

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA TRANSFEÇÃO DE DNA DE
HERPESVÍRUS BOVINO POR FOSFATO DE CÁLCIO, UTILIZANDO-SE
DIFERENTES TIPOS CELULARES**

EDUARDO BORTOLUZZI DORNELLES
Biólogo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Maio de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA TRANSFEÇÃO DE DNA DE
HERPESVÍRUS BOVINO POR FOSFATO DE CÁLCIO, UTILIZANDO-SE
DIFERENTES TIPOS CELULARES**

EDUARDO BORTOLUZZI DORNELLES
Biólogo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Maio de 2009

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação representa a concretização de um grande esforço, contando com a cooperação de diversas instituições, profissionais, amigos e familiares, aos quais sou imensamente grato.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Um especial agradecimento ao Dr. Frans Rijsewijk, pela amizade, apoio, compreensão, paciência e dedicação.

À Prof^a. Ana Cláudia Franco e ao Prof. Dr. Paulo Roehe, por toda ajuda, atenção e acompanhamento neste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Amauri Braga Simonetti, por me aceitar como orientando.

Aos meus pais, Edione e Luiz, pelo acompanhamento constante, com seus sábios conselhos e um amor incondicional, durante estes 2 anos de minha vida profissional.

A minha Tia Sonia e meus primos, que tantas vezes me deram força, principalmente nas horas difíceis, dedicando-me atenção.

À minha namorada Lilian, pela paciência e pelo grande apoio durante este período.

Ao Sr. Ernesto, pela amizade e pelos sábios conselhos.

Gostaria de agradecer aos amigos dos Laboratórios de virologia do IPVDF, ICBS/UFRGS, ULBRA: Ana Paula, André, Anna Paula, Cenci, Dadá, Dennis, Dinler, Diógenes, Eber, Esmale, Fabrício, Franco, Fábio, F. Torres, Gustavo, Helton, Hiran, Jarbas, Ju, Lucas, Luciana, Manu, Martha, Nathália, Samuel, Thaís, aos colegas da pós-graduação e do laboratório de parasitologia.

Aos grandes amigos que souberam me entender nos momentos de ausência.

Às instituições: ULBRA, IPVDF e a UFRGS, que mantiveram as portas abertas para a execução deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do mestrado.

Finalmente, gostaria de expressar a minha gratidão a todos que, de alguma forma, estiveram envolvidos neste trabalho.

PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE TRANSFEÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS BOVINO POR FOSFATO DE CÁLCIO, UTILIZANDO-SE DIFERENTES TIPOS CELULARES

Autor: Eduardo Bortoluzzi Dornelles

Orientador: Amauri Braga Simonetti

RESUMO

As condições para uma eficiente transfeção pelo método de fosfato de cálcio podem variar substancialmente. Neste estudo foi estabelecido o tipo de célula apropriada para transfeção de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). Para atingir este objetivo foram testadas amostras de DNA de células infectadas com BoHV-1gE-, DNA purificado de BoHV-5, assim como DNA de 3 plasmídeos. Este material foi transfectado em células de rim de macaco verde africano (VERO), de rim de suíno (PKsC3), de testículo de terneiro (TT) e células de rim de bovino (MDBK) e células resistentes a vírus da diarreia viral bovina (CRIB). Os procedimentos da transfeção com DNA plasmideal expressando o gene repórter EGFP foram feitos para identificar as melhores células transfectadas. Os resultados mostraram um percentual de 0,5% de células fluorescentes para VERO, 2,9% para PKsC3, 4,5% para TT e 0,05% para MDBK. Foi averiguada a capacidade do BoHV-5 de se replicar nestes quatro tipos de células. Uma amostra de vírus foi titulada em células VERO, PKsC3, TT e MDBK. Células VERO e PKsC3 apresentaram um título de $10^{3,3}$ TCID/mL, enquanto que as células MDBK mostraram um título de $10^{6,8}$ TCID/mL, o mesmo encontrado para as células TT. Quando células PKsC3 e TT foram transfectadas com 0,5 μ g de DNA purificado de BoHV-5, somente as células TT apresentaram resultado positivo com duas placas virais por poço em placa de seis poços. Para investigar a influência da concentração de DNA viral, células TT foram transfectadas com 0,5 μ g e 1 μ g de DNA purificado de BoHV-5, sendo verificadas 2 e 4 placas, respectivamente. Estes resultados indicam que as células TT são boas candidatas para serem utilizadas na transfeção de DNA de BoHV-5, no entanto, experimentos adicionais são necessários para melhorar a eficiência de transfeção neste tipo de célula.

STANDARDIZATION OF A METHOD FOR TRANSFECTION OF BOVINE HERPES VIRUS DNA BY CALCIUM PHOSPHATE USING DIFFERENT CELL TYPES¹

Author: Eduardo Bortoluzzi Dornelles

Supervisor: Amauri Braga Simonetti

ABSTRACT

The conditions for efficient transfection using the calcium phosphate technique may vary substantially. In this study it was the type of cell suitable for transfection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5). To achieve this goal DNA samples from cells infected with BoHV-1gE-, purified DNA from BoHV-5, as well as three plasmid DNA were tested. This material was transfected into cells of African green monkey kidney (VERO), pig kidney cells (PKsC3), calf testicle cells (TT), bovine kidney cells (MDBK) and kidney cells resistant to bovine viral diarrhea virus (CRIB). The procedures of transfection with DNA plasmideal expressing the EGFP reporter gene were carried out to identify the best transfected cells. Results showed 0.5% of fluorescent cells for VERO, 2.9% for PKsC3, 4.5% for TT and 0.05% for MDBK cells. It was also investigated the ability of BoHV-5 to replicate in these four types of cells. A sample of virus was titrated in VERO, PKsC3, TT and MDBK cells. VERO and PKsC3 cells presented a titre of $10^{3.3}$ TCID/mL, whereas MDBK cells reached a value of $10^{6.8}$ TCID/mL, the same displayed by TT cells. When PKsC3 and TT cells were transfected with 0.5 g of BoHV-5 purified DNA, only TT cells gave positive result with two viral plaques per well in six-well plate. To investigate the influence of viral DNA concentration, TT cells were transfected with 0.5 mg and 1 g of BoHV-5 purified DNA, which yielded 2 and 4 plates, respectively. These results indicate that TT cells are good candidates for using in transfection of BoHV-5 DNA, however, additional experiments are needed to improve the efficiency of transfection in this type of cell.

¹Master of Science Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (76 p.) Maio, 2009.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Histórico.....	03
2.2 Patogenia e achados de necropsia.....	04
2.3 Morfologia e genoma viral.....	05
2.4 Transmissão e tropismo viral.....	06
2.5 Adsorção e multiplicação vira.....	07
2.6 Etapas de multiplicação dos herpesvírus bovino.....	08
2.7 Transfecção por fosfato de cálcio.....	10
2.8 Cromossomo Artificial Bacteriano (BAC).....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Células.....	14
3.2 Cepas virais.....	14
3.3 Extração de DNA plasmideal.....	15
3.4 Extração de DNA total de BoHV-1 SV265gE-.....	15
3.5 Extração de DNA Viral de BoHV-5 purificado.....	16
3.6 Semiquantificação dos DNAs extraídos	17
3.7 Titulação de BoHV-1 gE- em células CRIB e VERO.....	17
3.8 Titulação de BoHV-5 EVI88/95 em células TT, PKsC3, MDBK e VERO.....	18
3.9 Teste de imunoperoxidase (IPX).....	18
3.10 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP em células VERO.....	20
3.11 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP e pBS-pBELO-BHV-5- transfer em Células VERO, MDBK, TT e PKsC3	21
3.12 Transfecção de DNA Total de BoHV-1gE- em células VERO e CRIB.....	22
3.13 Transfecção de DNA viral purificado de BoHV-5 em células TT e PKsC3.....	22
3.14 Transfecção de plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer em células TT e PKsC3 e posterior infecção com BoHV-5.....	23

4 RESULTADOS.....	25
4.1 Extração de DNA plasmideal.....	25
4.2 Extração de DNA Total de BoHV-1 SV265gE-	27
4.3 Extração de DNA viral de BoHV-5 EVI88/95 purificado.....	29
4.4 Titulação de BoHV-1 gE- e BoHV-1 selvagem em células CRIB e VERO.....	29
4.5 Titulação de BoHV-5 EVI88/95 em células TT, PKsC3, MDBK e VERO.....	30
4.6 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP em células VERO.....	31
4.7 Transfecção de DNA plasmideal pVR1012+EJFP em células VERO com variações de pH.....	32
4.8 Transfecção de DNA plasmideal pVR1012+EJFP e pBS-pBELO-BHV-5-transfer em Células VERO, MDBK, TT e PKsC3	33
4.9 Transfecção de DNA total de BoHV-1 gE- em células VERO e CRIB.....	34
4.10 Transfecção de DNA viral purificado de BoHV-5 EVI88/95.....	34
4.11 Transfecção de células TT e PKsC3 com plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer e posterior infecção com BoHV-5.....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÕES.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8 ANEXOS.....	60
ANEXO A - Gráfico da quantidade de células transfectadas versus quantidade de DNA transfectado.....	60
ANEXO B - Gráfico da quantidade de células transfectadas versus variação do pH.....	61
ANEXO C - Plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer.....	62
ANEXO D - Plasmídeo pRV1012+EGFP.....	62
ANEXO E - Plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V.....	63
9 APÊNDICE.....	64
APÊNDICE A - Solução estoque de HBS 10X.....	64
APÊNDICE B - Esquema de transfecção de DNA total de BoHV1-gE-.....	64
APÊNDICE C - Co-transfecção de DNA viral purificado e DNA plasmideal.....	65
APÊNDICE D – Esquema de transfecção em células TT com plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V.....	65

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pRV1012+EGFP extraído após clivagem com *HindIII*. 1) 480ng de marcador Lambda DNA clivado com *HindIII*; 2) 10 µL de pVR1012+EGFP clivado; 3) 20 25
- FIGURA 2.** Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer extraído após tratamento com *HindIII*. 1) 4 µL de Lambda DNA clivado com *HindIII*; 2) 1 µL de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer; 3) 100 ng de DNA Lambda. 26
- FIGURA 3.** Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pEF.IRES.neo.SV5 P/V extraído; 1) 1 µL de pEF.IRES.neo.SV5 P/V diluído 10X; 2) 9 µL da diluição 1:10 de pEF.IRES.neo.SV5 P/V; 3) 480ng de Marcador lambda DNA clivado com *HindIII*..... 26
- FIGURA 4.** Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído depois de 48 horas da inoculação. 1) 480ng de lambda DNA clivado com *HindIII*; 2) 10 µL de BoHV-1gE- não clivado; 3) 10 µL BoHV-1gE- clivado com *HindIII*; 4) 10 µL de controle negativo não clivado; 5) 10 µL Controle negativo clivado com *HindIII*; 6) 480ng de lambda DNA clivado com *HindIII*. 26
- FIGURA 5.** Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído após 36 horas da inoculação. 1) 5 µL de DNA viral de BoHV-1 gE- clivado com *HindIII*; 2) 5 µL de DNA total do controle negativo clivado com *HindIII*; 3) 4 µL de marcador lambda DNA clivado com *HindIII* a uma concentração de 120 ng/µL. 27
- FIGURA 6.** Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído após 16 horas da inoculação. 1) 10 µL de DNA de BoHV-1 gE- clivado com *HindIII*; 2) 20 ng de DNA lambda; 3) 480ng de marcador lambda DNA clivado com *HindIII*. 28
- FIGURA 7.** Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral BoHV-5 EVI88/95 purificado extraído após clivagem com *BamHI*. 1) 480ng de marcador de DNA de bacteriófago lambda clivado com *HindIII*; 2) 1 µL de DNA viral de BoHV-5 EVI88/95 purificado clivado com *BamHI*..... 29
- FIGURA 8.** Titulação de BoHV-1 selvagem em células VERO e CRIB..... 30
- FIGURA 9.** Titulação de BoHV-1gE- em células VERO e CRIB, demonstrando uma diferença de título correspondente a 10^2 TCID₅₀/mL entre os dois tipos celulares..... 31

FIGURA 10. Título do BoHV-5 EVI88/95 cultivado em células PKsC3, VERO, TT e MDBK.	31
FIGURA 11. Eficiência de transfecção em células VERO comparando-se as concentrações de DNA utilizadas com confluências celulares de 100% (7×10^5) e de 50% ($3,5 \times 10^5$).....	32
FIGURA 12. Número médio de células transfectadas expressando EGFP após transfecção em diferentes valores de pH do tampão HBS 2X.....	32
FIGURA 13. Número de células expressando EGFP, contadas em cinco campos no aumento de 100X para cada tipo de célula transfectada.....	33
FIGURA 14. Placa viral de BoHV-1 gE- obtida através da transfecção de células CRIB com 16 μ g de DNA total de BoHV-1gE- em 500 μ L de reação de transfecção. Detecção por IPX utilizando-se anticorpo monoclonal contra a glicoproteína gB do BoHV-1 (400X).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMs: anticorpos monoclonais
BAC: bacterial artificial chromosome
BoHV-1: *herpesvírus bovino tipo 1*
BoHV-5: *herpesvírus bovino tipo 5*
bp: “base pair” ou pares de base
BVDV: vírus da diarreia viral bovina
cm²: centímetro quadrado
CO₂: dióxido de carbono
CRIB: célula de rim de bovino resistente à infecção por BVDV
DNA lambda: DNA do bacteriófago lambda
DNA: ácido desoxirribonucléico
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEM: meio mínimo essencial de “Eagle”
Fig.: figura
g: glicoproteína, por exemplo, gB: glicoproteína B
gE-: glicoproteína E deletada
HCl: ácido clorídrico
IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IPB: balanopostite pustular infecciosa
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IPX: imunoperoxidase
IRs: sequência repetida interna
Kb: kilobases
LB: meio Luria Bertani
LTP: “latency-related products”
MDBK: células renais de bovino “Madin-Darby”
mA: miliAmpère
mg: miligrama
CaCl₂: cloreto de cálcio
Min.: minutos
ml: mililitros
mM: milimolar
n.: número
ng: nanograma
nM: nanomolar

NEB: “New England Biolabs”
°C : graus Celsius
pH: potencial de hidrogênio iônico
PK15: Porcine kidney
PKsC3: Porcine Kidney clone 3
%: porcentagem
RNA: ácido ribonucleico
RPM: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
SNC: sistema nervoso central
TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA
TCID₅₀: tissue culture infective dose
TE: tampão Tris-EDTA
TT: célula de testículo de carneiro
TRs: seqüência repetida terminal
ULBRA: Universidade Luterana do Brasil
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UL: região única longa
US: região única curta
µg: micrograma
µl: microlitro
VERO: célula de rim de macaco verde africano
V.: volume

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), que possuem uma similaridade genética de aproximadamente 85%, causam diversos tipos de infecção em animais. De modo geral ambos iniciam a infecção nas células epiteliais do sistema respiratório, ocorrendo o aparecimento de lesões e a produção de partículas virais que irão se disseminar pelos axônios ligados ao bulbo olfatório e gânglios trigêmios, através das terminações nervosas, desta forma infectando as células neuronais. Nesta etapa, como todos os outros herpesvírus, tanto BoHV-1 como BoHV-5 podem estabelecer uma infecção latente, onde o genoma viral permanece inativo nas células neuronais do hospedeiro, não resultando na produção de progênie infecciosa. No entanto, em situações geralmente associadas ao estresse, o vírus latente é reativado, podendo haver disseminação deste via axônio. Quando isto ocorre, os animais infectados pelo BoHV-5 desenvolvem neuroencefalite enquanto que naqueles infectados por BoHV-1 ocorrem lesões nos órgãos genitais e nas vias aéreas. Essa habilidade de permanecer em estado latente e reativar exige um grande número de genes e, conseqüentemente, um grande genoma.

Baseando-se nessas diferenças, tem-se procurado identificar quais genes são responsáveis pela neurovirulência causada pelo BoHV-5, a qual

raramente está presente em infecções causadas pelo BoHV-1. Entretanto, a manipulação de grandes genomas é laboriosa, consumindo muito tempo e nem sempre garantindo especificidade nos processos de recombinação.

Para facilitar este processo, tem-se utilizado a técnica conhecida como cromossomo artificial bacteriano (CAB), que consiste na recombinação do genoma viral com um segmento de DNA contendo genes para replicação em procariotos, permitindo desta forma a manipulação do genoma viral em células procarióticas. Este processo de recombinação possivelmente ocorre quando o DNA viral entra no núcleo celular, circularizando-se imediatamente. Nesta etapa, começa a ocorrer a transcrição dos genes virais da fase precoce e, logo após, a replicação do genoma viral circular. No momento da multiplicação do DNA viral pode haver a recombinação das seqüências para replicação em procariotos (CAB) com o genoma viral. Este DNA viral recombinado pode ser manipulado de forma simples e eficiente em um sistema procariótico como *E.coli*, submetendo mutações nas seqüências de interesse que se desejar. O DNA viral manipulado pode ser extraído e transfectado em células eucarióticas permissivas, que originarão partículas virais recombinantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Os herpesvírus pertencem à ordem *Herpesvirales*, são vírus envelopados de capsídeo icosaédrico e de DNA fita dupla, com tamanho de 100 Kb a 300 Kb distribuídos entre três famílias: *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae*, *Malacoherpesviridae*. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* gênero *Varicelovírus*, sendo considerado o principal agente causador da neuroencefalite bovina que, geralmente, acomete bovinos jovens e raramente animais mais velhos, os quais podem evoluir ao óbito.

O BoHV-5 foi isolado em 1962, a partir de um surto de neuroencefalite que resultou na morte vários bezerros na Austrália (Johnston et al., 1962). A prevalência do BoHV-5 no mundo ainda não está bem determinada. Já foram detectadas infecções causadas por este vírus em vários países da Europa, na América do Norte, Austrália, América do Sul, Canadá (Souza et al., 2009). Porém, nos países do hemisfério Norte, existe uma baixa prevalência de encefalites causadas por BoHV-5, provavelmente devido aos programas de vacinação contra o BoHV-1 (Cascio et al., 1999) que, resultou em uma proteção cruzada de anticorpos. Já nos países do hemisfério Sul,

como Austrália, Brasil e Argentina, ocorre uma alta incidência desta enfermidade.

No Brasil, a incidência é elevada nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, com relato de casos em São Paulo e Minas Gerais (Gomes et al., 2002). Esta enfermidade geralmente ocorre em surtos, causando grande mortalidade e baixa morbidade, se comparada à enfermidade causada por BoHV-1.

As similaridades do BoHV-5 com cepas genitais e a alta identidade genética de aproximadamente 85% com herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) levaram, inicialmente, à classificação do BoHV-5 no gênero *Varicelovirus*, como subtipo BoHV-1.3 (Metzler et al., 1986). Mais tarde, com base em diferenças antigênicas e moleculares, ocorreu a reclassificação em que o herpesvírus bovino tipo 5 passou a compor uma nova espécie do gênero.

A principal diferença entre BoHV-5 e BoHV-1 é a patologia associada, visto que o BoHV-5 possui por característica principal, causar neuroencefalite na maior parte dos casos. Diferentemente, o BoHV-1 tem por característica causar infecções como vulvovaginite pustular infecciosa, rinotraqueite e balanopostites. Entretanto, tem-se encontrado casos de neuroencefalite em que foi isolado o BoHV-1 como agente causador (Silva et al., 2007).

2.2 Patogenia e achados de necrópsia

A infecção por BoHV-5 caracteriza-se inicialmente pelo aparecimento de sintomas como depressão, anorexia, corrimento seroso ocular

e nasal, tremores musculares, hiperestesia ao toque e ao som, seguida, principalmente, de perda reflexa sensorial.

Também se observa a ocorrência de marcha a esmo com andar em círculo, diminuição do tônus lingual, ataxia, nistagmo, decúbito prolongado com dificuldade para voltar à estação e, finalmente, decúbito esternal, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, opistótono e morte (Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2007). Observações de necropsia podem apontar achatamento das circunvoluções cerebrais, malácia cortical caracterizada por áreas multifocais irregulares com coloração amarelada, superfície deprimida e aspecto finamente granular ao corte, por vezes associada à hemorragia, hemorragia submeningeana, meningoencefalite necrosante aguda e difusa que pode variar de leve à acentuada. Uma das principais alterações microscópicas que pode ser encontrada no encéfalo é a necrose cortical cerebral laminar, caracterizada por eosinofilia das camadas corticais superficiais, espongirose da neurópila nas lâminas corticais profundas, aumento do espaço perivascular e perineuronal, eosinofilia e retração de neurônio, tumefação endotelial moderada em vasos corticais e acúmulo leve de células Gitter, principalmente nos espaços perivasculares e submeningeano (Colodel et al., 2002).

2.3 Morfologia e genoma viral

O BoHV-5 caracteriza-se por possuir um genoma de DNA linear dupla fita, com uma região única longa (UL), uma região única curta (US), flanqueado por duas regiões repetitivas denominadas região repetitiva interna (RI) e região repetitiva terminal (RT). É um genoma do tipo D (Flores et al., 2007) com 138,39 kb, contendo 72 genes, dos quais 68 estão presentes em

uma única cópia, dentro de uma única região e dois genes iniciais (BICP4 e BICP22) localizados inteiramente dentro das regiões repetitivas (Delhon et al., 2003).

O genoma dos herpesvírus é protegido por um nucleocapsídeo icosaédrico de 100 a 110 nm de diâmetro composto por 150 hexâmeros e 12 pentâmeros. Esta estrutura é rodeada por uma camada protéica, (tegumento), que contém proteínas virais e algumas proteínas celulares. O tegumento é revestido por uma bicamada lipídica (envelope) onde se inserem glicoproteínas virais, entre as quais podemos citar gB, gC e gD que são as mais abundantes (Hurk et al., 1984; Marshall et al., 1986; Hurk et al., 1986). A região (UL) possui genes que codificam 6 glicoproteínas de superfície: gK, gC, gB, gH, gM e gL; a região (US) codifica 4 glicoproteínas: gG, gD, gI e gE. Sabe-se que algumas desses genes estão envolvidas na neurovirulência causada pelo BoHV-5 como gE e US9 (Al-Mubarak et al., 2007; Chowdhury et al., 2006; Hübner et al., 2005), entretanto, além destes, não se sabe exatamente quais outros genes são realmente responsáveis pela neurovirulência. Vírus recombinantes têm sido construídos contendo substituições e deleções de genes, tanto de BoHV-1 quanto de BoHV-5, para investigar as causas da neuropatogenia herpética bovina (Gerdtts et al., 2000; Belknap et al., 1999).

2.4 Transmissão e tropismo viral

A porta de entrada para os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 são as mucosas nasal e genital, podendo, também, a infecção ser transmitida através do epitélio conjuntivo. O contato direto de focinho com focinho ou com a genitália é a via preferencial de transmissão dos herpesvírus bovinos. Da

mesma forma, pode ocorrer a transmissão através de aerossóis a curtas distâncias (Mars et al., 2000). Além da transmissão através do contato sexual, também podem ocorrer contaminações de vacas artificialmente inseminadas com sêmen contaminado, devido à criopreservação que mantém o vírus viável (Souza et al., 2002).

2.5 Adsorção e multiplicação viral

Depois de ter penetrado em uma célula epitelial, o BoHV inicia o ciclo de replicação, levando a uma sequência de expressão de genes que resultam na produção dos vírions. Em cultivo celular, o efeito citopático (ECP) do herpesvírus caracteriza-se, primeiramente, por acúmulo de células arredondadas, seguido de lise ou apoptose, ocasionando destacamento do tapete celular, com células alongadas ao redor da placa viral (Spilki et al., 2003).

Depois da infecção e da replicação nas células epiteliais nasais, o vírus penetra, através das terminações nervosas dos axônios, e é levado por um movimento retrógrado até o núcleo da célula nervosa do gânglio e dos neurônios cerebrais, onde irá permanecer latente em uma forma episomal por todo o resto da vida do hospedeiro (Smith et al., 2001). Quando ocorre infecção da mucosa genital ou nasal, pode haver também a infecção dos gânglios paravertebrais e trigêmios, seguida da permanência do vírus em uma forma episomal no núcleo das células nervosas dita como infecção latente.

A infecção latente é uma das principais características dos herpesvírus; é sabido que em herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), a manutenção da latência é feita pela expressão da região LAT que gera micro

RNAs, impedindo a tradução de RNA de genes precursores como ICP0 (Umbach et. al., 2008).

Na reativação, que está associada a uma diminuição da ação do sistema imunológico geralmente ocasionada por estresse do hospedeiro, o genoma viral é ativado e ocorre a produção das partículas virais. Estas partículas deslocam-se do corpo do neurônio, através do axônio, até a terminação nervosa em um movimento retrógrado, sendo re-excretado na mucosa onde houve a infecção primária (Baringer & Griffith, 1970). Após a reativação, o herpesvírus bovino tipo 5 pode espalhar-se, também, por outras partes do cérebro, infectando células adjacentes ao axônio do neurônio infectado, por meio da formação de botões pré-sinápticos através da glicoproteína gD (Regge et al., 2006). Desta forma, aumenta o número de células nervosas infectadas a partir da infecção primária havendo, então, maior probabilidade de ocorrer neuroencefalite (Mayer et al., 2006). Já o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), ao contrário do BoHV-5, pode ser encontrado em menores proporções no cérebro, infectando um menor número de áreas após a reativação do vírus (Spilki et al., 2002).

2.6 Etapas de multiplicação dos herpesvírus bovino

A infecção por herpesvírus bovino em células permissivas é iniciada por três etapas no processo de entrada. O primeiro contato envolve as glicoproteínas gC e gB do BoHV-1 e o heparan-sulfato na superfície celular. A seguir, ocorre uma ligação da glicoproteína gD ao receptor HveC (Connolly et al., 2001). Logo após, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana celular e a liberação do tegumento e do núcleocapsídeo no citoplasma celular,

sendo este carregado até a membrana nuclear onde o capsídeo é conectado e o DNA é liberado no núcleo (Muylkens et al., 2007).

Posteriormente, o DNA viral linear circulariza-se, seguido de uma cascata de expressões de genes virais em três fases distintas operacionalmente definidas como fase imediatamente cedo (IE), fase cedo (E) e fase tardia (L). É postulado que no herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), modelo para replicação de DNA de herpesvírus, o genoma circular serve como molde para o primeiro ciclo de replicação, iniciando de uma sequência chamada “origem de replicação” (*ORI*) (Muylkens et al., 2007).

No processo de replicação do DNA viral, ocorre a formação de concatêmeros produzidos a partir do DNA viral circular, através do processo de círculo rolante. Após os concatêmeros serem clivados por enzima virais e liberados, eles são empacotados no capsídeo viral. Neste processo de replicação, ocorre a inversão da região US em relação à região UL, em quantidades equimolares (Mayfield et al., 1983). Também são encontrados vírions com baixos níveis de inversão da região UL que ocorrem por meio de recombinação homóloga através das regiões repetitivas que flanqueiam a região US, correspondendo à metade dos genomas virais em uma célula infectada por herpesvírus bovino (Schynts et al., 2003).

Após o DNA viral ser empacotado no capsídeo, ocorre a formação do tegumento, constituído por proteínas virais e proteínas celulares sequestradas pelo vírus. Essas proteínas possuem a função de modular várias funções celulares e virais logo na entrada do vírus na célula (Lyman et al., 2006). Por fim, o envelope viral é adquirido na membrana nuclear, depois

obtem uma segunda membrana nas vesículas do complexo de Golgi e os vírus são liberados por brotamento, quando esta segunda membrana é fusionada com a membrana citoplasmática (Wild et al., 2002).

2.7 Transfecção por fosfato de cálcio

O processo de construção de herpesvírus recombinantes com alterações de genes ou regiões gênicas específicas começa com o processo de co-transfecção do DNA viral e da sequência gênica a ser alterada em um cultivo celular. O processo de transfecção de células eucarióticas pode ser realizado por diferentes técnicas. Uma delas é a eletroporação, em que pulsos elétricos curtos de alta voltagem geram um rearranjo estrutural da membrana plasmática, gerando estruturas temporárias denominadas de poros, causando o transporte de moléculas como o DNA para dentro de célula (Iorio et al., 2007). Outro tipo de técnica utiliza lipossomos catiônicos, que são lipídios catiônicos que se ligam ao DNA facilitando a introdução do mesmo através da membrana celular até o núcleo.

Outro método de transfecção de células eucarióticas bem conhecido é o de transfecção por fosfato de cálcio. Trata-se de uma técnica bem estabelecida, inicialmente padronizada por Graham & Van der Eb (1973). Este método baseia-se na formação de um precipitado de fosfato de cálcio com o DNA que se deseja inserir na célula eucariótica; este precipitado tem a capacidade de ser endocitado pela célula e liberar o DNA exógeno no núcleo celular (Welzel et al., 2004). Esta técnica possui a vantagem de ter uma boa eficiência, apresentar baixo custo, além de ser bem estudada. Todavia, apresenta algumas limitações, pois depende de determinadas variáveis para se

chegar a uma taxa de transfecção elevada. Os principais fatores são o pH do tampão de transfecção, a concentração de DNA e o tipo de célula a ser transfectada (Graham & Van der Eb, 1973). Outros fatores, como temperatura, tempo de incubação após o preparo da solução de transfecção e o ritmo de crescimento celular, também podem influenciar (Welzel et al., 2004).

O processo de transfecção ocorre quando o precipitado de fosfato de cálcio com DNA entra em contato com a célula e é endocitado (Ciftci & Levy et al., 2001). O fosfato de cálcio tem a função de escapar do endossomo e proteger o DNA contra a ação das DNAses presentes no citoplasma e no endossomo (Sokolova et al., 2006). Desta forma, ele percorre o citoplasma até o núcleo onde é liberado o DNA exógeno (Ciftci & Levy et al., 2001; Kuroda et al., 2005). A quantidade de precipitado endocitado pela célula pode aumentar através do choque de glicerol (Wilson et al., 1995), que torna o meio extracelular hipertônico em relação ao interior celular, deixando-a plasmolisada. Após a remoção do glicerol e posterior adição de líquido de lavagem, como tampão fosfato (PBS), ocorre um influxo de líquido para dentro da célula, propiciando maior internalização do precipitado de fosfato de cálcio aglomerado com DNA (Grosjean, 2003).

O ritmo de multiplicação celular também pode influenciar na eficiência de transfecção, pois à medida que a célula se divide, a membrana nuclear é desfeita, deste modo, o precipitado de fosfato de cálcio e DNA vão diretamente até o núcleo (Grosjean, 2003).

2.8 Cromossomo Artificial Bacteriano (BAC)

Devido à dificuldade de manipulação de grandes genomas, como o dos herpesvírus, uma técnica chamada de cromossomo artificial bacteriano (BAC) foi desenvolvida (Brune et al., 2000). Esta técnica baseia-se na recombinação de um segmento de DNA plasmideal, contendo genes para a manutenção em células procarióticas, ligados ao genoma do herpesvírus, permitindo que este DNA possa ser introduzido em uma célula procariótica, sendo possível a multiplicação deste DNA viral neste sistema (McGegor & Schleiss, 2001).

Desta forma, torna-se possível a manipulação do genoma viral, através da introdução de vetores plasmideais carregando os genes ou as seqüências de interesse que devem ser recombinados com o genoma viral contido dentro da *E. coli*. O processo de recombinação ocorre eficientemente, devido a genes de bacteriófago inseridos no genoma da bactéria, que permitem a estabilidade e recombinação de DNAs lineares, este sistema faz com que não seja necessária a introdução de outro plasmídeo carregando genes de recombinases, além de que o primeiro carrega a seqüência de interesse a ser recombinada (Copeland et al., 2001).

As seqüências do plasmídeo a serem recombinadas são flanqueadas por seqüências homólogas às da região alvo do DNA viral. O DNA viral recombinado é extraído das bactérias, purificado e transfectado em células permissivas, para a obtenção das partículas virais recombinantes (Brune et al., 2000). Vários herpesvírus têm sido clonados como um cromossomo artificial bacteriano: Herpes humano tipo 1 (HHV-1) (Gierasch et al., 2006), vírus da

doença de Marek, guinea pig citomegalovírus (GPCMV) (Xiaohong et al., 2008), herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) (Gaetano et al., 2007), herpesvírus canino tipo 1 (CHV) (Arii et al., 2006).

Uma desvantagem desta técnica é a instabilidade do BAC em relação às sequências repetitivas encontradas no genoma do herpesvírus (IR e TR), podendo ocorrer deleções das mesmas após a multiplicação do genoma em *E.coli*. Entretanto, estudos feitos com BAC revelaram uma boa estabilidade do genoma viral, mesmo após varias gerações da *E.coli* DH10B (Domi & Moss, 2002). Desta forma, esta ferramenta permite uma fácil e rápida manipulação de grandes genomas, obtendo-se bons resultados.

Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um tipo celular apropriado para transfecção pelo método de fosfato de cálcio.

Objetivos específicos

Objetiva-se também, padronizar um método de transfecção por fosfato de cálcio com uma alta taxa de transfecção para a obtenção de um cromossomo artificial bacteriano de BoHV-5.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

Para este trabalho, foram utilizados cinco tipos de células eucarióticas provenientes do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF: (1) Cultivo primário de células de testículos de carneiro (TT); (2) Uma linhagem de células de rim de suíno denominada PKsC3; (3) Células de rim de macaco verde africano (VERO); (4) células de rim de bovino resistentes ao vírus da diarreia viral bovina (CRIB); e (5) Células de rim de bovino (MDBK). As células foram cultivadas em meio E-MEM (GIBCO) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 2 µg/mL de anfotericina B (Cristália) e 2 µg/mL de fluoroquinolona de amplo espectro (Bayer). Estas células foram mantidas a uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e repicadas a cada dois ou três dias de maneira que a confluência celular fosse de 100%.

3.2 Cepas virais

Os vírus utilizados para este estudo foram: uma cepa de herpesvírus bovino tipo 5 EVI88/95 e uma amostra de herpesvírus bovino tipo 1, com o gene da glicoproteína E deletado (SV265 gE-), a qual possui baixa neuroinvasibilidade (Franco et al., 2002). Estas amostras são provenientes do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

3.3 Extração de DNA plasmideal

Os plasmídeos pRV1012+EGFP, pBS-pBELO-BHV-5-Transfer e pEF.IRES.neo.SV5 P/V foram gentilmente cedidos pelo Dr. Franciscus Antonius Maria Rijsewijk. O plasmídeo pRV1012+EGFP (Anexo D) possui um promotor dos genes precoces do citomegalovirus humano, juntamente com o cassete de expressão para o gene da proteína fluorescente verde sob o controle do promotor dos genes precoces do citomegalovirus.

O plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer (Anexo B) possui genes que possibilitam a multiplicação em células procarióticas do genoma de BoHV-5 recombinado a este plasmídeo. Também possui sequências homólogas aos genes UL42 e CIRC do BoHV-5, que permitem a recombinação deste com o DNA viral de BoHV-5. E um cassete de expressão para a proteína verde fluorescente.

O plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V (Anexo C) possui um gene que codifica para a proteína V do paramixovírus simio, que tem a função de inibir a função do interferon alfa. Os plasmídeos foram inseridos por choque térmico em *E. coli*, e multiplicados na presença de antibióticos e extraídos através da técnica de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Em seguida, foram purificados com fenol (Invitrogen) e precipitados em etanol segundo a técnica descrita por Sambrook & Russell (2001).

3.4 Extração de DNA total de BoHV-1 SV265gE-

A inoculação das garrafas foi feita em dias distintos, sendo que as extrações de DNA viral foram realizadas a partir de garrafas, contendo células

MDBK com 100% de confluência, a uma multiplicidade de infecção de 1. Quando completado o tempo de cultivo, o meio foi retirado e centrifugado em tubos de 15 mL, a 3000 rpm, em uma micro centrífuga (SIGMA 2-16PK), por 10 minutos.

As garrafas (25 cm²) foram lavadas com PBS 1X (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4), sendo esta solução novamente centrifugada no mesmo tempo e velocidade anteriores no mesmo tubo. O DNA total foi extraído em 48, 36 e 16 horas após a inoculação, respectivamente, visando obter a maior quantidade de DNA viral possível.

O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado às células 1 mL de uma solução de lise, assim como a outras garrafas que serviram como controles negativos. A solução de lise foi composta por: 18 mL de TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0), 1,8 mL de SDS 10% (Promega), 120 µL de Proteinase K (20 mg/mL) (USB Corporation) e 1440 µL de NaCl 5M (Nuclear) incubada por uma hora a 37°C sob leve agitação.

3.5 Extração de DNA Viral de BoHV-5 purificado

Três garrafas de 170 cm² contendo células CRIB com uma confluência de 100% foram inoculadas com BoHV-5 EVI88/95 a uma M.O.I. 3. Depois de dois dias, quando o ECP observado foi de 90%, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação em tubos de 50 mL (Falcon), durante 20 minutos, a 4000 rpm ou 1466 g, em uma centrífuga SIGMA 2-16PK.

Posteriormente, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 27000 rpm em gradiente de sacarose de 25% por duas horas, em uma centrífuga Sorvall OTD COMBI. Os sedimentos foram suspensos em 100 µL TE pH 7,4, e, após a

digestão com 50 µg/mL de RNase (Pharmacia Biotech) por 30 minutos, foi adicionada a solução de lise composta por 200 µL de TEM (0,1 M Tris-Cl (pH 8,0), 0,01 M EDTA (pH 8,0), 1 M NaCl concentração de 10X) ajustado para 2X com pH 7,4, 40 µL de SDS 10% (Promega, Madison) e 20 µL de Proteinase K 20 mg/mL (USB Corporation).

Os tubos foram mantidos em leve agitação a 37°C, por uma hora, após, foram adicionados 440 µL de fenol tamponado (Invitrogen), mantendo sob leve agitação à temperatura ambiente.

Depois de centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos, a fase aquosa foi coletada em novos tubos e efetivada a precipitação com etanol, segundo Sambrook & Russell (2001). O DNA purificado foi dissolvido em 50 µL de TE (10 mM de Tris, pH 7,4 e 1 mM de EDTA, pH 8,0). Uma amostra de 1 µL foi clivada com a enzima *Bam*HI New England Biolabs e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,5%, juntamente com um marcador de peso molecular de DNA de bacteriófago Lambda clivado com *Hind*III, para análise da qualidade e semiquantificação.

3.6 Semiquantificação dos DNAs extraídos

Para o processo de semiquantificação, quantidades conhecidas de DNA de bacteriófago lambda foram utilizadas juntamente com as amostras de DNA a serem analisadas. Para tanto, utilizou-se eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 0,7% para semiquantificação de DNA plasmideal e de 0,5% para DNA total e DNA viral purificado.

3.7 Titulação de BoHV-1 gE- em células CRIB e VERO

O herpesvírus BoHV-1 SV265 gE- foi titulado em células VERO e

células CRIB para saber se o vírus poderia multiplicar-se com eficiência nestas células em comparação com BoHV-1 SV265 selvagem.

Células CRIB e VERO foram semeadas em placas de 96 poços com confluência de 100% e, logo após, foram adicionadas diluições seriadas na base 10, dos vírus BoHV-1 gE- e BoHV-1 selvagem nos dois tipos de células. O resultado das titulações foi comparado entre os dois tipos de células sob microscópio óptico invertido, observando-se as placas após 4 dias de incubação a 37°C com 5% de CO₂.

3.8 Titulação de BoHV-5 EVI88/95 em células TT, PKsC3, MDBK e VERO

Para saber qual célula multiplicaria melhor o BoHV-5, o vírus foi titulado em células TT, PKsC3, VERO e MDBK para a comparação dos títulos obtidos entre estas células. Às placas de 96 cavidades foram adicionados 50 µL de suspensão celular por poço, em quadruplicata, de cada tipo de célula.

Logo após foram adicionados 100 µL de suspensão viral da amostra de BoHV-5 EVI88/95 em 900 µL de meio E-MEM, sem soro fetal bovino (SFB), procedendo-se sucessivas diluições na base 10 até a diluição 10⁻⁷.

Os quatro últimos poços receberam apenas 50 µL de meio, para servir de controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ durante quatro dias. A leitura foi feita ao microscópio ótico após ter sido efetuado o teste de imunoperoxidase (IPX).

3.9 Teste de imunoperoxidase (IPX)

O meio das placas foi retirado e estas foram lavadas três vezes com PBS 1X. As placas foram incubadas por aproximadamente 1 hora sob

ventilação para a secagem do tapete celular. Depois foram colocadas a -20°C por 1 hora e posteriormente foi adicionado 1 mL de paraformaldeído 4% (MERCK) por poço durante 15 minutos.

Foram feitas três lavagens com PBS-Tween 80 (Vetec) e foram adicionados 50 μL /poço de anticorpo monoclonal contra a glicoproteína B (gB) do herpesvirus bovino tipo 5 (MAB14, KRAMPS et al., 1994) a uma diluição de $1:10^4$ em PBS-Tween 80. Posteriormente foi realizada incubação de 1 hora a 37°C . Após, foram feitas três lavagens com PBS-Tween 80 e foram adicionados 650 μL /poço de anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase (Dako) a uma diluição de 1:300, seguido de incubação por 1 hora a 37°C . Foram feitas 3 lavagens com PBS-Tween 80 e foram acrescentados 50 μL /poço de reagente de coloração contendo 10 mL de tampão acetato, 600 μL 3-Amino-9-etilcarbazol (SIGMA) e 90 μL de peróxido de hidrogênio (LIFAR).

A coloração das placas virais foi observada ao microscópio ótico (CETI) após 10 minutos.

3.10 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP em células VERO

As diferentes condições de transfecção com DNA plasmideal pRV1012+ EGFP foram determinados primeiramente em células VERO. Foi avaliada a eficiência de transfecção frente à confluência de 7×10^5 células e $3,5 \times 10^5$ células, a influência de três diferentes pHs (7.0, 7.14 e 7.3) e a quantidade de células transfectadas frente às concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA. Para a preparação da solução de transfecção, primeiramente foi ajustado o pH das alíquotas do tampão salino HEPES (HBS) (Apêndice A). A

seguir, em um microtubo foram colocados 10 µg de DNA plasmideal e 10 µg de DNA de esperma de salmão. Em outro microtubo foram adicionados 20 µg de DNA plasmideal e 20 µg de DNA de esperma de salmão, sendo também pipetado um volume exato de água deionizada para ajustar o volume total para 500 µL. Posteriormente, foram adicionados aproximadamente 62,5 µL de CaCl₂ 2 M, seguido de leve homogeneização. Rapidamente a esta mistura foram acrescentados 500 µL do tampão HBS 2X pH 7.14 em forma de gotas, sob leve e constante agitação, até completar um volume total de 1 mL, com posterior incubação de 20 minutos à temperatura ambiente.

Em cada poço foram adicionados 160 µL correspondendo a 20 e 40 ng/µL de DNA, respectivamente, sendo a placa mantida à temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Depois deste período, foi dado um choque osmótico com glicerol a uma concentração final de 15%, durante 30 segundos. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X estéril e foi adicionado meio E-MEM. O resultado da transfecção foi avaliado 48 horas depois da transfecção de acordo com a média do percentual de células expressando EGFP, contadas em cinco campos diferentes no aumento de 100X, em um dos poços transfectados.

3.11 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP e pBS-pBELO-BHV-5-transfer em Células VERO, MDBK, TT e PKsC3

Células VERO, MDBK, TT e PKSc3 foram mantidas em cultura até a confluência de 100%. A preparação das células foi feita como descrito no item 3.7 sendo adicionadas 10⁶ células por poço em placas de seis poços.

A solução de transfecção foi preparada como descrito no item

anterior, utilizando-se 5 µg de DNA plasmideal e 5 µg DNA de esperma de salmão, aos quais foram adicionados 31,25 µL de CaCl₂ 2 M por reação, completando-se com água deionizada para um volume de 250 µL. A esta mistura foram adicionados 250 µL de HBS 2X pH 7.14 seguido de incubação de 20 minutos a temperatura ambiente.

A leitura do resultado da transfecção foi feita através de observação da placa transfectada com microscópio de fluorescência após 48 horas da transfecção. Nesta observação, contaram-se o percentual de células fluorescentes por campo em aumento de 100X.

3.12 Transfecção de DNA Total de BoHV-1gE- em células VERO e CRIB

Células VERO e CRIB foram mantidas em cultura até confluências de 80% e 100%. Um dia antes da transfecção, as células foram lavadas, tripsinizadas e suspendidas em tampão fosfato 1X. Uma alíquota contendo azul de Tripán 0,5% ou 1% (SIGMA) foi contada em câmara de Neubauer para obter a quantidade exata de células a serem semeadas. Depois foram adicionadas 8x10⁵ células e 10⁶ células por poço, respectivamente, em placas separadas de seis poços, para averiguar a influência do número de células no processo de transfecção (Apêndice B).

Para a preparação da solução de transfecção, primeiramente, o pH do tampão salino HEPES (HBS) foi ajustado para 7,14. A seguir, em dois microtubos foram adicionados 40 µg e 16 µg de DNA total extraído separadamente, seguido de um volume exato de água deionizada para ajustar o volume total para 0,5 mL. Posteriormente, foram adicionados

aproximadamente 31,25 μL de CaCl_2 2 M, seguido de leve homogeneização. Rapidamente, esta mistura foi adicionada ao tampão HBS 2X pH 7,14 em forma de gotas, sob leve e constante agitação, até completar um volume total de 0,5 mL, com posterior incubação de 20 minutos à temperatura ambiente.

Em cada poço, foram adicionados 160 μL correspondendo a 80 e 32 ng/ μL por poço, a placa mantida à temperatura de 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas. Depois deste período, foi dado um choque osmótico com glicerol a uma concentração final de 15%, durante 30 segundos. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X estéril e foi adicionado meio E-MEM com metilcelulose 2% (SIGMA). Essas placas foram incubadas e mantidas por três dias sob condições usuais, sendo posteriormente efetuado o teste de imunoperoxidase (IPX).

3.13 Transfecção de DNA viral purificado de BoHV-5 em células TT e PKsC3

As células TT e co-cultivo de PKsC3 e MDBK foram preparadas como descrito no item 3.11, foram transfectadas com 500 ng e 1 μg de DNA viral de BoHV-5 purificado em células TT. Devido à dificuldade de multiplicação do BoHV-5 em células PKsC3, foi transfectado 1 μg de DNA viral de BoHV-5 purificado em células PKsC3 co-cultivadas com MDBK à proporção de 50% de cada célula. As concentrações de DNA foram ajustadas com DNA de esperma de salmão para 10 μg em um volume total de reação de 0,5 mL, correspondendo à concentração de 20 ng/ μL de acordo com as condições descritas anteriormente. Depois de três dias, realizou-se um teste de IPX para averiguar a presença de placas virais.

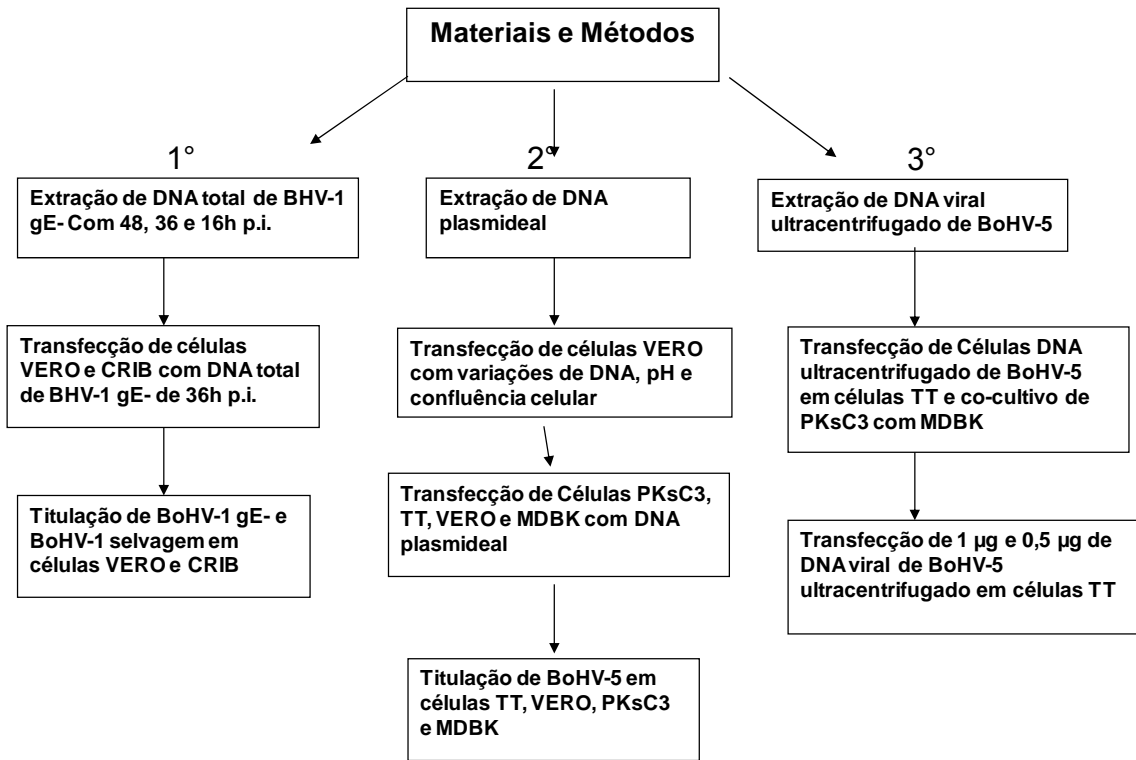
3.14 Transfecção de plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer em células TT e PKsC3 e posterior infecção com BoHV-5

Pelo fato do DNA viral ser mais dificilmente transfectado do que o DNA plasmideal devido ao seu tamanho, foi feita a transfecção de células TT e PKsC3 com DNA plasmideal e posterior infecção com BoHV-5. Para este teste, células PKsC3 e células TT foram cultivadas em placas de seis poços até atingirem uma confluência de 100%, sendo mantidas em condições usuais. Estas células foram transfectadas com 10 µg de DNA de plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer linearizado adicionado de 10 µg de DNA de esperma de salmão. Após o ajuste do volume com água deionizada, foram misturados 62,5 µL de CaCl₂ 2M. Esta mistura foi adicionada ao tampão HBS 2X pH 7.14 em um volume total de 1 mL de reação, foram adicionados 160 µL/poço da reação de transfecção à concentração de 20 ng/µL. Após 24 horas da transfecção, ao ser constatada a presença de células expressando EGFP, esses dois cultivos foram inoculados com BoHV-5 EVI88/95 a uma M.O.I. de 1. Após ser constatada a presença de 90% de ECP, as placas foram congeladas a -70°C e depois descongeladas.

Foram adicionados em doze placas de Petri contendo células MDBK, a uma confluência de 100%, 5 µL por placa da suspensão viral das placas congeladas, diluídos em 2 mL de meio E-MEM sem SFB, contendo antibióticos e antifúngico. Transcorrido o período de inoculação de 2 horas a 37°C, o meio foi retirado e foram adicionados 5 mL de meio E-MEM, com 2% de metil-celulose em cada placa. Ao final de um período de 24 horas, as placas foram analisadas ao microscópio de fluorescência para a identificação de

placas virais expressando EGFP, indicando a presença do vírus recombinado.

Esquema dos procedimentos realizados



4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA plasmideal

Após a clivagem do DNA plasmideal de pRV1012+EGFP com *Hind*III e comparação com DNA de bacteriófago lambda, foi estimada uma concentração de 1 µg/µL de DNA plasmideal (Figura 1).

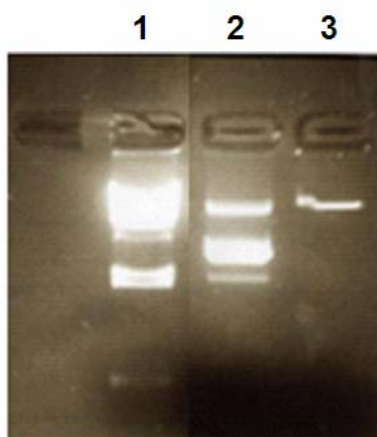


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pRV1012+EGFP extraído após clivagem com *Hind*III. 1) 480ng de marcador Lambda DNA clivado com *Hind*III; 2) 10 µL de pVR1012+EGFP clivado; 3) 20 ng de Lambda DNA para a semiquantificação.

Após a clivagem do DNA plasmideal de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer com *Hind*III e comparação com DNA de bacteriófago lambda, foi estimada uma concentração de 500 ng/µL de DNA plasmideal observando a Figura 2.

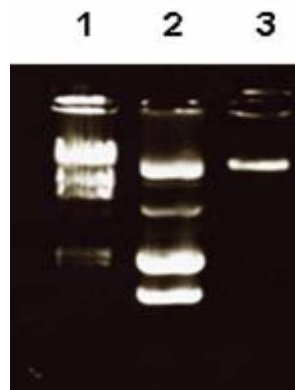


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer extraído após tratamento com *HindIII*. 1) 4 μ L de Lambda DNA clivado com *HindIII*; 2) 1 μ L de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer; 3) 100 ng de DNA Lambda.

A Figura 3 da extração de DNA plasmideal do plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V foi avaliada e utilizada para a semiquantificação do DNA extraído. A comparação das intensidades das bandas do plasmídeo com o DNA de bacteriófago lambda permitiu estimar uma concentração de aproximadamente 0,5 μ g/ μ L de DNA plasmideal.



FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA plasmideal de pEF.IRES.neo.SV5 P/V extraído; 1) 1 μ L de pEF.IRES.neo.SV5 P/V diluído 10X; 2) 9 μ L da diluição 1:10 de pEF.IRES.neo.SV5 P/V; 3) 480ng de Marcador lambda DNA clivado com *HindIII*.

4.2 Extração de DNA Total de BoHV-1 SV265gE-

Na Figura 4 podemos observar o padrão de clivagem do DNA total extraído de garrafa de 25 cm², 48 horas depois da inoculação. Este padrão foi comparado com o marcador de peso molecular e com os controles negativos obtidos através da extração do cultivo de células não inoculadas. A semiquantificação deste DNA com o marcador de peso molecular revelou uma quantidade de aproximadamente 40 ng/μL de DNA total do vírus.

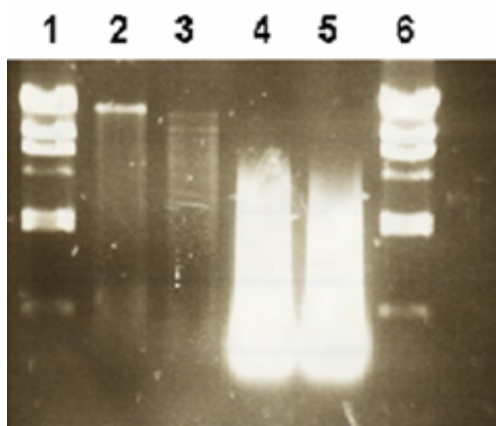


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído depois de 48 horas da inoculação. 1) 480ng de lambda DNA clivado com *HindIII*; 2) 10 μL de BoHV-1gE- não clivado; 3) 10 μL BoHV-1gE- clivado com *HindIII*; 4) 10 μL de controle negativo não clivado; 5) 10 μL Controle negativo clivado com *HindIII*; 6) 480ng de lambda DNA clivado com *HindIII*.

A Figura 5 mostra a eletroforese em gel de agarose, com DNA extraído depois de 36 horas após a inoculação, apresentando 80% de ECP. Nesta imagem, não é possível observar com clareza a presença das bandas formadas pela clivagem do DNA viral com a enzima *HindIII*. Por comparação com bandas do DNA de bacteriófago lambda clivado com a mesma enzima obteve-se uma concentração aproximada de 0,8 μg/μL de DNA total.



FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído após 36 horas da inoculação. 1) 5 μ L de DNA viral de BoHV-1 gE- clivado com *Hind*III; 2) 5 μ L de DNA total do controle negativo clivado com *Hind*III; 3) 4 μ L de marcador lambda DNA clivado com *Hind*III a uma concentração de 120 ng/ μ L.

O DNA total de BoHV-1 gE- foi extraído pela terceira vez depois de 16 horas após a inoculação, apresentando um ECP de 10%. Analisando-se a Figura 6, percebe-se claramente o padrão de clivagem do DNA total de BoHV-1 gE-. Por comparação com as bandas do DNA de bacteriófago lambda de concentração conhecida estimou-se que 1 μ L de DNA total extraído contém 400 ng de DNA.

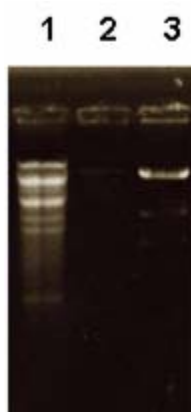


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral extraído após 16 horas da inoculação. 1) 10 μ L de DNA de BoHV-1 gE- clivado com *Hind*III; 2) 20 ng de DNA lambda; 3) 480ng de marcador lambda DNA clivado com *Hind*III.

4.3 Extração de DNA viral de BoHV-5 EVI88/95 purificado

Na Figura 7, a imagem do gel de agarose revela o padrão de clivagem do DNA viral purificado semelhante ao encontrado na literatura (Franco et al., 2007). Para semi-quantificar o DNA viral, realizou-se a comparação das intensidades das bandas do marcador com as intensidades das bandas do DNA viral. O DNA viral foi semi-quantificado, apresentando aproximadamente 200 ng/ μ L.

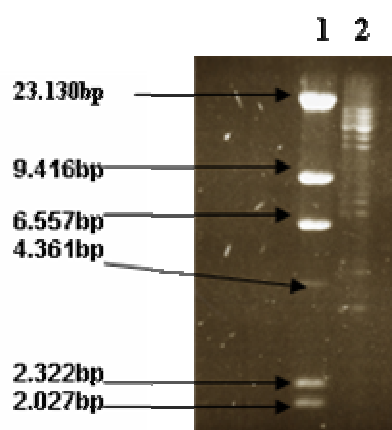


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 0,5% do DNA viral BoHV-5 EVI88/95 purificado extraído após clivagem com *Bam*HI. 1) 480ng de marcador de DNA de bacteriófago lambda clivado com *Hind*III; 2) 1 μ L de DNA viral de BoHV-5 EVI88/95 purificado clivado com *Bam*HI.

4.4 Titulação de BoHV-1 gE- e BoHV-1 selvagem em células

CRIB e VERO

A titulação do BoHV-1gE- em células VERO e CRIB foi comparada com o título do BoHV-1 selvagem obtido nas mesmas células. O título de BoHV-1 selvagem em células VERO mostrou um valor de $10^{7.0}$ TCID/mL, enquanto que em células CRIB foi de $10^{7.3}$ TCID/mL, demonstrando uma diferença de título correspondente a $10^{0.3}$ TCID/mL entre os dois tipos celulares

(Figura 8). Os valores para BoHV-1 gE- foram de $10^{6,0}$ TCID/mL em células VERO e de $10^{8,0}$ TCID/mL em células CRIB, como mostrados na Figura 9.

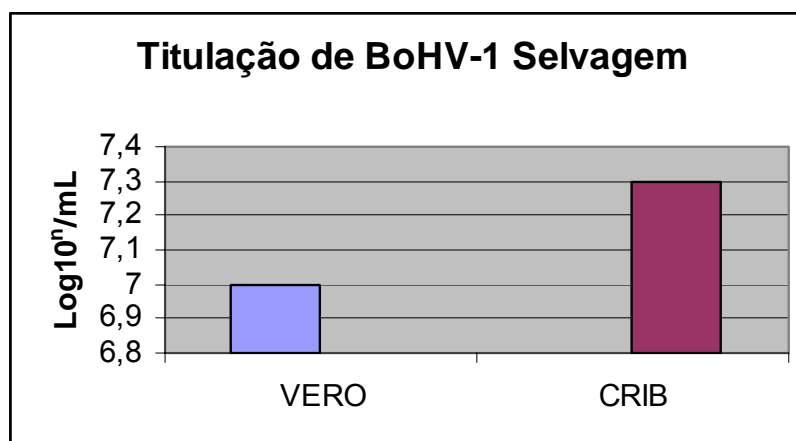


FIGURA 8. Titulação de BoHV-1 selvagem em células VERO e CRIB.

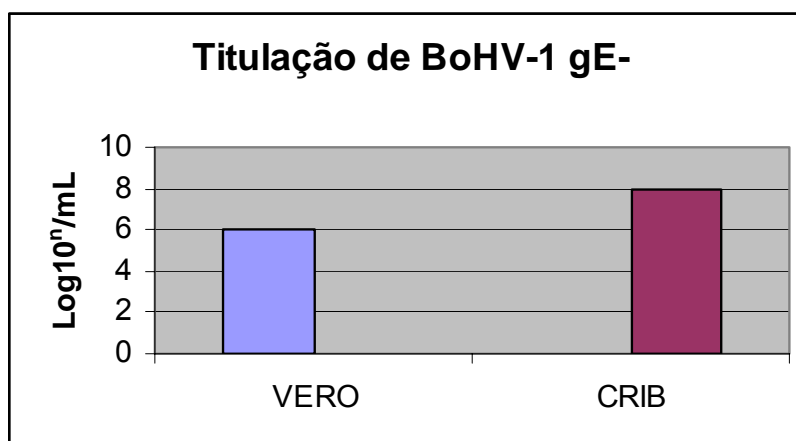


FIGURA 9. Titulação de BoHV-1gE- em células VERO e CRIB, demonstrando uma diferença de título correspondente a 10^2 TCID/mL entre os dois tipos celulares.

4.5 Titulação de BoHV-5 EVI88/95 em células TT, PKsC3, MDBK

e VERO

O vírus BoHV-5 EVI88/95 foi titulado em quatro tipos diferentes de

células, comparando-se os resultados com o título obtido em células MDBK.

Em células MDBK, o título obtido foi de $10^{6,8}$ TCID/mL. Em células VERO e células PKsC3 obteve-se um título de $10^{3,3}$ TCID/mL, enquanto que em células TT o título foi de $10^{6,0}$ TCID/mL, como pode ser observado na Figura 10.

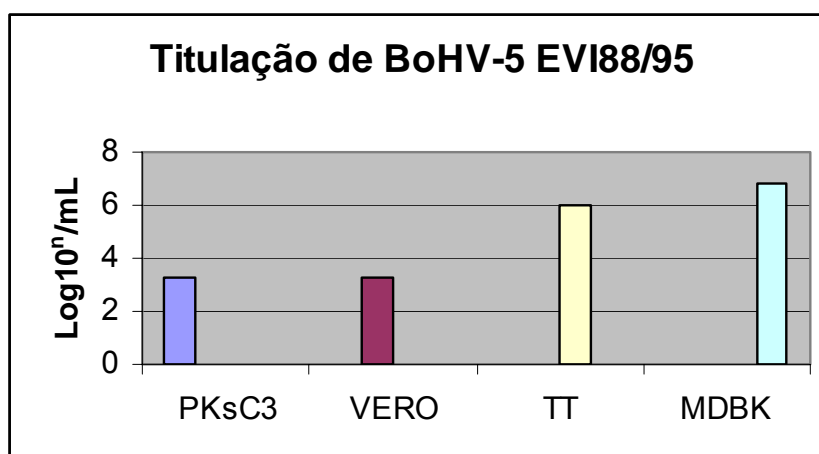


FIGURA 10. Título do BoHV-5 EVI88/95 cultivado em células PKsC3, VERO, TT e MDBK.

4.6 Transfecção de DNA plasmideal pRV1012+EGFP em células

VERO

Nos resultados dos testes de transfecção de células VERO com DNA plasmideal de pRV1012+ EGFP foi observado um percentual de 0,5% no número células fluorescentes por campo no aumento de 100X, com a concentração de 20 µg/mL de DNA. Também foi observado um percentual de 0,1% no número células fluorescentes para 40µg/mL de DNA. Já a variação na confluência celular ($3,5 \times 10^5$ e 7×10^5) não demonstrou grande diferença de células transfectadas expressando EGFP (Figura 11).

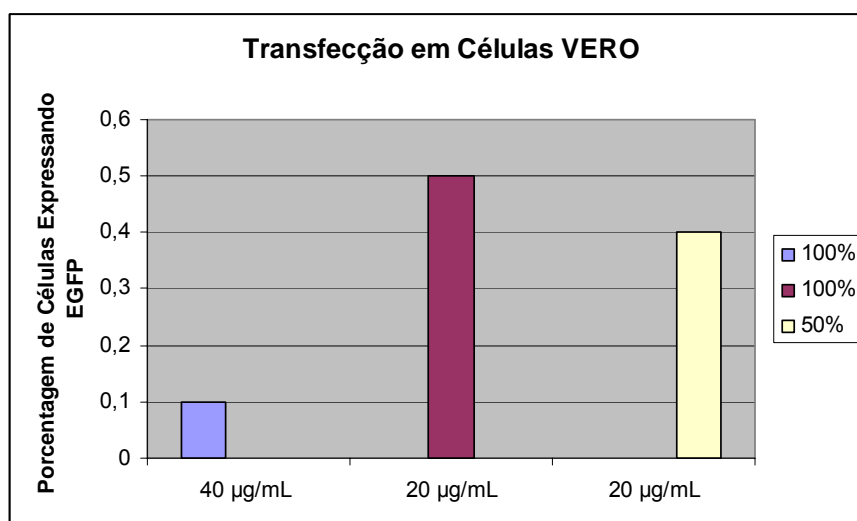


FIGURA 11. Eficiência de transfecção em células VERO comparando-se as concentrações de DNA utilizadas com confluências celulares de 100% (7×10^5) e de 50% ($3,5 \times 10^5$).

4.7 Transfecção de DNA plasmideal pVR1012+EJFP em células

VERO com variações de pH

A variação de pH na taxa de transfecção mostrou que apenas o pH 7,14 foi capaz de gerar células transfectadas através da expressão de EGFP, como observado na Figura 12.

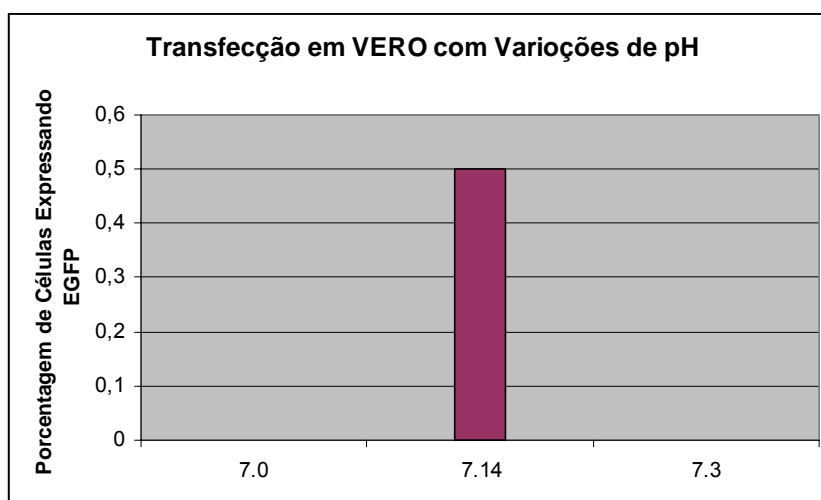


FIGURA 12. Número médio de células transfectadas expressando EGFP após transfecção em diferentes valores de pH do tampão HBS 2X.

4.8 Transfecção de DNA plasmideal pVR1012+EJFP e pBS-pBELO-BHV-5-transfer em Células VERO, MDBK, TT e PKsC3

Os resultados da transfecção com DNA plasmideal foram avaliados de acordo com a média da percentagem do número de células expressando EGFP, contadas em cinco campos no aumento de 100X, em um dos poços transfectados (Figura 13).

(1) Células PKsC3: percentual de 2,9% no número de células fluorescentes;

(2) Células VERO: percentual de 0,5% no número de células fluorescentes;

(3) Células TT: percentual de 4,5% no número de células fluorescentes;

(4) Células MDBK: percentual de 0,05% no número de células fluorescentes;

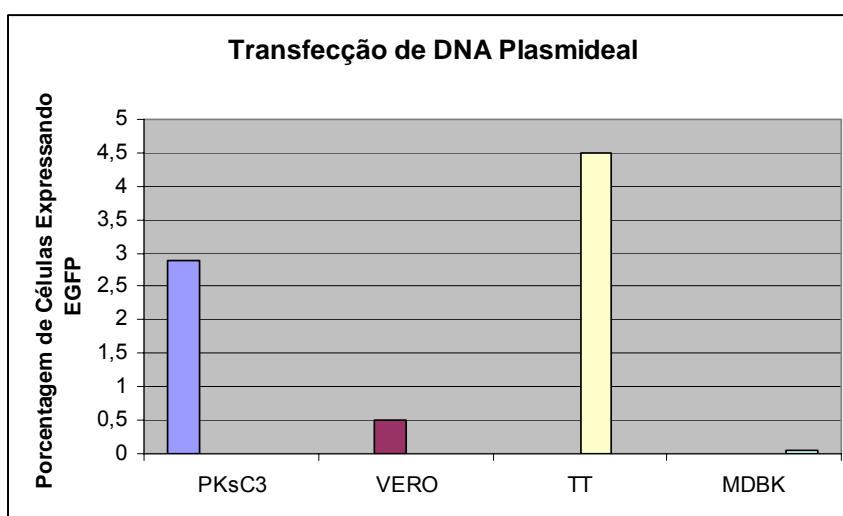


FIGURA 13. Número de células expressando EGFP, contadas em cinco campos no aumento de 100X para cada tipo de célula transfectada.

4.9 Transfecção de DNA total de BoHV-1 gE- em células VERO e CRIB

No processo de transfecção de DNA total de BoHV-1 gE-, não foi observada a presença de placas virais em células VERO transfectadas com este material, enquanto que duas placas virais foram observadas em células CRIB com a concentração de 8×10^5 células por poço, transfectadas com 16 μ g de DNA total como observado na Figura 14.

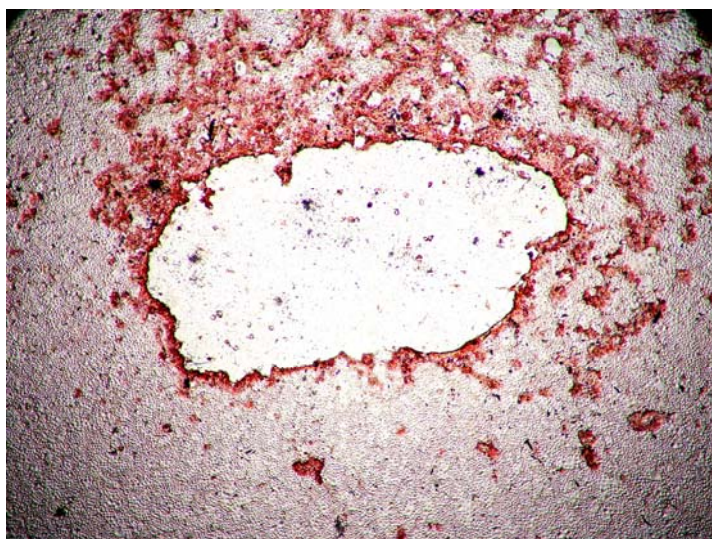


FIGURA 14. Placa viral de BoHV-1 gE- obtida através da transfecção de células CRIB com 16 μ g de DNA total de BoHV-1gE- em 500 μ L de reação de transfecção. Detecção por IPX utilizando-se anticorpo monoclonal contra a glicoproteína gB do BoHV-1 (400X).

4.10 Transfecção de DNA viral purificado de BoHV-5 EVI88/95.

A transfecção de células TT foi realizada com 500 ng e 1 μ g de DNA viral de BoHV-5 EVI88/95 purificado. Os resultados demonstraram que a transfecção com 500 ng e 1 μ g de DNA em células TT resultou em duas e quatro placas virais, respectivamente, sendo visualizadas através da técnica de IPX.

Células PKsC3 co-cultivadas com MDBK foram transfectadas com 1 µg deste DNA viral. A transfecção do co-cultivo de MDBK com células PKsC3 não demonstrou a presença de placas quando utilizada a técnica de IPX.

4.11 Transfecção de células TT e PKsC3 com plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer e posterior infecção com BoHV-5

As células transfectadas com o plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer linearizado e inoculadas com BoHV-5 foram visualizadas sob microscópio de fluorescência, não sendo possível identificar a presença de placas virais expressando EGFP.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ferramentas que possibilitem a construção de vírus recombinantes para o entendimento das funções dos genes e para o desenvolvimento de vacinas é baseado no processo de recombinações homólogas. Uma das ferramentas mais versáteis é o cromossomo artificial bacteriano (BAC), que possibilita a fácil manipulação de grandes genomas, como o dos herpesvírus, em um sistema procariótico (Cui et al., 2008; Wagner et al., 2002). No presente estudo, foram realizados testes para a padronização de um método de transfecção por fosfato de cálcio, visando a construção de um cromossomo artificial bacteriano de BoHV-5 EVI88/95.

Células

Para o desenvolvimento deste trabalho, o cultivo das células utilizadas foi feito de tal forma que as mesmas fossem repicadas a cada vez que a confluência celular atingisse 100%, com uma frequência de três vezes por semana, em um período de duas semanas consecutivas. Deste modo, as células obtiveram um ritmo de divisão celular mais acelerado, o que aumentava as chances do DNA transfectado chegar ao núcleo sem ser barrado pela membrana nuclear, como já constatado por diversos autores (Tseng et al., 1999; Brunner et al., 2000; Grosjean, 2003).

Outro tipo de célula, denominada CRIB, foi utilizado para a multiplicação dos vírus e obtenção de DNA viral total e DNA viral purificado, como já foi relatado anteriormente por A. C. Franco (comunicação pessoal, 23 de abril de 2008), devido ao fato de permitir uma multiplicação adequada do vírus e apresentar pouco DNA celular após a ultracentrifugação.

Devido às células de linhagem serem imortalizadas, foi possível multiplicá-las indefinidamente. Entretanto, um tipo de célula de cultivo primário, denominado de células de testículo de terneiro (TT), por possuir um número limitado de passagens, teve que ser cuidadosamente manipulado. Houve então a necessidade, de se obter novas células a partir de testículos de terneiros.

Extração de DNA plasmideal

A extração de DNA plasmideal foi realizada com a intenção de se utilizar um tipo de DNA mais fácil de ser homogeneizado, conseqüentemente melhor transfectado e também para determinar os parâmetros iniciais para transfecção com DNA viral. Para isto, foram utilizados dois tipos de plasmídeos. O plasmídeo pRV1012+EGFP possui um tamanho de 4.984 pb e foi utilizado na maioria dos testes de transfecção para se avaliar a capacidade de transfecção das células. O plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer que possui 13.777 bp e sequências homólogas ao herpesvírus bovino tipo 5 para recombinação (Gillet et al., 2005), foi utilizado no processo de co-transfecção para tentar se obter um cromossomo artificial bacteriano.

Estes plasmídeos foram semiquantificados através da comparação de intensidades de bandas obtidas com quantidades conhecidas de DNA de bacteriófago Lambda. Devido ao fato da extração de DNA plasmideal

possibilitar a obtenção de um DNA mais puro do que a extração de um DNA total e por ser de menor tamanho, foi possível efetuar uma melhor semiquantificação. (Figuras 1 e 2).

Extração de DNA total de BoHV-1gE-

O processo de extração de DNA total foi feito com a intenção de eliminar a necessidade de DNA viral purificado para a transfecção, já que a ultracentrifugação é um processo mais laborioso. A extração de DNA total de BoHV-1gE- foi realizada mediante a avaliação da qualidade do DNA total extraído em três tempos diferentes após a inoculação, como proposto por F. A. M. Rijsewijk (comunicação pessoal, 09 de maio de 2007).

Na extração efetuada 48 horas após a inoculação, foi observado um DNA viral mais puro, entretanto, em pequena quantidade, pois este material foi extraído do tapete celular centrifugado. Já na extração de DNA total com 36 horas após a inoculação, percebeu-se uma grande quantidade de DNA celular, não sendo possível semiquantificar corretamente a quantidade de genoma viral presente, como observado na Figura 5. Supondo-se que, dentro das células é onde se encontra o DNA viral que pode ser mais facilmente extraído do que o das partículas virais em suspensão realizou-se uma extração 16 horas após a inoculação, quando a maior parte do DNA viral ainda estaria no interior das células. Os resultados demonstraram que, desta forma, foi possível obter grande quantidade de DNA viral, com menor quantidade de DNA celular, como observado na Figura 6. Também, através desta figura, é possível observar que o padrão de bandas obtido foi semelhante ao padrão de BoHV-1gE- ultracentrifugado relatado por Franco et al. (2002).

Extração de DNA Viral Purificado

O padrão de restrição enzimático do DNA de BoHV-5 purificado com a enzima *Bam*HI foi confirmado por comparação com o padrão existente na literatura (FRANCO et al., 2007), sendo também semiquantificado após comparação com a intensidade das bandas do marcador (Figura 7). O resultado da extração de DNA viral de BoHV-5 EV188 purificado, pode ser corretamente semiquantificado pois a quantidade de DNA viral não foi afetada pela presença de DNA celular (Figura 7).

Titulação de BoHV-1 gE-

O BoHV-1 gE- foi também titulado em células CRIB e células VERO, obtendo-se um título de $10^{8,0}$ TCID/mL e $10^{6,0}$ TCID/mL, respectivamente, indicando que há possibilidade do vírus ser multiplicado após seu DNA ser transfectado nos dois tipos celulares.

Titulação de BoHV-5

O BoHV-5 foi titulado em células VERO, comparando com células CRIB para saber se poderia ou não multiplicar-se com eficiência após a co-transfecção de DNA viral e DNA plasmideal. O resultado apontou um título de $10^{3,3}$ TCID/mL em células VERO e $10^{6,8}$ TCID/mL em células CRIB. Isto demonstra que as células VERO apresentaram dificuldades em disseminar o BoHV-5. Por outro lado, células CRIB demonstraram uma boa capacidade de multiplicação do mesmo.

Transfecção

O processo de transfecção de células eucarióticas pelo método de fosfato de cálcio é muito utilizado desde 1973, quando foi desenvolvido por

Graham & Van der Eb (1973). Por ser uma técnica de baixo custo e de fácil execução, ela é ainda utilizada para a obtenção de vírus recombinantes; entretanto, devido ao fato de que o processo de recombinação ocorre ao acaso, é necessária a obtenção de uma alta taxa de transfecção para aumentar as chances da recombinação desejada entre as sequências homólogas.

A padronização deste tipo de técnica pode ser trabalhosa e longa, devido ao conjunto de fatores que estão envolvidos, tais como: concentração de DNA, tamanho do precipitado de fosfato de cálcio, tempo de incubação, estabilidade do precipitado, agitação na hora da formação do precipitado e tipo de célula (JORDAN et al., 1996; SEELOS, 1997). O tipo de célula a ser transfectada é um dos principais fatores que interfere na eficiência de transfecção. Para isso, é necessário que a célula possua grande capacidade de endocitar o precipitado de fosfato de cálcio com DNA (Coonrod et al., 1997; Cartier et al., 2003; Welzel et al., 2004), e que também possibilite a multiplicação do DNA viral transfectado, gerando partículas virais como um DNA infeccioso (Sheldrick et al., 1973; Van et al., 1988).

Transfecção com DNA plasmideal

Foi proposto transfectar DNA plasmideal expressando EGFP, pois é um DNA de menor tamanho, sendo mais facilmente homogeneizado, por conseguinte, possibilitando avaliar com maior precisão a eficiência de transfecção.

As primeiras transfecções com DNA plasmideal pVR1012+EGFP foram feitas em células VERO, utilizando-se duas concentrações diferentes de DNA plasmideal acrescidas de DNA de esperma de salmão. Houve uma

expressiva diferença no número de células fluorescentes. As células transfectadas com 20 µg de DNA plasmideal e 20 µg de DNA de esperma de salmão tiveram 0,1% de células fluorescentes por campo no aumento de 100X. Quando as células VERO foram transfectadas com 10 µg de DNA plasmideal e 10 µg de DNA de esperma de salmão, foi observado 0,5% de células fluorescentes por campo no aumento de 100X. Pode-se notar que a quantidade de DNA transfectado pode alterar a eficiência de transfecção, sendo a quantidade ótima de 20 µg/mL de DNA como demonstrado no presente trabalho (Anexo A).

Wilson et al. (1995) utilizaram uma linhagem de células VERO denominada BSC-40, demonstrando uma eficiência de transfecção de 10 a 50% de células transfectadas pelo método de fosfato de cálcio, ao utilizarem o tampão BS 2X com a mesma concentração de CaCl₂ de 125 mM utilizada no presente trabalho. Os mesmos autores testaram diferentes valores de pH, de 6.9 a 7.1, não encontrando diferenças significativas em relação à eficiência de transfecção. Diferentemente, neste trabalho, foram testados três valores de pH na transfecção de células VERO (7.0, 7.14 e 7.3), sendo que apenas o pH 7.14 apresentou células expressando EGFP, como mostrado na Figura 12. Analisando-se o gráfico de variação de pH de Graham & van der Eb (1973), (Anexo B), observar-se que uma pequena variação de pH pode resultar em maior ou menor eficiência de transfecção

Com relação ao número de células expressando EGFP em células VERO, pode-se observar no gráfico da Figura 11 que a maior quantidade de células transfectadas foi obtida com 7×10^5 (100% de confluência). Já com a

metade do número de células correspondendo a $3,5 \times 10^5$ (50% de confluência), foi obtido um número menor de células expressando EGFP; entretanto, não foi uma diferença significativa.

Transfecção com DNA total de BoHV-1 gE-

Os primeiros testes utilizando-se DNA total de BoHV-1 gE-transfectado em células VERO não deram resultados positivos, entretanto, em células CRIB com confluência de 80% foram obtidas duas placas virais, onde se utilizou aproximadamente 16 μ g de DNA total de BoHV-1gE-.

Para avaliar a precisão do teste e aumentar o número de placas virais, foram realizadas outras transfecções do mesmo DNA em CRIB, com variações de pH do tampão HBS 2X e confluência celular. Porém, não foram observadas placas virais, o que pode ter ocorrido devido à dificuldade de homogeneização do DNA no tampão TE ocasionado pelo grande tamanho do DNA celular. A quantidade de DNA pode variar a eficiência de transfecção como já foi relatado por Graham & Van der EB (1973) (Anexo A). A dificuldade de homogeneização do DNA pode explicar o porquê de ter se conseguido apenas uma só vez transfectar células CRIB.

A transfecção deste DNA total em células CRIB, após uma melhor homogeneização em um volume maior de TE, não deu resultado positivo, possivelmente, devido à baixa concentração de DNA em um grande volume. Segundo Strain et al. (1984), apenas 7% do DNA viral chega ao citoplasma e apenas 0,5% chega intacto ao núcleo celular, sendo necessária uma grande quantidade de DNA para se obter maior eficiência de transfecção.

Transfecção em células TT com DNA plasmideal

Outro tipo de célula testado foi o cultivo primário de células de testículo de terneiro (TT), que foram transfectadas com 5 µg de DNA plasmideal de pBS-pBELO-BHV-5-transfer, apresentando um percentual de 4,5% de células fluorescentes por campo no aumento de 100X, indicando uma grande capacidade de endocitose. Este número é muito superior à quantidade de células fluorescentes obtidas com VERO e MDBK e relativamente maior do que o percentual obtido com PKsC3. Prasad et al. (2005) testaram doze diferentes tipos de células para analisar a influência da endocitose na eficiência de transfecção de DNA plasmideal pCMV β -gal com CLDC (Cationic Liposome DNA Complex). Foi observada uma correlação positiva entre o número de células transfectadas e a capacidade de endocitose de cada tipo de célula, sendo detectada uma diferença de até 15X no número de células transfectadas entre os tipos celulares.

Transfecção em células TT com DNA purificado de BoHV-5

As células TT foram, então, transfectadas com DNA viral purificado de BoHV-5 nas quantidades de 500 ng e 1000 ng, gerando duas e quatro placas virais por poço, respectivamente. Estimando-se a proporção de placas virais de acordo com a quantidade de DNA, podemos dizer que com 10 µg de DNA viral purificado teríamos 20 placas virais por poço em um volume de 1 mL, o que ainda seria insuficiente para a obtenção de um vírus recombinante, já que a chance de recombinação é baixa (Zhijian et al., 1999).

Titulação de BoHV-5 em Células TT

Para saber se a capacidade de multiplicação do BoHV-5 em células

TT seria suficiente para permitir a multiplicação do vírus recombinante, foi realizada uma titulação deste vírus nestas células. O resultado foi comparado ao da titulação em células MDBK, havendo uma diferença não significativa, de $10^{0,8}$ TCID/mL.

Transfecção com plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V

Uma tentativa de aumentar a taxa de transfecção em células TT foi baseada nos resultados relatados no trabalho de Barreca & O'Hare. (2004), em que células MDBK expressando o gene da proteína V do paramixovírus simiuo inibiram a ação do interferon, permitindo um aumento do número de placas virais após a infecção com HSV-1. Para avaliar a capacidade de obter-se um maior número de placas virais através da inibição da ação do interferon α (IFN- α), foi testada uma co-transfecção do DNA viral de BoHV-5 purificado juntamente com DNA plasmideal de pEF.IRES.neo.SV5 P/V (Apêndice D). Este plasmídeo codifica o gene da proteína V de um paramixovírus simiano, a qual tem a finalidade de inibir o IFN- α , através da degradação dos ativadores de transcrição STAT1 e STAT2 que ativam a produção deste interferon (Didcock et al., 1999; Andrejeva et al., 2002; Weber et al., 2007). Foi observada apenas uma placa viral a mais, resultado considerado não significativo para melhorar a eficiência de transfecção (dados não mostrados).

Comparando-se o número de células TT transfectadas com DNA viral e com DNA plasmideal, podemos notar que existe um maior número de células transfectadas com o último, em relação ao primeiro, confirmado que o tamanho do DNA transfectado influencia a eficiência de transfecção. Esta observação foi feita anteriormente por Neves et al. (1999) que, ao introduzir

DNA plasmideal de 7 Kb na célula por microinjeção, verificaram que este material permaneceu no mesmo local após ser transfectado, não se deslocando através do citoplasma. Mais recentemente, Dean & Gokay, (2005) demonstraram que o DNA com tamanho superior a 1 Kb tem dificuldade em se deslocar através do citoplasma.

Transfecção de DNA purificado de BoHV-5 em VERO e CRIB

As co-transfecções de células CRIB e VERO com DNA viral de BoHV-5 purificado e com DNA plasmideal (pRV1012+EGFP) foram realizadas utilizando-se 100% de confluência celular e duas variações de pH, como mostrado no Apêndice C. Este procedimento foi efetuado para testar se o DNA purificado seria melhor transfectado nestas células do que o DNA total, que havia sido testado previamente (dados não mostrados). Cinco microgramas de DNA plasmideal de pRV1012+EGFP foram incluídos para se analisar a quantidade de células que expressaram EGFP indicando, assim, o número de células transfectadas. Entretanto, não foram obtidas placas virais em nenhum dos tipos celulares e em nenhum dos pHs utilizados com DNA viral de BoHV-5 purificado. O resultado negativo para placas virais pode ser devido à dificuldade de difusão do DNA viral no citoplasma, tanto para células VERO quanto para células CRIB (Dean & Gokay, 2005). Foi obtido um percentual de 0,5% de células fluorescentes por campo no aumento de 100X em VERO com pH 7,14 e um percentual de 0,05% de uma célula fluorescente por campo no aumento de 100X em células CRIB na transfecção com DNA plasmideal em pH 7,14.

Transfecção de DNA plasmideal em células PKsC3

Devido à baixa eficiência de transfecção de DNA plasmideal em células VERO e CRIB, foi testado outro tipo de célula denominada de PKsC3, proveniente de uma linhagem clonal de células PK15. Esta foi transfectada com 5 µg de DNA plasmideal pVR1012+EGFP, de acordo com outros procedimentos realizados com o mesmo plasmídeo. Este tipo de célula demonstrou um percentual de 2,9% de células fluorescentes por campo no aumento de 100X, indicando que esta célula possui a segunda melhor taxa de transfecção, quando comparada aos outros tipos de células. Este resultado sugere uma razoável capacidade de endocitose do precipitado de fosfato de cálcio com DNA e uma meia vida maior do DNA no citoplasma até chegar ao núcleo da célula, como também relatado por Prasad et al (2005).

Titulação de BoHV-5 em células PKsC3

Para saber se o BoHV-5 poderia multiplicar-se em células PKsC3, efetuou-se uma titulação deste vírus em células PKsC3 previamente titulado em MDBK. Foi verificado um título de $10^{3,3}$ TCID/mL em células PKsC3 com destruição de 100% do tapete celular, contudo, não foi observado ECP nas outras diluições. Houve apenas grupos de células marcadas sem perderem sua morfologia original, o que pode indicar que o vírus não estaria se multiplicando. Já em células MDBK, a mesma alíquota de vírus apresentou um título de $10^{6,8}$ TCID/mL através de IPX. Este resultado indica que as células PKsC3 não ofereceram as condições ideais para multiplicar o BoHV-5.

Transfecção em células PKsC3

A transfecção de DNA plasmideal de pBS-pBELO-BHV-5-Transfer

linearizado foi realizada devido ao fato de que em um processo de recombinação homóloga, um plasmídeo linear possui maiores chances de se recombinar do que um plasmídeo circular, devido às extremidades livres poderem parear com maior facilidade com a sequência homóloga no DNA viral, quando comparado a um DNA circular (Carroll et al., 1986).

Para saber se o plasmídeo linearizado pode permanecer na célula, pelo mesmo tempo do que o plasmídeo circular foi realizado um novo teste de transfecção em células PKsC3. O resultado demonstrou que o plasmídeo linear conseguiu permanecer expressando EGFP pelo mesmo tempo (durante 3 dias) e no mesmo número de células, em comparação ao plasmídeo circular (dados não mostrados). Entretanto, outros autores discordam ao afirmar que a eficiência de transfecção de um plasmídeo circular é maior do que a de um linear devido à formação de um complexo de menor tamanho (Groll et al., 2006).

Em função das células PKsC3 apresentarem um bom grau de eficiência de transfecção, como mostrado na Figura 13, foi proposto inocular BoHV-5 após transfecção do plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-transfer, não havendo, então, necessidade de se utilizar DNA viral co-transfectado. Depois de verificar o ECP, uma amostra foi inoculada em placas contendo células MDBK e outra foi titulada. Foi observado que não houve alteração de título e também não foi possível a identificação de placas virais expressando EGFP. Dentro das condições testadas isto indica que as células PKsC3 não são permissivas ao vírus BoHV-5, impedindo que o DNA viral possa multiplicar-se. A ausência de antígeno viral observado por IPX, após a transfecção de DNA

viral e DNA plasmideal em co-cultivo de PKsC3 e MDBK, ajuda a fortalecer esta hipótese.

Transfecção e infecção em células TT

A transfecção do plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer em células TT e posterior inoculação de BoHV-5 não apresentou resultado positivo na geração do vírus recombinante. Uma possível explicação é que o processo de recombinação do plasmídeo com o DNA viral, por ser um evento ocasional com uma frequência de 10^{-4} a 10^{-1} , torna a quantidade de vírus selvagem muito elevada em relação ao possível vírus recombinante, desta forma sendo difícil a detecção de placas virais expressando EGFP (Zhijian et al., 1999).

A eficiência de transfecção também foi avaliada testando-se diferentes graus de confluência de células TT. Apenas com a confluência de 100% foram obtidos resultados positivos, sendo que em experimentos onde a confluência apresentava valores inferiores a este, não ocorreu o aparecimento de placas virais (dados não mostrados). Segundo os protocolos utilizados por outros autores (Lee & Welsh, 1999; Oltona et al., 2007), a média de confluência utilizada para transfecção é de 70% para se obter uma boa taxa de transfecção, o que não conferiu com o resultado obtido em células TT.

Também se testou a influência da concentração de CaCl_2 sobre a eficiência de transfecção de DNA viral purificado em células TT, utilizando-se concentrações de 125 mM e 250 mM no volume final da reação. Não foi observada diferença quanto ao número de placas virais neste tipo de célula. As mesmas concentrações de CaCl_2 foram testadas anteriormente na transfecção de DNA plasmideal em células PKsC3. Neste caso, observou-se o dobro de

células expressando EGFP, utilizando-se o dobro do volume de CaCl_2 (dados não mostrados).

É relatado na literatura que a concentração ideal de CaCl_2 para transfecção situa-se entre 110 mM e 125 mM, conferindo boa estabilidade ao precipitado (Wilson et al., 1995). Os resultados destes testes com as células TT e PKsC3 mostram que o tipo de célula é um fator determinante além da concentração de CaCl_2 .

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um tipo de célula que seria melhor transfectada pelo método de fosfato de cálcio para a construção de um cromossomo artificial bacteriano de BoHV-5. Apesar de diversas limitações foi possível, no entanto, identificar um tipo de célula que se adaptou muito bem às condições do local de trabalho, sendo um forte candidato para se aprimorar o método de transfecção por fosfato de cálcio para a obtenção de vírus recombinantes com alta eficiência.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho primeiramente foi testada a técnica de transfecção de DNA total de BoHV-1gE- por fosfato de cálcio em células VERO e CRIB, sendo obtidas somente duas placas virais em células CRIB. Entretanto, não foi possível reproduzir este resultado.

A transfecção com DNA plasmideal mostrou melhor rendimento em células PKsC3 produzindo 49 células fluorescentes, seguido das células TT, células VERO e células MDBK.

Na avaliação da capacidade de multiplicação do BoHV-5 EVI88/95 nessas células, foi observado o maior título em células MDBK ($10^{6,8}$ TCID/mL), seguido de células TT, células VERO e células PKsC3.

Na transfecção do plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer em células TT e PKsC3 e posterior infecção com BoHV-5 não houve aparecimento de placas virais em ambas as células.

A transfecção de DNA viral em células PKsC3 não resultou em aparecimento de placas virais, já em células TT foram obtidas duas e quatro placas virais com 500 ng e 1 µg de DNA viral purificado, respectivamente.

Nas condições utilizadas no presente trabalho, os resultados sugerem que as células de testículo de terneiro (TT) são as mais apropriadas dentre as células testadas para a obtenção de vírus recombinantes, produzindo

um número razoável de células transfectadas com DNA plasmideal expressando EGFP. Estas células poderão ser utilizadas futuramente para o aprimoramento de um método de transfecção com alta eficiência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI-MUBARAK A.; SIMON J.; COATS C.; OKEMBA J.D.; BURTON M.D.; CHOWDHURY S.I. Glycoprotein E (gE) specified by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) enables trans-neuronal virus spread and neurovirulence without being a structural component of enveloped virions, **Virology**, United States, 365 398–409, 2007.

ANDREJEVA J.; YOUNG D. F.; GOODBOURN S.; RANDALL R. E. Degradation of STAT1 and STAT2 by the V Proteins of Simian Virus 5 and Human Parainfluenza Virus Type 2, Respectively: Consequences for Virus Replication in the Presence of Alpha/Beta and Gamma Interferons. **Journal of Virology**, United States, p. 2159–2167, 2002.

ARII J.; HUSHUR O.; KATO K.; KAWAGUCHI Y.; TOHYA Y.; AKASHI H. Construction of an infectious clone of canine herpesvirus genome as a bacterial artificial chromosome, **Microbes and Infection**, France, v 8, n4, p: 1054-1063, 2006.

BARINGER J. R.; GRIFFITH J. F.; Experimental herpes simplex encephalitis: early neuropathologic changes. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, United States, v 29, p: 89-104, 1970.

BARRECA C. & O'HARE P. Suppression of Herpes Simplex Virus 1 in MDBK Cells via the Interferon Pathway, **Journal of Virology**, United States, p. 8641–8653, 2004.

BELKNAP E.B.; WALTERS L.M.; KELLING C.; AYERS V.K.; NORRIS J.; MCMILLEN J.; HAYHOW C.; COCHRAN M.; REDDY D.N.; WRIGHT J.; COLLINS J.K. Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. **Vaccine**, Netherlands 17. 2297-2305, 1999.

BRUNE W.; MESSERLE M.; KOSZINOWSKI U. H. Forward with BACs new tools for herpesvirus genomics. **Trends in Genetics**, United kingdom, v 16, n. 6, 254- 259, 2000.

BRUNNER S.; SAUER T.; CAROTTA S.; COTTON M.; SALTIK M.; WAGNER E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. **Gene Therapy**, United kingdom, v 7, n 5, p 401–407, 2000.

CARROLL D.; WRIGHT S. H.; WOLFF R. K.; GRZESIUK E.; MARYON E. B. Efficient Homologous Recombination of Linear DNA Substrates after Injection into *Xenopus laevis* Oocytes. **Molecular and Cellular Biology**, United States, v 6, n 6, p. 2053-206 ,1986.

CARTIER R.; VELINOVA M. L. C.; ERDMANN B.; RESZKA R. Ultrastructural Analysis of DNA Complexes During Transfection and Intracellular Transport. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, United States, v 51, n 9, p 1237–1240, 2003.

CASCIO K. E; BELKNAP E. B; SCHULTHEISS P. C; AMES A. D; COLLINS J. K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, United States, v 11, n 2, p 134-9, 1999.

CHOWDHURY S. I.; MAHMOOD S.; SIMON J.; AL-MUBARAK A.; ZHOU Y. The Us9 Gene of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) Effectively Complements a Us9-Null Strain of BHV-5 for Anterograde Transport, Neurovirulence, and Neuroinvasiveness in a Rabbit Model. **Journal of Virology**, United States, v 80, n 9, p 4396–4405, 2006.

CIFTCI K. & LEVY R. J. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts, **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v 218,n 1-2, p 81–92. 2001.

COLODEL E. M.; NAKAZATO L.; WEIBLEN R.; MELLO R. M.; SILVA R. R. P. DA.; SOUZA M. A.; FILHO J. A. O.; CARON L., Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v 32, n 2, p 293-298, 2002.

CONNOLLY S. A.; WHITBCK J. C.; RUX A. H.; KRUMMENACHER C.; HURK S. D. L.; COHEN G. H.; EISENBERG R. J., Glycoprotein D Homologs in Herpes Simplex Virus Type 1, Pseudorabies Virus, and Bovine Herpes Virus type 1 Bind Directly to Human HveC (Nectin-1) With Different Affinities, **Virology**, United States, v 280, n1, p 7-18, 2001.

COONROD A.; LI F. Q.; HORWITZ M. On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. **Gene Therapy**, United kingdom, v 4, n 12, p 1313–1321,1997.

COPELAND N. G.; JENKINS N. A.; COURT D. L. Recombineering: A Powerful New Tool For Mouse Functional Genomics, **Nature Reviews**, United Kingdom, v 2, n 10, p 769 - 779. 2001.

CUI H.; WANG Y.; SHI X.; TONG G.; LAN D.; HE L.; QIU H.; LIU C.; WANG M. Construction of Marek's Disease Virus Serotype 814 Strain as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome. **Chinese Journal Biotechnology**, Chine, v 24, n4, p 569 - 575, 2008.

DEAN D. A. & GOKAY K. E. Nuclear Import of DNA, **Nuclear Import and Export in Plants and Animals**, 2005.

DELHON G.; MORAES M. P.; LU Z.; C. AFONSO L.; FLORES E. F.; WEIBLEN R.; KUTISH G. F.; ROCK D. L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, United States, v.77, n. 19, p. 10339 -10347, 2003.

DIDCOCK L.; YOUNG D. F.; GOODBOURN S.; RANDALL R. E. The V Protein of Simian Virus 5 Inhibits Interferon Signalling by Targeting STAT1 for Proteasome-Mediated Degradation. **Journal of Virology**, United States, v 73, n 12, p 9928 - 9933, 1999.

DOMI A. & MOSS B, Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in Escherichia coli and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v 99, n 19, p 12415 - 12420, 2002.

FLORES E. F., *Virologia Veterinária*, Editora : UFSM, Santa Maria, 2007.

FRANCO A. C.; SPILKI F. R.; ESTEVES P. A.; LIMA M.; WEIBLEN R.; FLORES E. F.; RIJISEWIJK F. A. M.; ROEHE P. M. Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Brasil, v 22, n 4, p 135 - 140, 2002.

FRANCO A. C.; RIJISEWIJK F. A. M.; FLORES E. F.; WEIBLEN R. ROEHE P. M. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v 33, n 3, p 274 - 278, 2002.

FRANCO A. C.; HUBNER S. O.; OLIVEIRA A. P.; BATISTA H. B. C. R.; ROEHE P. M.; RIJISEWIJK F. A.M. Construction and characterization of bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of gI, gE and US9 genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v 38, n 4, p 667- 673, 2007.

GAETANO D.; EUGENIO M.; CHIARA S.; VANDERPLASSCHEN A.; CAVIRANI S.; FLAMMINI C. F.; GILLET L. Generation of a transposon insertion mutant library for bovine herpesvirus 4 cloned as a bacterial artificial chromosome by *in vitro* MuA based DNA transposition system. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v 141, n 1, p: 63 - 70, 2007.

GERDTS V.; BEYER J.; LOMNICZI B.; METTENLEITER T. C. Pseudorabies Virus Expressing Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein B Exhibits Altered Neurotropism and Increased Neurovirulence, **Journal of Virology**, United States, v 74, n 2, p 817 - 827, 2000.

GIERASCH W. W.; ZIMMERMANN D. L.; WARD S. L.; HEYNINGEN T. K. V.; ROMINEA J. D.; LEIB D. A. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS, **Journal of Virological Methods**, Netherlands, v 135, n 2, p 197 - 206, 2006.

GILLET L.; DAIX V.; DONOFRIO G.; WAGNER M.; KOSZINOWSKI U. H.; CHINA B.; ACKERMANN M.; MARKINE G. N.; VANDERPLASSCHEN A. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. **Journal of General Virology**, United Kingdom, v 86, p 907 - 917, 2005.

GOMES L. I.; ROCHA M. A.; COSTA E. A.; LOBATO Z. I. P.; MENDES L. C. N.; BORGES A. S.; LEITE R. C.; BARBOSA S. E. F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Medicina*, Brasil, v 54, n 2, 2002.

GRAHAM F. L. & VAN DER EB A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, United States, v 52, n 2, p 456 - 67, 1973.

GROLL A. V.; LEVIN Y.; BARBOSA M. C.; RAVAZZOLO A. P. Linear DNA Low Efficiency Transfection by Liposome Can Be Improved by the Use of Cationic Lipid as Charge Neutralizer. **Biotechnology Progress**, United States, v 22, n 4, p 1220 - 1224, 2006.

GROSJEAN F. Correlation between cell cycle and calcium phosphate transient transfection of CHO cells, **Ecole Polytechnique Federale de Lausanne**, 2003.

HÜBNER S.O.; OLIVEIRA A.P.; FRANCO A.C.; ESTEVES P.A.; SILVA A.D.; SPILKI F.R.; RIJSEWIJK F.A.M.; ROEHE P.M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5, **Comparative immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, United Kingdom, v 28, n 3, p 187–196, 2005.

HURK V. D. L.V. S.; HURK V. J.V.; GILCHRIST, J.E.; MISRA, V.; BABIUK, L.A., Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. **Virology**, United States v 135, n 2, p 466 – 479, 1984.

HURK V. D. L. D. S.; BABIUK L. A., Synthesis and processing of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Journal of Virology*, United States, v 59, n 2, p 401 - 410, 1986.

IORIO F. F.; STASI C. Á.; BORGES F. S., Eletroporação: Uma revisão, *Revista Fisioterapia*, v 2, n 2, p 113 – 118, 2007.

JOHNSTON L. A. Y.; SIMMONS G. C.; McGAVIN M. D., A viral meningoencephalitis in calves. **Veterinary Journal**, Australian, v 38, n 7, 207 - 215, 1962.

JORDAN M.; SCHALLHOM A.; WURM F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Research**, United Kingdom v. 24, n. 4, p 596 - 601, 1996.

KRAMPS J. A.; MAGDALENA J.; QUAK J.; WEERDMEESTER K.; KAASHOEK M. J.; MARIS V. M. A.; RIJSEWIJK F. A. M.; KEIL G.; VAN O. J. T. A Simple, Specific, and Highly Sensitive Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Bovine Herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v 32, n 9, p 2175 - 2181, 1994.

KURODA S.; KONDO H.; OHYA K.; KASUGAI S. A New Technique With Calcium Phosphate Precipitate Enhances Efficiency of In Vivo Plasmid DNA Gene Transfer, **Journal of Pharmacological Sciences**, Japan, v 97, n 2, p 227 - 233, 2005.

LEE J. H. & WELSH M. J. Enhancement of calcium phosphate-mediated transfection by inclusion of adenovirus in coprecipitates. **Gene Therapy**, United Kingdom, v 6, n 4, p 676 - 682, 1999.

LYMAN M. G.; RANDALL J. A.; CALTON C. M.; BANFIELD B. W., Localization of ERK/MAP Kinase Is Regulated by the Alpha herpesvirus Tegument Protein Us2. **Journal of Virology**, United States, v 80, n 14, p 7159 - 7168, 2006.

MARS M. H.; JONG M. C.; VAN M. C.; HAGE J. J.; VAN O. J. T., Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v 76, n 1, p 1 - 13, 2000.

MARSHALL R. L.; RODRIGUEZ L. L.; LETOHWORTH G., J., Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. **Journal of Virology**, United States, v 57, n 3, p 745 - 753, 1986.

MAYER S. V.; QUADROS V. L.; VOGEL F. S. F.; WINKELMANN E. R.; ARENHART S.; WEIBLEN R.; FLORES E. F., Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain, **Brasilian journal of Medical and Biological Research**, Brasil, V 39, n 3, p 335 - 343, 2006.

MAYFIELD J. E.; GOOD P. J.; VANOORT H. J.; CAMPBELL A. R. L.; REED D. E., Cloning and Cleavage Site Mapping of DNA from Bovine Herpesvirus 1 (Cooper Strain), **Journal of Virology**, v 47, n 1, p 259 - 264, 1983.

MCGREGOR A. & SCHLEISS M. R., Molecular Cloning of Guinea pig Cytomegalovirus (GPCMV) Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome (BAC) in *Escherichia coli*, v 72, n 1, p 15 -26, 2001.

METZLER A. E.; SCHUDEL A. A.; ENGELS M., Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**. Austria, V 87, n 3 - 4, p 205 - 217, 1986.

MUYLKENS B.; THIRY J.; KIRTEN P.; SCHYNTS F.; THIRY E., Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, France, v 38, n 2, p 181 - 209, 2007.

NEVES C. E. V.; BYK G.; SCHERMAN D.; WILSON P., Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA, **Cell Biology and Toxicology**; United States, v 15, n 3, p 193 - 202, 1999.

OLTONA D.; LI J.; WILSON M. E.; ROGERS T.; CLOSED J.; HUANG L.; KUMTAA P. N.; SFEIR C., Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency, **Biomaterials**, United Kingdom, v 28, n 6, p 1267 - 1279, 2007.

PRASAD T. K.; RANGARAJ N.; RAO N. M., Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. **FEBS Letters**, Netherlands, v 579, n 12, p 2635 - 2642, 2005.

REGGE N.; NAUWYNCK H. J.; GEENEN K.; KRUMMENACHER C.; COHEN G. H.; EISENBERG R. J.; METTENLEITER T. C.; FAVOREEL H. W., α -Herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. **The Journal of Cell Biology**, United States, v 174, n 2, p 267 - 275, 2006.

RISSI D. R.; RECH R. R.; FLORES E. F.; KOMMERS G. D.; BARROS C. S. L., Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v 27, n 7, p 251 - 260, 2007.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHYNTS F.; MCVOY M. A.; MEURENS F.; DETRY B.; EPSTEIN A. L.; THIRY E., The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes, **Virology**, United States, v 314, n 1, p 326 - 335, 2003.

SEELOS C. A., Critical Parameter Determining the Aging of DNA–Calcium-Phosphate Precipitates. **Analytical Biochemistry**. United States, v 245, n 1, p 109 -111, 1997.

SHELDRIK P.; LAITHIER M.; LANDO D.; RYHINER M. L., Infectious DNA from Herpes Simplex Virus: Infectivity of Double-stranded and Single-stranded Molecules, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. United States. v 70, n 12, p 3621 - 3625, 1973.

SILVA, M. S. E.; BRUM M. C. S.; WEIBLEN R.; FLORES E. F., Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006) (2007), **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil v 27, n 10, p 403 - 408, 2007.

SMITH A. G.; GROSS S. P.; ENQUIST L. W. Herpesviruses use bidirectional fast- axonal transport to spread in sensory neurons, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v 98, n 6, p 3466 - 3470, 2001.

SOUZA V. F.; MELO S. V.; ESTEVES P. A.; SCHIMIDT C. S.; GONÇALVES D. A.; SCHAEFER R.; SILVA T. C.; ALMEIDA R. S.; VICENTINI F.; FRANCO A. C.; OLIVEIRA E. A.; SPILK F. R. I.; WEIBLEN R.; FLORES E. F.; LEMOS R. A.; ALFIERI A. A.; PITUCO E. M.; ROEHE P. M., Caracterização de Herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa veterinária brasileira**. v 22, n 1, p13 - 18, 2002.

SOUZA L. F. L.; JÚNIOR A. S.; FREITAS C. M. B.; FREITAS E. C.; FLORES E. F.; ALMEIDA M. R.; MORAES M. P., Imunogenicidade de isolados de herpesvírus bovino 5 como candidatos à vacina, **Ciência Rural**, Brasil, v 39, n 1, p 167 - 172, 2009.

SOKOLOVA V. V.; RADTKEB I.; HEUMANNB R.; EPPLE M.; Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles, **Biomaterials**, United Kingdom, v 27, n 16, p 3147 – 3153, 2006.

SPILKI F. R.; ESTEVES P. A.; FRANCO A. C.; LIMA M.; HOLZ C. L.; BATISTA H. B. R.; DRIEMEIER D.; FLORES E. F.; WEIBLEN R.; ROEHE P. M., Neurovirulência e neuroinvasibilidade de Herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v 22, n 2, p 58 - 63, 2002.

SPILKI F. R.; FRANCO A. C.; TEIXEIRA M. B.; ESTEVES P. A.; SCHAEFER R.; SCHMIDT E.; LEMOS R. A.; ROEHE P. M., Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v 23, n 1, p 1 - 4, 2003.

STRAIN A. J.; WYLLIE A. H., The uptake and stability of Simian-virus-40 DNA after calcium phosphate transfection of CV-1 cells **Biochemical Journal**, United Kingdom, v 218, n 2, p 475 - 482, 1984.

TSENG W. C.; FREDERICH R. H.; TODD D. G.; Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v 1445, n 1, p 53 - 64, 1999.

UMBACH J. L.; KRAMER M.F.; JURAK I.; KARNOWSKI H. W.; COEN D. M.; CULLEN B. R., MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs, **Nature**, United Kingdom, v 454, n 7205, p 780 - 783, 2008.

VAN Z. M.; QUINT W.; BRIAIRE, J.; ROVER T.; GIELKENS A.; BEMS A. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. **Journal of Virology**, United States, v 62, n 6, p 2191 – 2195, 1988.

WAGNER M.; RUZSICS Z.; KOSZINOWSKI U. H. Herpesvirus genetics has come of age. **Trends in Microbiology**, United Kingdom, v 10, n 7, p 318 - 324, 2002.

WEBER F.; HALLE O., Viral suppression of the interferon system, **Biochimie**, France, v 89, n 6-7, p 836 - 842, 2007.

WELZEL T.; RADTKE I.; MEYER Z. W.; HEUMANN R.; EPPLE M., Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. **Journal of Materials Chemistry**, United Kingdom, v 14, n 14, p 2213 - 2217, 2004.

WILD P.; SCHRANER M. E.; CANTIENE D.; LOEPFE E.; WALTHER P.; MÜLLER M.; ENGELS M., The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy, **Micron**, United States, v 33, n 4, p 327 - 337, 2002.

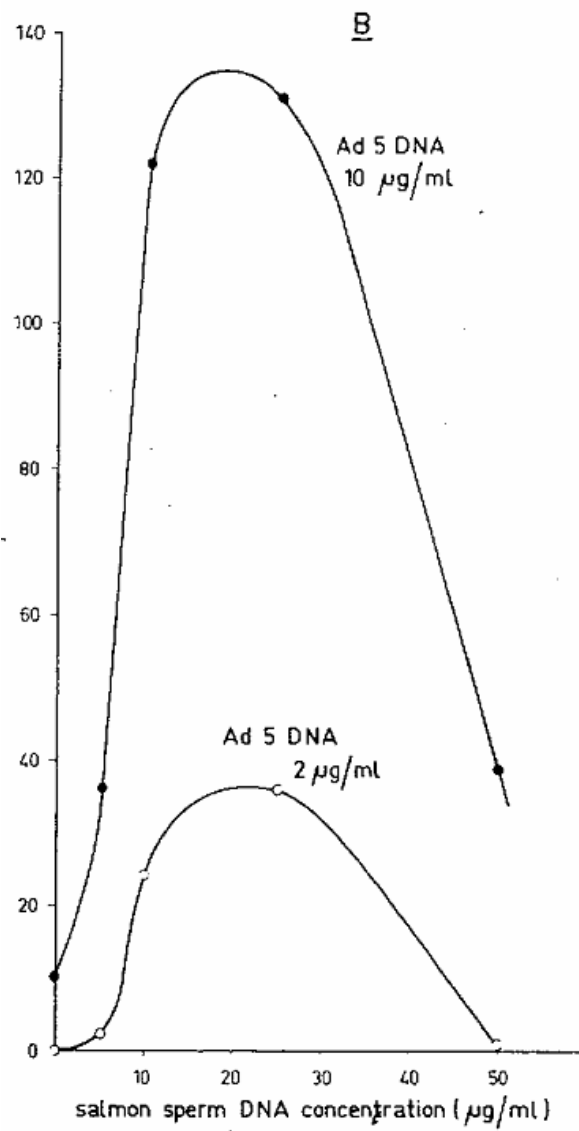
WILSON S. P.; LIU F.; WILSON R. E.; HOUSLEY P. R., Optimization of calcium phosphate transfection for bovine chromaffin cells: relationship to calcium phosphate precipitate formation. **Analytical Biochemistry**, United States, v 226, n 2, p 212 - 220, 1995.

XIAOHONG C.; MCGREGOR A.; SCHLEISS M. R.; MCVOY M. A., Cloning the complete guinea pig cytomegalovirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome with excisable origin of replication. **Journal of Virological Methods**, Netherlands, v 149, n 2, p 231 - 239, 2008.

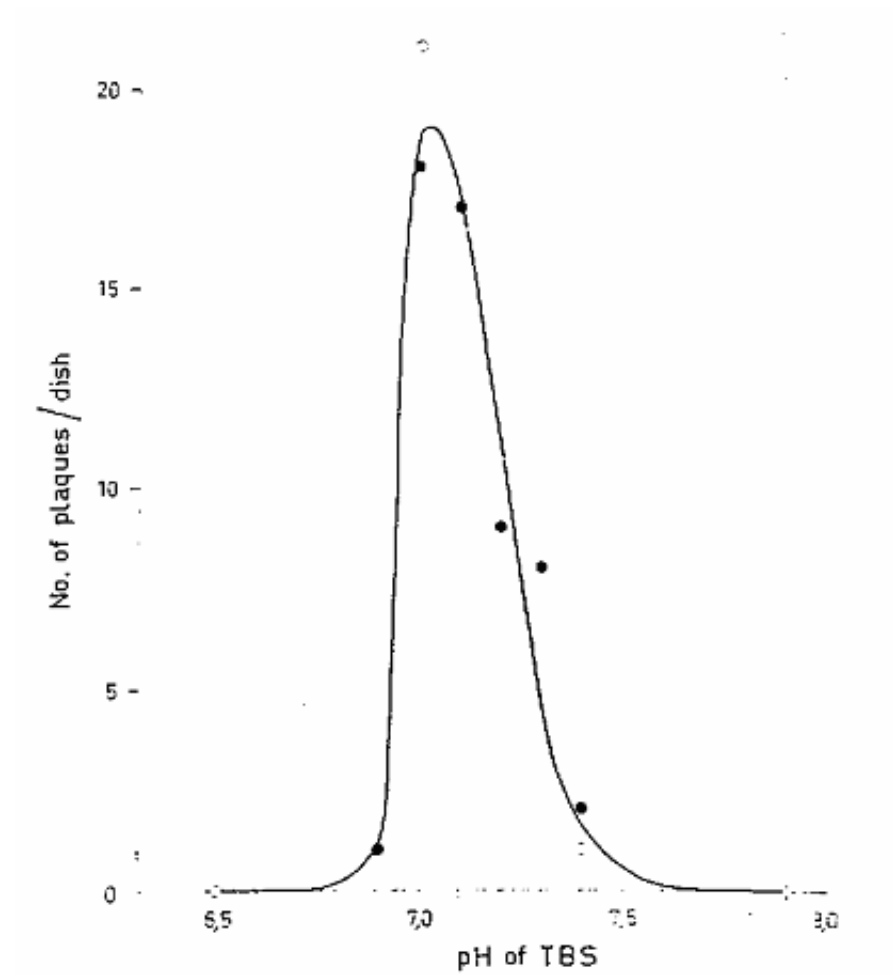
ZHIJIAN W.; XIAOBING W.; YUNDE H., Generation of a recombinant herpes simplex virus which can provide packaging function for recombinant adeno-associated virus, **Chinese Science Bulletin**, Chine, v 44, n 8, p 715 - 719, 1999.

8 ANEXOS

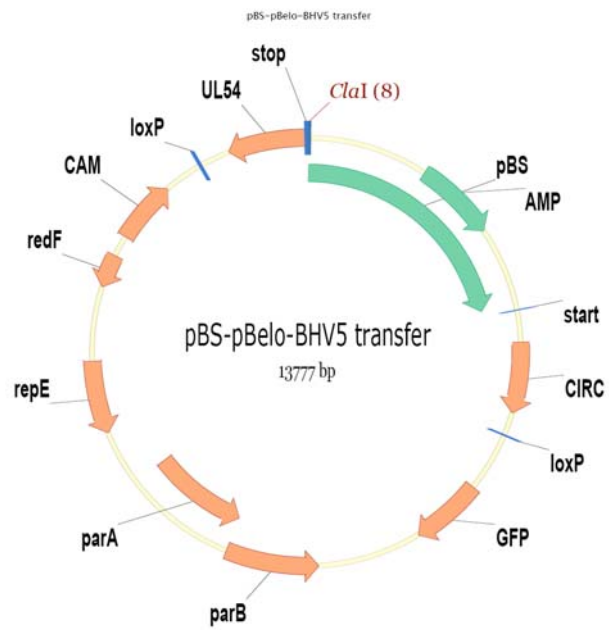
ANEXO A – Gráfico da quantidade de células transfectadas versus quantidade de DNA transfectado.



ANEXO B - Gráfico da quantidade de células transfectadas versus variação do pH

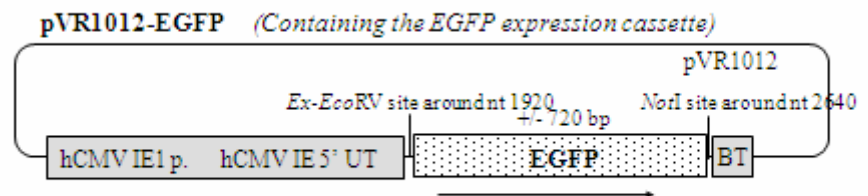


ANEXO C - Plasmídeo pBS-pBELO-BHV-5-Transfer

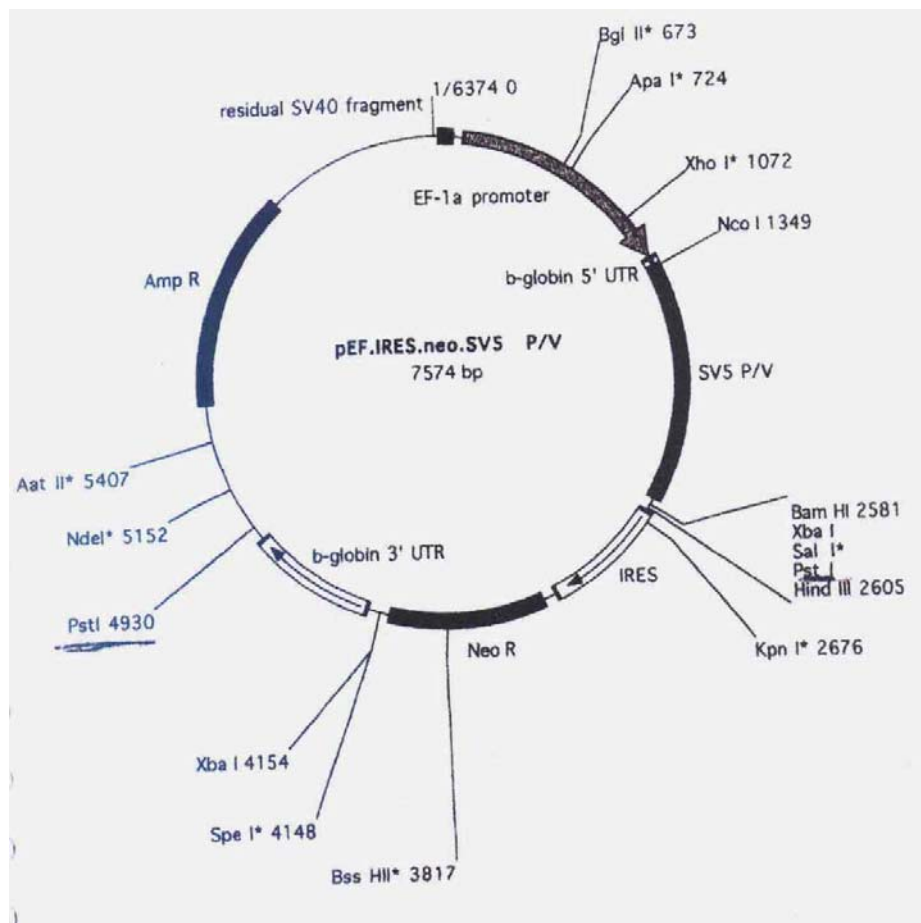


Friday, March 07, 2008 08:25:47 AM Page 1

ANEXO D- Plasmídeo pRV1012+EGFP



ANEXO E – Plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V



9 APÊNDICE

APÊNDICE A - Solução estoque de HBS 10X

Seis gramas de Hepes 250 mM - Sigma, 8,2 g de NaCl 1,4 M, 0,37 g de KCl 50 mM – LABSYNTH, 1,08 g de D(+)-Glucose 60 mM – MERCK e 0,38 g de Na₃PO₄ 12H₂O 1M – Nuclear, em 100 mL.

APÊNDICE B – Esquema de transfecção de DNA total de BoHV1-

gE-

DNA total	DNA de esperma de salmão 1 µg/µL	H2O deionizada	CaCl ₂ 2M	HBS-pH 7,14	Total
20µL = 8µg	2µL	196,75µL	31,25µL	250µL	500µL
40µL = 16µg	0µL	178,75µL	31,25µL	250µL	500µL
C-	10µL	206 µL	31,25 µL	250 µL	500 µL

APÊNDICE C- Co-transfecção de DNA viral purificado e DNA

plasmideal.

DNA viral	DNA pRV1012+EGFP	DNA salmão 1µ = 1µg	H2O deionizada	CaCl2 2M	HBS 2X	pH
5µg=25µL	5µg=11µL	0 µL	151,5µL	31,25µL	250µL	7,0
5µg=25µL	5µg=11µL	0 µL	151,5µL	31,25µL	250µL	7,14
C-	0	10 µL	177,5µL	31,25µL	250µL	7,14

APÊNDICE D – Esquema de transfecção em células TT com

plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V

pEF.IR ES.neo .SV5	DNA viral	DNA de esperma de salmão 1µg/µL	H2O deioniza da	CaCl2 2M	HBS 2X pH=7,1 4	Total
1µL = 500ng	16,6µL= 500ng	9,5µL	191,65µL	31,25µL	250µL	500µL
2µL = 1µg	16,6µL= 500ng	9µL	191,15µL	31,25µL	250µL	500µL
4µL = 2µg	16,6µL= 500ng	8µL	190,15µL	31,25µL	250µL	500µL