicating human adenovirus vaccine. *Vaccine* 2008; (26): 2640-2646. .

Turpin, E.A., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Zsak, L., Swayne, D.E. Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathology* 2008; (37):343-351.

Valarcher, J.F. & Taylor, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary Research* 2007; 38: 153-180.

Van Donkersgoed, J., Vandenhurk, J.V. *et al.* Comparative Serological Responses in Calves to 8 Commercial Vaccines against Infectious Bovine-Rhinotracheitis, Parainfluenza-3, Bovine Respiratory Syncytial, and Bovine Viral Diarrhea Viruses. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 1991; 32(12): 727-733.

van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. *Virol* 2002; 295:119:132.

Van der Poel WH, Brand A, Kramps JA, Van Oirschot JT. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J Infect* 1994; (29):215:228.

Van de Zande, S., H. Nauwynck, *et al.* Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Veterinary Record* 2000; (147): 132-134.

Verhoeff, J., Van der Ban M. & Van Nieuwstadt. A.P.K.M.I. Bovine Respiratory Syncytial Virus-Infections in Young Dairy-Cattle – Clinical and Hematological Findings. *Veterinary Record* 1984; (114): 9-12.

Villarreal, L.Y.B., Sandri, T.L., *et al.* Field observations after natural infection of Brazilian layer chickens with a phylogenetically divergent lineage of subtype B AMPV. *Proceedings*

of the VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauischholzhausen, Germany, 2009.

Wechsler, S.L., Lambert, D.M., Galinski, M.S., Heineke, B.E, Lambert, A.L., Mink M, Rochovansky OM, Pons MW. A simple method for increased recovery of purified paramyxovirus virions. *J Virol Methods* 1985; 12:179:182.

Wei, Y., Feng, K., Yao, X., Cai, H., Li, J., Mirza, A.M., Iorio, R.M., Li, J. Localization of a Region in the Fusion Protein of Avian Metaneumovirus That Modulates Cell-Cell Fusion. *Journal of Virology* 2012; 86(21):11800-1184.

West, K., Petrie, L. *et al.* The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. *Vaccine* 1999; 18(9-10):907-919.

Wyeth, P.I., N.I., Chettle, *et al.* Antibodies to TRT in chickens with swollen head syndrome. *Veterinary Record* 1987; 120: 286-287.

Zeshan, B., Zhang, L., Bai, J., Wang, X., Xu, J., Jiang, P. Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered *in ovo*. *Journal of Virological Methods* 2010; (166):54-59.