

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

Manipulação por engenharia genética do genoma do vírus da febre aftosa para a construção de novos candidatos a vacinas

Márcia Rogéria de Almeida

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre
1998

Manipulação por engenharia genética do genoma do vírus da febre aftosa para
a construção de novos candidatos a vacinas

Executor: Márcia Rogéria de Almeida
Doutoranda do Curso de Pós - Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica - Departamento de Bioquímica -
Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Luiz Shozo Ozaki
Departamento de Biotecnologia - Centro de
Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

Local de execução: "Plum Island Animal Disease Center"
(P.I.A.D.C.)
USDA, ARS, Greenport, NY - USA

Este trabalho recebeu a colaboração financeira das seguintes instituições:

- Centro de Aperfeiçoamento de Pesquisa e Ensino Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- USDA, ARS, CRIS Project # 1940-32000-027-00D - USA

Dedico esta tese aos meus pais e a
minha avó

Ao Dr. Peter Willard Mason, que me transmitiu seus conhecimentos e experiências profissionais com dedicação e carinho, que me guiou para além das teorias das filosofias e das técnicas, cuja convivência, é exemplo de vida dedicada à ciência, expresse os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que sempre serão poucos, diante do muito que me foi oferecido.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, o meu muito obrigada por ter me dado forças para chegar até aqui.

- À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao Departamento de Bioquímica e ao Centro de Biotecnologia por terem aberto as portas para que eu pudesse ingressar no curso de Doutorado.

- Ao Prof. Luiz Shozo Ozaki, toda gratidão, por ter colocado em minhas mãos as ferramentas com que abrirei os caminhos e horizontes, e que através de um esforço comum, consciente e honesto, transformou o meu ideal em realização.

- Aos amigos Cláudio Mafra, Rosa Déa, Elizabeth Herrera, Ingrid Porto, Carlos Alexandre, Gertrudes Corção, Sérgio Silva, Daniel, Marianela, Gaby, Flávio e todos os colegas do Centro de Biotecnologia da UFRGS, pelo agradável convívio, colaboração e amizade.

- Ao "Plum Island Animal Disease Center" (P.I.A.D.C.), Greenport, NY, U.S.A., que através destes 2 anos permitiu a minha dedicação à pesquisa e a concretização deste trabalho de tese.

- À Elizabeth Rieder que compartilhou o meu ideal e o alimentou, incentivando-o a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos. A você que sempre esteve ao meu lado, dedico minha conquista com a mais profunda admiração e respeito.

- Ao amigo Gordon Ward, pela imprescindível ajuda na realização dos testes de neutralização e na vacinação com "gene gun".

- Aos amigos Clayton Beard e Jarasvech Chinsangaram, cuja ajuda e participação nos experimentos com animais, foram imprescindíveis na execução deste trabalho.

- Ao Marvin J. Grubman, minha homenagem e gratidão pela ajuda nos testes de neutralização, pela dedicação e amizade.

- Ao amigo José Mário Mezêncio pela ajuda amiga, colaboração e realização dos testes de ELISA.

- Aos amigos Tina Knipe, Brad Bissel, Kaija Beard e Marla Zellner pela imprescindível e eficiente ajuda técnica.

- Aos amigos, da seção de experimentos com animais, pela grande ajuda, o meu profundo agradecimento.

- Ao J. R. Emmanuelli, pela imprescindível ajuda na realização de fotografias, durante todo o decorrer da experimentação com animais, e durante a realização deste trabalho de tese.

- À amiga Joann Zamparo, que soube cultivar uma amizade que o tempo amadureceu, os meus sinceros agradecimentos. E que, mesmo agora, quando partirei em busca de um novo caminho, não se apaguem ou esmaçam os brilhos do companheirismo e do respeito mútuo.

- Aos amigos Cláudio Afonso, Edan Tulman, Brenda Rodd e Luiz Rodrigues, pela amizade e convívio enriquecedor.

- Aos colegas do grupo da febre aftosa, Barry Baxt, Fred Brown, Fran Nargi, Michael LaRocco, Greg Mayer, Tom Bunch, Sherry Neff e Dominic Travis, pelo agradável convívio, colaboração e amizade.

- Ao amigo Juan Lubroth, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e carinho.

- Às secretárias Adrienne Ciupryk, Sherri Parkhurst, Prue Brashiche, Maria Martocchia e Barbara Weber, pela amizade, atenção especial e colaboração constante.

- A todos os funcionários e colegas de P.I.A.D.C. que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

- Ao amigo Terry Lewis "in memoriam", o meu muito obrigado por ter tido a oportunidade de conviver com você.

ÍNDICE GERAL

	Página
RESUMO	1
INTRODUÇÃO	5
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	6
1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PICORNAVÍRUS	7
1.3 A FEBRE AFTOSA	10
1.3.1 O vírus da febre aftosa (VFA) e a doença produzida por ele	10
1.3.2 Distribuição geográfica e medidas de controle da febre aftosa	12
1.4 O VÍRUS DA FEBRE AFTOSA	14
1.4.1 Estrutura e composição dos vírions do VFA	14
1.4.2 Estrutura e organização do genoma do vírus da febre aftosa	17
1.4.3 Proteínas codificadas pelo genoma do VFA	21
1.4.4 Ciclo de replicação do vírus da febre aftosa	24
1.4.5 Imunogenicidade e vacinas de hoje	27
1.4.6 Vacinas de polipeptídeos manipuladas geneticamente	29
1.4.7 Manipulação do genoma viral para a produção de vacinas	31
MÉTODOS	37
2.1 CULTIVO CELULAR	38
2.1.1 Crescimento de células BHK clone 21	38
2.1.2 Crescimento de células CHO11.1	39

	Página
2.1.3	Crescimento de células LK 39
2.2	CRESCIMENTO DO VÍRUS, DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS E IMUNOPEROXIDAÇÃO 40
2.2.1	Crescimento do vírus 40
2.2.2	Ensaio de unidades formadoras de placas 41
2.2.3	Ensaio de imunoperoxidase 42
2.3	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS 43
2.3.1	Caracterização antigênica de isolados virais 43
2.3.2	Detecção de anticorpos anti-virais por ensaio de redução de placas (NEUT) 45
2.3.3	Detecção de anticorpos anti-virais por radioimunoprecipitação (RIP) 46
2.3.4	Detecção de anticorpos anti-virais por ELISA 47
2.4	ISOLAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO/ TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR 49
2.4.1	Isolamento de RNA 49
2.4.2	Preparação de cDNA 50
2.4.3	Reação de polimerase em cadeia (PCR) 51
2.5	CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA VIRAL 52
2.5.1	Recuperação em gel de agarose dos fragmentos amplificados por PCR 52
2.5.2	Reação de ligação e transformação bacteriana 53
2.5.3	Triagem bacteriana por PCR 54

	Página
2.5.4	Triagem bacteriana por digestão de minipreparação de DNA plasmidial 55
2.5.5	Preparação de DNA de alta pureza para subclonagem, sequenciamento, preparação de RNA, transfecção ou inoculação de animais 57
2.5.5.1	Preparação de DNA pelo método de WIZARD 57
2.5.5.2	Produção de DNA em larga escala 58
2.5.5.3	Centrifugação em gradiente de CsCl 59
2.5.5.4	Acoplamento de DNA à partículas de ouro 60
2.6	SEQUENCIAMENTO 62
2.6.1	Sequenciamento manual 62
2.6.2	Sequenciamento automático 64
2.7	TRANSFECÇÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE 66
2.7.1	Preparação de RNA <i>in vitro</i> 66
2.7.2	Eletroporação de células BHK 67
2.7.3	Infecção de células BHK por "Lipofectin™" 68
2.7.4	Recuperação de vírus 69
2.7.5	Purificação do vírus 70
2.8	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL 71
2.8.1	Estudos de patogênese e vacinação em bovino 71
2.8.2	Suínos 72
2.8.2 1	Estudos patogênicos 72
2.8.2 2	Estudos de vacinação 73

	Página
RESULTADOS	75
3.1 PRODUÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTENDO CÓPIAS DO TAMANHO DO GENOMA INFECCIOSO DO VÍRUS A12 COM O SEU CAPSÍDEO SUBSTITUÍDO PELO CAPSÍDEO DO VÍRUS A24	76
3.1.1 Produção de clone de cDNA contendo o genoma completo (FLC) do tipo A24 do vírus da febre aftosa (VFA)	76
3.1.1.1 Vírus estoque	76
3.1.1.2 Amplificação por PCR	77
3.1.1.3 Clonagem e recuperação do vírus vivo contendo todo o fragmento L do genoma do vírus A24	80
3.1.2 Clonagem e recuperação do vírus vivo contendo apenas a região P1 do genoma do vírus A24	84
3.1.3 Avaliação dos vírus ARM8 e ARM10	90
3.1.3.1 Caracterização antigênica	90
3.1.3.2 Caracterização genética	90
3.1.3.3 Caracterização patogênica	100
3.1.3.3.1 Infecção de suínos com o vARM8	100
3.1.3.3.2 Infecção de suínos com o vARM10	105
3.2 PRODUÇÃO DO VÍRUS A24 ATENUADO	107

	Página	
3.2.1	Produção do vírus A24 deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD a partir do vARM10	107
3.2.1.1	Construção do plasmídeo mutante pARM10-RGD ⁻	107
3.2.1.2	Recuperação do vírus vivo e caracterização <i>in vitro</i>	111
3.2.1.3	Caracterização patogênica	113
3.2.1.3.1	Suínos infectados com vARM10-RGD ⁻	113
3.2.1.3.2	Recuperação e avaliação do vírus	121
3.2.2	Produção do vírus A24 deletado da região codificadora da proteinase líder a partir do vARM8.	121
3.2.2.1	Construção do plasmídeo mutante LLARM8	121
3.2.2.2	Recuperação do vírus vivo e caracterização <i>in vitro</i>	124
3.2.2.3	Caracterização patogênica	126
3.2.2.3.1	Suínos infectados com vLLARM8	126
3.2.2.3.1	Recuperação e avaliação do vírus	130
3.3	DESENVOLVIMENTO DO VÍRUS LÍDER MENOS E DA VACINA ATENUADA COM MUTAÇÃO NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR DA CEPA O1 CAMPOS	130
3.3.1	Vírus O1 Campos deletado da região codificadora da proteinase líder (vLLCRM8)	130
3.3.1.1	Construção do pLLCRM8	131
3.3.1.2	Caracterização <i>in vitro</i> do vCRM8 e do vLLCRM8	131
3.3.1.3	Caracterização do vLLCRM8 no bovino 67	134
3.3.1.4	Caracterização dos vCRM8 e vLLCRM8 em suínos	136

	Página	
3.3.1.4.1	Infecção de suínos com o vCRM8	136
3.3.1.4.2	Infecção de suínos com o vLLCRM8	140
3.3.2	Adição do sítio de ligação do receptor mutado e conversão à forma de DNA	141
3.3.3	Teste de segunda geração de candidatos a vacinas	147
	DISCUSSÃO	151
4.1	DESENVOLVIMENTO DO cDNA CONTENDO O GENOMA COMPLETO (FLC) DO VÍRUS A24	155
4.2	PRODUÇÃO DO VÍRUS QUIMÉRICO A24 CRUZEIRO DELETADO DA REGIÃO CODIFICADORA DOS AMINOÁCIDOS RGD	158
4.3	PRODUÇÃO DOS VÍRUS QUIMÉRICOS A24 CRUZEIRO E O1 CAMPOS DELETADOS DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEINASE LÍDER (L)	160
4.4	ADIÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR MUTADO AO VIRUS O1 CAMPOS DELETADO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEINASE LÍDER (L) E A SUA CONVERSÃO À FORMA DE VACINA DE DNA	163
	REFERÊNCIAS	167

Lista das Figuras

		Página
Figura 1	Representação esquemática do genoma do VFA mostrando a maturação proteolítica e construção do capsídeo	18
Figura 2	Representação esquemática do pRMC35, clone infeccioso contendo o genoma completo (FLC) do VFA sorotipo A12 e da vacina de DNA, pWRMH-X	33
Figura 3	Comparação do receptor natural e do receptor manipulado geneticamente do VFA sorotipo A12	35
Figura 4	Reatividade dos vírus A24 com diferentes anticorpos monoclonais (AcM)	78
Figura 5	Representação esquemática do genoma do VFA e estratégia para a organização de FLC do tipo A24 do VFA	79
Figura 6	Representação esquemática da estratégia para organização de FLC tipo A24/A12 do VFA	83
Figura 7	Representação esquemática dos vírus A24 quiméricos	87
Figura 8	Perfis dos gradientes de densidade de sacarose dos vARM8 e vARM10	89
Figura 9	Reatividade dos vírus quiméricos vARM8 e vARM10, os quais expressam capsídeos do tipo A24 Cruzeiro, com diferentes AcM	91
Figura 10	Seqüência de ácidos nucleicos	93
Figura 11	Seqüência de aminoácidos	97

Lista das Figuras

	Página	
Figura 12	Posições dos resíduos dos aminoácidos 56 e 99 em VP1 e 178 em VP3 no protômero do VFA sorotipo O1	99
Figura 13	Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM8	101
Figura 14	Fotografias das patas dos suínos infectados com o vARM8 (Painel A) ou com o vARM10 (Painel B)	102
Figura 15	Títulos de anticorpos neutralizantes (NEUT) e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM8.	104
Figura 16	Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM10	106
Figura 17	Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM10	108
Figura 18	Representação esquemática da construção do pARM10-RGD ⁻	110
Figura 19	Autoradiograma mostrando as proteínas do VFA expressadas pelos vARM10 e vARM10-RGD ⁻	114
Figura 20	Comparação da reatividade vARM10 e do vARM10-RGD ⁻ com diferentes AcM	115
Figura 21	Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM10-RGD ⁻	117

Lista das Figuras

	Página
Figura 22	Fotografias das patas dos suínos infectados com o vARM10-RGD- (Painel A) ou com o vLLARM8 (Painel B) 118
Figura 23	Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM10-RGD- 120
Figura 24	Representação esquemática da construção do pLLARM8 123
Figura 25	Formação de placas pelo vARM8 ou pelo vLLARM8 em monocamadas de cultura de células BHK e LK 125
Figura 26	Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vLLARM8 127
Figura 27	Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vLLARM8 129
Figura 28	Representação esquemática da construção do pLLCRM8 132
Figura 29	Temperatura de um bovino após inoculação com o vLLCRM8 e após desafio com o WT-O1 Campos 135
Figura 30	Sinais da doença nos grupos de suínos inoculados com o vCRM8 ou com o vLLCRM8 137
Figura 31	Fotografias das patas dos suínos infectados com o vCRM8 (Painel A) ou com o vLLCRM8 (Painel B) 138

Lista das Figuras

	Página	
Figura 32	Títulos de NEUT de grupos de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com o vCRM8 ou com o vLLCRM8	139
Figura 33	Representação esquemática da construção do pLLCRM48-KGE e da vacina de DNA	143
Figura 34	Reatividade do vLLCRM8 ou do vLLCRM48-KGE com diferentes AcM	144
Figura 35	Títulos de NEUT (Painel A) e temperatura (Painel B) de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vLLCRM48-KGE	146

Lista das Tabelas

	Página	
Tabela 1	Características físico-químicas da família Picornaviridae	9
Tabela 2	Distribuição geográfica dos tipos e subtipos do VFA	13
Tabela 3	Propriedades gerais do vírus da febre aftosa	16
Tabela 4	Propriedades dos vírus A24 Cruzeiro em cultura de células BHK e CHO11.1	81
Tabela 5	Características de RNAs sintéticos contendo o fragmento L do vírus A24 com o fragmento S e o poli C do vírus A12 na monocamada de células BHK, transfectadas pelo uso de "Lipofectin™"	85
Tabela 6	Características de RNAs sintéticos contendo a região P1 do vírus A24 no genoma do vírus A12 na monocamada de células BHK, transfectadas pelo uso de "Lipofectin™"	88
Tabela 7	Habilidade de formação de placas do WT-A24 (vARM10) e do VFA deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD (vARM10-RGD ⁻), em diferentes culturas de células	112
Tabela 8	Resposta imune de suínos ao vírus inativado com BEI, à vacina de DNA (pWRM-LLCRM48-KGE) ou ao vírus vivo (vLLCRM48-KGE)	148

RESUMO

A febre aftosa é uma doença altamente infecciosa dos animais artiodáctilos, mantendo-se como um dos maiores problemas para a saúde do gado em muitos países desenvolvidos e constituindo uma ameaça contínua para os países livres da doença. O agente etiológico desta doença, o vírus da febre aftosa (VFA), pertence ao gênero *Aphthovirus* da família Picornaviridae.

Vacinas convencionais do VFA consistindo do vírus total inativado, tem sido instrumento no controle da doença em muitas partes do mundo. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tem surgido um grande interesse na produção de vacinas sintéticas. Estas novas vacinas irão eliminar os riscos associados com o isolamento de grandes quantidades de vírus infecciosos e impedir a produção de vacinas inativadas inapropriadamente (BARTELING & VREESWIJK, 1991). Recentemente, tem sido desenvolvido uma nova geração de vacinas baseadas em vírus (re)construídos. O extensivo conhecimento do VFA a nível molecular e a facilidade de manipulação do DNA recombinante, tem levado à produção de clones de cDNA infecciosos do tipo O1 (ZIBERT *et al.*, 1990) e do tipo A12 (RIEDER *et al.*, 1993), facilitando o desenvolvimento racional de vacinas virais vivas atenuadas. Baseado nestas informações, variantes genéticas do VFA sorotipo A12 deletadas da região codificadora dos aminoácidos RGD (McKENNA *et al.*, 1995), os quais tem sido implicados no mecanismo de reconhecimento celular, tem sido produzidas. Estes vírus demonstraram ser incapazes de crescerem nas células normais e não foram capazes de causar doença nos animais.

Neste trabalho nós descrevemos a construção do vírus quimérico A24 Cruzeiro e a produção de uma variante genética deletada da região codificadora dos aminoácidos RGD (RGD⁻). Um experimento realizado em suínos para testar a inocuidade deste vírus, demonstrou que o vírus A24 RGD⁻

não foi capaz de ser transmitido para os animais não inoculados, embora uma replicação limitada, mas detectável, foi observada nos suínos inoculados. Os resultados deste experimento nos sugere que este vírus pode ser utilizado como uma fonte segura de antígenos na produção de vacinas virais inativadas quimicamente.

Tentativas na produção de vacinas atenuadas para o VFA tem falhado, devido à reversão da sua virulência (BARTELING & VREESWIJK, 1991). Variantes do VFA contendo a deleção da região codificadora da proteinase líder (A12-LLV2; PICCONE *et al.*, 1995) tem sido produzidas. Este tipo de vacina não tem a capacidade de reverter e mostrou ser avirulenta em bovinos e suínos. Vírus atenuados dos sorotipos A24 Cruzeiro e O1 Campos também sido produzidos pela deleção da região codificadora da proteinase líder (LL). O vírus LLA24 causou doença em animais inoculados, mas ele não foi transmitido para os animais não inoculados. O vírus LLO1 não foi capaz de causar doença quando inoculado em um bovino, mas suínos inoculados mostraram vesículas pequenas e o vírus foi transmitido para um dos animais não inoculados. Ambos os vírus LL mostraram ser mais virulentos do que o A12-LLV2, sugerindo que os seus capsídeos são mais virulentos do que os capsídeos A12, resultando em cepas que retêm a habilidade para causar doença. Consequentemente, a baixa virulência demonstrada por estes vírus LL, não permite que os mesmos sejam utilizados na produção de vacinas.

Com o intuito de se produzir uma cepa mais atenuada, nós alteramos as características de ligação do vírus LLO1, modificando a seqüência RGD para KGE e adicionando um resíduo de carga positiva no capsídeo, o qual permite a ligação ao receptor não natural heparan sulfato (HS). Este vírus foi capaz de

crescer em células normais, utilizando o receptor HS, demonstrou ser avirulento em suínos, mas não foi capaz de replicar nos animais o suficiente para produzir uma resposta imune adequada. Isto nos sugere que a atenuação do vírus pela deleção da região codificadora da proteinase líder, pela alteração da seqüência RGD por KGE e pela adição do sítio de ligação ao HS, redirecionam o vírus para tipos celulares alternativos, produzindo vírus que são ineficientes na produção *in vivo* de antígenos, capazes de estimularem uma resposta imune suficiente.

INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A febre aftosa (FA) é uma doença viral com um grande impacto econômico sobre a bovinocultura em alguns países da América do Sul, tais como Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Perú. Além dos prejuízos diretos ocasionados aos animais afetados (diminuição de peso, menor produção de leite), são importantes as perdas indiretas devido às restrições impostas no exterior pelos mercados livres da doença.

Nos países onde a febre aftosa é endêmica, extensivos programas de vacinação são desenvolvidos anualmente na tentativa de controlar tal doença. Atualmente as vacinas contra a febre aftosa são feitas utilizando o vírus inativado. Neste processo, vírus altamente patogênicos são multiplicados em células BHK em cultura (BACHRACH, 1977) e posteriormente inativados com agentes químicos como etilenimina binária (BEI) (BAHNEMANN, 1990). Este tratamento mantém a atividade original de fixação de complemento das partículas virais, mas estas são inócuas às células em cultura ou a animais *in vivo* (BACHRACH *et al.*, 1975). Como estas vacinas são produzidas a partir de vírus naturais e portanto patogênicos, existe a possibilidade de que a inativação das partículas virais não seja total. A vacinação assim implica na perpetuação da doença pela liberação de vírus altamente patogênicos ao campo.

Nos últimos anos, a vacinação com as vacinas tradicionais tem sido parte de um controle estratégico que tem sido particularmente efetivo no oeste da Europa e algumas partes da América do Sul. A recente erradicação da febre aftosa do Uruguai e do Estado do Rio Grande do Sul tem aumentado o desejo

de outros Estados no Brasil de se tornarem livres da doença aftosa, permitindo-lhes o acesso ao mercado internacional.

Apesar da implementação da política de vacinação contra a febre aftosa e de dados otimistas para a sua erradicação, a doença ainda ocorre em muitas áreas do Brasil. Em 1993, por exemplo, 170 milhões de doses de vacinas trivalentes foram administradas em toda nação. Durante o mesmo ano, 2090 focos da doença foram reportados, dos quais 249 foram reportados no estado de Minas Gerais. O vírus tipo A foi o mais prevalente, seguido pelos tipos O e C. Apesar da eficácia desta vacina, a doença persiste na maior parte do país e em áreas onde nenhum foco da doença clínica foi citada, é possível que o vírus esteja circulando em um nível subclínico, através de animais vacinados que se tornaram infectados e que podem estar servindo como carreadores (SALT, 1993).

O objetivo deste trabalho é produzir cepas vacinais do vírus da febre aftosa para a produção de vacinas que sejam tão efetivas como as atuais, mas que possam ser produzidas pelas indústrias produtoras de vacinas, sem os riscos de liberação durante sua produção e também sem os riscos de propagação de vírus patogênicos por animais vacinados.

1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PICORNAVÍRUS

Os picornavírus incluem os vírus com genoma RNA, poliédricos e sem invólucro, que se caracterizam por serem importantes patógenos para o homem e numerosos animais de interesse econômico.

A família Picornaviridae é dividida em quatro gêneros: enterovírus, rinovírus, cardiovírus e aftovírus (COOPER *et al.*, 1978; MATTHEWS, 1982) (Tabela 1).

Eles podem ser distinguidos por suas propriedades físico-químicas e sorológicas como também, por suas características próprias de infecção em hospedeiros susceptíveis. Cada gênero por sua vez, é subdividido em tipos e subtipos, mediante a caracterização de seus antígenos de superfície (COOPER *et al.*, 1978; SANGAR, 1979).

As propriedades gerais dos picornavírus podem ser resumidas nos seguintes pontos:

1- Os capsídeos virais são compostos por 60 cópias de cada uma das proteínas virais: VP1, VP2, VP3 e VP4. Estas proteínas possuem uma estrutura tridimensional que se encontra muito conservada entre todos os membros da família (ACHARYA *et al.*, 1989).

2- O genoma consiste de uma única molécula de RNA, fita simples, que atua como mensageiro tanto *in vivo* como *in vitro* (BELSHAM, 1993).

3- A tradução do RNA viral dá como produto uma poliproteína que corresponde a maior parte da capacidade codificadora do RNA. Seu processamento, ocorre em várias etapas, dando lugar às proteínas estruturais e não estruturais do vírus (STREBEL & BECK, 1986; VAKHARIA *et al.*, 1987; RYAN *et al.*, 1989).

4- A replicação do genoma viral inclui a síntese de uma cadeia de RNA (fita negativa) complementar ao RNA genômico. Isto se dá através da formação de um intermediário replicativo que pode ser isolado de células infectadas. O complexo de replicação está associado à membrana celular e inclui uma polimerase viral e, o RNA que é utilizado como molde

Tabela 1: Características físico-químicas da família Picornaviridae

Gênero	Estabilidade em pH	Densidade de flutuação (CsCl) Vírion	Densidade de flutuação (CsCl) Capsídeo	Coefficiente de sedimentação (S)
Enterovírus (Poliovírus)	estável de 3-9	1,34	1,30	156
Cardiovírus (EMCV) ^a	estável de 3-9	1,34	1,30	156
Rinovírus (RVH) ^b	sensível em 6	1,39 - 1,42	1,29	148
Aftovírus (VFA)	sensível em 7	1,43 - 1,45	1,30	142 - 146

Referências: NEWMAN *et al.*, 1973; RUECKERT & WIMMER, 1984.

a encefalomiocardites

b rinovírus humano

(FLANEGAN & BALTIMORE, 1977; SEMLER *et al.*, 1981; GRUBMAN *et al.*, 1984a).

1.3 A FEBRE AFTOSA (FA)

1.3.1 O Vírus da febre aftosa (VFA) e a doença produzida por ele

O vírus da febre aftosa, pertencente ao gênero Aphthovirus, da família Picornaviridae (RUECKERT, 1996), é o agente causador da febre aftosa, doença que afeta principalmente o rebanho suíno, bovino, ovino e caprino e eventualmente animais selvagens como antílopes, veados e elefantes (RAHMAN *et al.*, 1988). Infecções experimentais podem ser feitas ainda em camundongos e cobaias.

A febre aftosa é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária devido a seu caráter infeccioso e epidêmico, sendo que as perdas econômicas diretas na produtividade chegam a 25%. A interferência desta doença no mercado situa-se principalmente na diminuição da produção de leite e carne, bem como nas restrições à comercialização de animais e subprodutos tanto a nível nacional como internacional, incluindo a não exportação de qualquer produto de origem animal para países onde a doença está controlada ou completamente erradicada.

A transmissão do vírus é feita principalmente por meio de animais infectados, especialmente durante a fase febril da doença, através da saliva, fezes, urina, leite e pelo vento, desde que hajam condições ideais de temperatura e umidade.

O vírus mantém-se estável nos produtos animais, sendo que este sobrevive por anos após o congelamento da carne (o congelamento impede a formação de ácido láctico, que inativa o vírus), em alimentos defumados (em nódulos linfáticos, fragmentos de ossos e coágulos de sangue), em manteiga e em leite em pó.

Esta doença se caracteriza por causar depressão, febre e formação de lesões vesiculares e subsequente erupção do epitélio bucal, nasal, pés, úberes e pilares ruminantes (BACHRACH, 1968; BROOKSBY, 1982; citados em DELLA PORTA, 1983). A infecção em animais jovens pode afetar o miocárdio e em alguns casos, pode provocar sua morte (BACHRACH, 1968). A presença de vesículas na boca dificulta a ingestão de alimentos e as lesões nas patas dificulta o caminhar do animal, sendo frequentes também, os abortos em animais durante a gestação. Posteriormente, o nível de anticorpos neutralizantes em circulação se eleva, o vírus desaparece da corrente sangüínea mas não necessariamente dos tecidos.

Após a fase aguda, os animais podem converter-se em portadores do vírus da FA, espalhando vírus pelas secreções esôfago-faringeanas por um longo período. São várias as espécies de animais descritas como portadores do vírus (CALLIS, 1984), sendo que os casos mais estudados se referem a bovinos que desenvolveram a doença, inclusive com altos níveis de anticorpos neutralizantes (VAN BEKKUM *et al.*, 1959; SUTMOLLER & GAGGERO, 1965). Tem-se documentado a presença do vírus até 3 anos e meio em bovinos (HARGREAVES, 1994). Estudos com búfalos, principalmente o búfalo africano, tem mostrado que esta espécie é susceptível à FA e que o vírus pode persistir por longos períodos (DAWE *et al.*, 1994). No Brasil, a infecção persistente da FA foi demonstrada no búfalo indiano (SAMARA &

PINTO, 1983). A duração do estado portador varia em diferentes situações e parece depender do tipo viral causador da infecção (SADIR *et al.*, 1988).

Foram detectadas variações na seqüência nucleotídica do RNA viral em animais infectados persistentemente com o vírus C3 da febre aftosa, que correlacionam com mudanças de antigenicidade detectáveis por anticorpos monoclonais (GEBAUER *et al.*, 1988). De acordo com estas observações, pode-se considerar que o gado bovino com infecções persistentes não só constitui um reservatório natural importante para o vírus como também é uma fonte potencial de novas variantes antigênicas capaz de produzir um novo surto agudo da doença (HEDGER, 1968; GEBAUER *et al.*, 1988). Um trabalho recente com o vírus tipo O da FA, foi mostrado que a estabilidade antigênica deste vírus coletada durante o estado carreador, sugere que a variação antigênica facilitada pela pressão da resposta imune do hospedeiro não é crítica para o estabelecimento ou manutenção de uma infecção persistente com o VFA (SALT *et al.*, 1996).

1.3.2 Distribuição geográfica e medidas de controle da febre aftosa

A febre aftosa representa uma enfermidade de ampla distribuição geográfica, sendo enzoótica em quase todos os continentes. Na Tabela 2 pode-se observar os sorotipos predominantes em diferentes lugares do mundo.

A distribuição geográfica da FA na América do Sul está vinculada com as formas de produção do rebanho. A existência de centros de consumo dentro e/ou fora do país influencia na regionalização da produção pecuária em geral, assim como no fluxo de movimentação dos animais até os centros de

Tabela 2: Distribuição geográfica dos tipos e subtipos do VFA

Sorotipos	Nº de subtipos	Distribuição dos sorotipos
A	31	África, Europa Ocidental e Oriental, Médio Oriente, Ásia e América do Sul
O	10	África, Europa Ocidental e Oriental, Médio Oriente, Ásia e América do Sul
C	5	África, Europa, Médio Oriente, Ásia e América do Sul
SAT 1	7	África e Médio Oriente
SAT 2	3	África
SAT 3	4	África
ASIA 1	3	Ásia e Médio Oriente

Referência: "Organización Panamericana de La Salud", 1996

comercialização, processamento e consumo (ORG. PAN. DE LA SALUD., 1996).

Em alguns países da América Central, nunca foi detectada a doença. Em outros, no entanto, tem-se controlado a doença graças a combinação de vacinas e medidas sanitárias apropriadas, incluindo o sacrifício dos animais doentes. Entretanto, esta última medida somente é possível quando se consegue reduzir a incidência a tal ponto que o sacrifício dos animais é economicamente viável (como exemplo, pode-se citar os Estados Unidos, Canadá e Chile) (ORG. PAN. DE LA SALUD., 1996).

Em países como o Brasil onde a doença é endêmica, o controle se realiza mediante a imunização preventiva de todo o gado e o acompanhamento epidemiológico de qualquer foco da enfermidade. Geralmente, existem focos de infecção em áreas de criação extensiva com alta porcentagem de animais portadores. Quando se produz uma ruptura da imunidade nestas zonas, os animais são mantidos em quarentena e se vacina sistematicamente todos os animais susceptíveis que circundam a área (ORG. PAN. DE LA SALUD., 1996).

1.4 O VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

1.4.1 Estrutura e composição dos vírions do VFA

A partícula viral consiste de um capsídeo vazio de 30 nm de diâmetro, que aloja no seu interior o genoma viral, constituído por uma cadeia simples de RNA de polaridade (+) (RUECKERT, 1996). Na Tabela 3, se resumem as características gerais do vírion e seus constituintes.

O capsídeo viral está formado por 60 cópias de cada uma das proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4 mais uma ou duas cópias de VP0, o precursor não clivado de VP2 e VP4 (RUECKERT, 1996; Figura 1). O vírion possui uma estrutura icosaédrica de simetria 5:3:2. Cada face do icosaedro está formado por cinco trímeros de VP1, VP2 e VP3 (TALBOT *et al.*, 1972, 1973). Tanto VP1, VP2 e VP3 se encontram parcialmente expostas na superfície viral, enquanto VP4, se localiza internamente em relação ao RNA viral e se encontra unido no seu extremo terminal com o ácido miristílico (BOOTHROYD *et al.*, 1982; CHOW, 1987).

A proteína VP1 tem sido foco de grande atenção em numerosos trabalhos, pelo fato de conter os determinantes antigênicos mais importantes da superfície viral (LAPORTE *et al.*, 1973; MELOEN *et al.*, 1986; BAXT *et al.*, 1989) e o sítio de reconhecimento do receptor celular (FOX *et al.*, 1989; ACHARYA *et al.*, 1989; LOGAN *et al.*, 1993).

ACHARYA *et al.* (1989), LEA *et al.* (1994) e CURRY *et al.*, 1996 determinaram a estrutura tridimensional do capsídeo do VFA tipo A, O e C, por difração de raios X do vírion cristalizado. A partir destes estudos se deduziram que VP1, VP2 e VP3, embora tenham seqüências diferentes, adotam uma configuração espacial similar, denominada "barril β ". Esta estrutura é determinada pelo pregueamento de 8 cadeias β , conectadas entre si por alças que sobressaem na superfície. As paredes do "barril" formam quatro cadeias β antiparalelas (CHEF na face posterior e GDIB na face anterior), estabilizadas por ligações de pontes de hidrogênio. O extremo COO- terminal se projeta sobre a superfície aproximando-se da alça GH (zona de 140-160), o que poderia explicar a relação antigênica observada entre estes dois sítios.

Tabela 3: Propriedades gerais do vírus da febre aftosa

Forma	esferoidal
Diâmetro (hidratado)	30 nm
Simetria (raios X)	5:3:2 (icosaédrica)
Nº de capsômeros	32
Densidade de flutuação	1,43 g/cm ³
Peso molecular do RNA	2,93 x 10 ⁶ Da
Peso molecular do vírion	9,43 x 10 ⁶ Da
% RNA	31,6
% Proteínas	68,4
PM das proteínas estruturais:	
VP1	23.267
VP2	24.669
VP3	24.323
VP4	8.480
Tipos sorológicos	7
Subtipos	67
Cepas imunogênicas	centenas

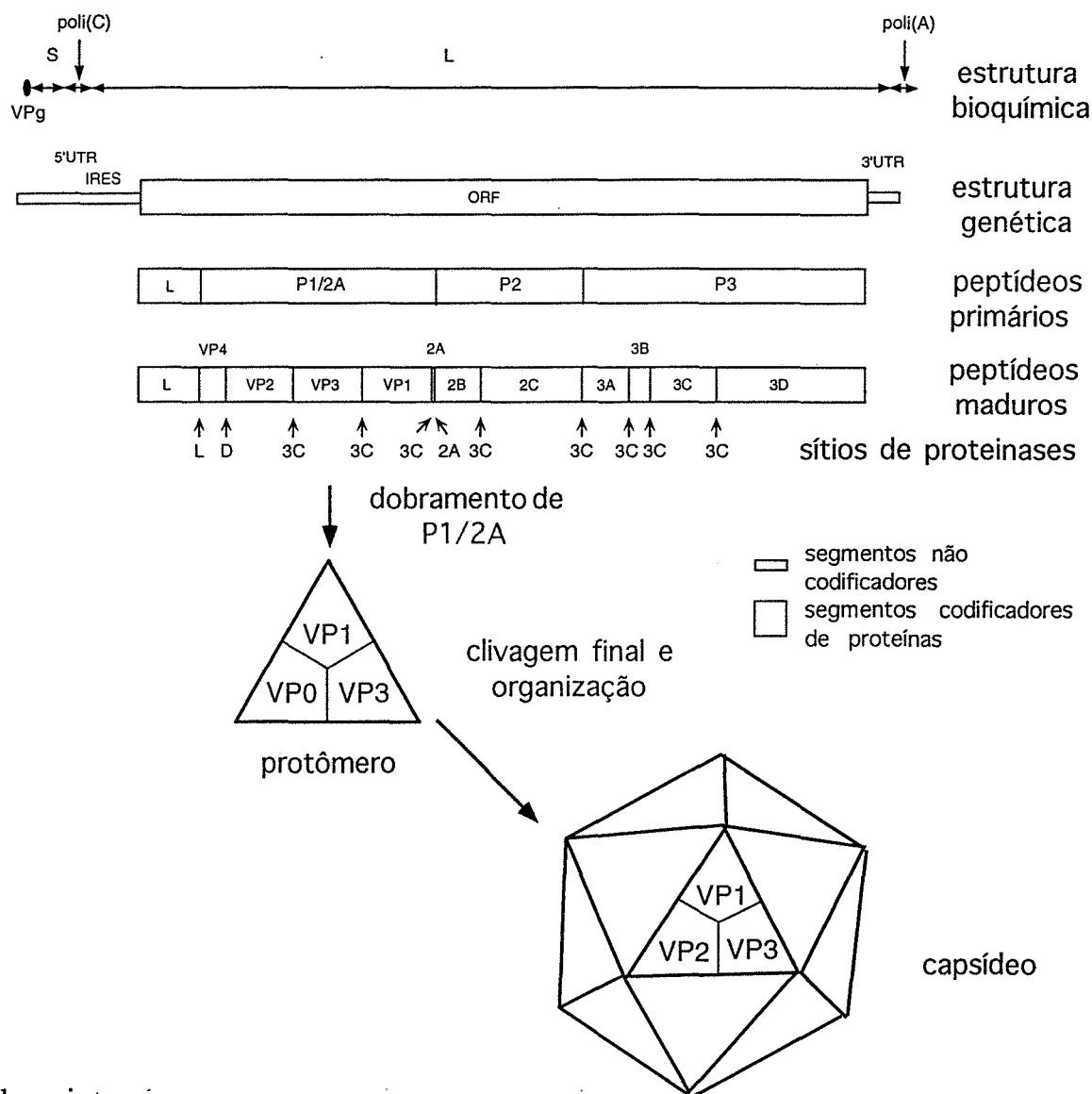
Uma diferença importante com respeito a outros membros da família, é que para o VFA, a seqüência de reconhecimento do receptor celular não se encontra em depressões profundas como descrito para os poliovírus e rinovírus (ROSSMAN *et al.*, 1985; HOGLE *et al.*, 1985; ROSSMAN, 1989). A alça GH é altamente desordenada e muito flexível. Isto determina que pode adotar um grande número de conformações distintas, protegendo deste modo uma pequena região constante que corresponde ao sítio de união ao receptor (ACHARYA *et al.*, 1989; PARRY *et al.*, 1990; LOGAN *et al.*, 1993).

1.4.2 Estrutura e organização do genoma do vírus da febre aftosa

O genoma do VFA é constituído por uma molécula de RNA monocatenário de $2,93 \times 10^6$ Da, que corresponde a 8.450 pb (RUECKERT, 1996). A extremidade 3' se encontra poliadenilada e a extremidade 5' apresenta uma pequena proteína ligada covalentemente denominada VPg (Figura 1).

Uma particularidade no genoma de aftovírus e de mengovírus, é que para cada 400 a 500 nucleotídeos da extremidade 5' não codificadora, existe um segmento de citidinas, poli(C) (Figura 1), cujo tamanho varia de 100-170 nucleotídeos (HARRIS & BROWN, 1976; ROWLANDS *et al.*, 1978). O RNA viral apresenta uma única fase de leitura aberta que codifica para uma poliproteína cuja massa molecular é de 258,9 kd. Existem dois códons de iniciação AUG na mesma fase de leitura, sendo que o primeiro deles é o nono ou o décimo códon após a extremidade 3' do poli(C), localizado a uns 1.200 nucleotídeos da extremidade 5' (CLARKE *et al.*, 1985; SANGAR *et al.*, 1987).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do VFA mostrando a maturação proteolítica e construção do capsídeo



Abreviaturas:

- Elementos bioquímicos: VPg, proteína ligada ao genoma; S, fragmento curto; poli (C), cauda longa de citidinas; L, fragmento longo; poli (A), cauda longa de ácido adenílico.
- Elementos genéticos: UTR, região não traduzível; IRES, sítio de ligação interna do ribossomo; ORF, rede de leitura aberta.
- Peptídeos primários: L, P1/2A, P2, P3.
- Peptídeos maduros: L, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3D.
- Sítios de proteínases: L, 3C, 2A, e desconhecido (D).

A região 5' não codificadora de proteínas tem sido muito estudada nos picornavírus sobretudo por sua importância atribuída ao término da virulência, atenuação e provavelmente a sua participação no início da síntese proteica viral. Em poliovírus foi observado que mudanças introduzidas na posição 472-480 do genoma, podem alterar a eficiência da tradução do RNA *in vitro* (SVITKIN *et al.*, 1985, 1988), como também modificar seu padrão de virulência *in vivo* (ALMOND, 1987). A mudança de uma só base (C por U) na posição 472 foi suficiente para aumentar a neurovirulência da cepa atenuada Sabin (poliovírus tipo 3) (EVANS *et al.*, 1985).

O poli(C) genômico apresenta um tamanho homogêneo dentro de um mesmo isolado viral, porém difere significativamente entre diferentes sorotipos, subtipos e inclusive entre diferentes cepas (BLACK *et al.*, 1979). Métodos bioquímicos clássicos tem identificado regiões longas de poli(C) como características distintas dos genomas dos cardiovírus e aftovírus (BROWN *et al.*, 1974). Para o vírus da febre aftosa, estudos tem sugerido que mudanças no tamanho da região poli C pode estar associado com mudanças na virulência, mas estes estudos têm sido incapazes de relacionar categoricamente o tamanho da região do poli(C) à alguma função biológica do vírus seja em cultura de tecido ou *in vivo*. HARRIS & BROWN (1977), estudando cepas virulentas e avirulentas de VFA SAT1 encontraram uma sensível diminuição do tamanho do poli(C) nas cepas atenuadas o que lhes sugeriram uma provável relação entre poli(C) e virulência. Outros estudos, no entanto, não suportaram esta idéia desde que não encontraram uma clara correlação entre o tamanho e uma função biológica determinada (COSTA GIOMI *et al.*, 1988; ESCARMIS *et al.*, 1992). Entretanto, um estudo prévio com o vírus A12 alterado geneticamente, contendo em seu genoma apenas 2 citidinas (C) na região do

poli(C), demonstrou que estes vírus foram virulentos em camundongos (RIEDER *et al.*, 1993), mas por outro lado, estes vírus tem mostrado uma reduzida virulência em bovinos (dados não publicados). Estudos em cardiovírus contendo a região de poli(C) curta, mostraram que eles foram avirulentos em muitos hospedeiros (PALMENBERG, 1994).

A proteína VPg se encontra ligada covalentemente ao extremo 5' da cadeia de RNA (GRUBMAN, 1980) (Figura 1). Esta ligação se estabelece pelo resíduo pUpUp do extremo 5' do RNA unido através de uma ponte fosfodiéster ao grupo hidroxila fenólico de um resíduo de tirosina de VPg (WIMMER, 1982). O genoma do VFA contém três genes de VPg em seqüência que codificam para três proteínas de 23 a 24 aminoácidos cada uma (FORSS *et al.*, 1984). Sugere-se que VPg tenha um papel importante na iniciação da síntese do RNA viral e possivelmente também no empacotamento do mesmo nos vírions (CRAWFORD & BALTIMORE, 1983).

A extremidade 3' poliadenilada apresenta um número variado de ácido adenílico por molécula (Figura 1). O sinal de poliadenilação (seqüência AAUAAA) presente na extremidade 3' da maioria dos RNA mensageiros eucariotas, está ausente no genoma do VFA. Isto sugere que o poli(A) se encontraria geneticamente determinado (YOGO & WIMMER, 1975). Esta hipótese foi confirmada ao comprovar que as cadeias de RNA (fita negativa) presentes nos intermediários replicativos apresentam segmentos de poli(U) na extremidade 5' de tamanho e heterogeneidade similar ao poli(A) (FELLNER, 1979). Embora a função do poli(A) não seja totalmente conhecida, foi visto que moléculas de RNA com segmentos curtos de poli(A) possuem menor infectividade específica (SARNOW, 1989).

Atualmente se conhece um considerável número de seqüências nucleotídicas para diferentes sorotipos do vírus da febre aftosa (CARROLL *et al.*, 1984; FORSS *et al.*, 1984; ROBERTSON *et al.*, 1985). Com o conhecimento da estrutura primária do genoma do VFA somado à caracterização bioquímica dos polipeptídeos produzidos pelo vírus, foi possível mapear as zonas que codificam para os distintos produtos genômicos como também definir as funções associadas aos mesmos.

1.4.3 Proteínas codificadas pelo genoma do VFA

De maneira similar a outros picornavírus, o RNA do VFA codifica uma grande cadeia polipeptídica que corresponde a uns 2300 aminoácidos, o que corresponde a maior parte da capacidade codificadora do genoma viral (JACKOBSON *et al.*, 1970; BLACK *et al.*, 1975; FORSS *et al.*, 1984). Esta cadeia denominada poliproteína, é processada através de uma série de clivagens proteolíticas produzindo as proteínas virais estruturais e não estruturais (VAKHARIA *et al.*, 1987) (Figura 1). Este processo se inicia sobre as cadeias nascentes, desde que a proteína íntegra não poderia ser isolada das células infectadas no sistema de tradução *in vitro* (GRUBMAN & BAXT, 1982; GRUBMAN *et al.*, 1984a). Uma análise detalhada dos eventos que conduzem a formação das proteínas virais maduras, foi estudada para vários picornavírus (VAKHARIA *et al.*, 1987; PARKS *et al.*, 1989; RYAN *et al.*, 1989). Destes estudos se deduziram uma série de diferenças no processamento da poliproteína do VFA com relação ao que ocorre nos outros membros da família.

O genoma do VFA é dividido em quatro regiões codificadoras unidas através de uma relação funcional e são designadas L, P1, P2 e P3 (RUECKERT & WIMMER, 1984) (Figura 1).

O início da tradução do RNA do VFA inicia a partir de um dos dois códon AUG na fase de leitura, aproximadamente a 1.100 bases da extremidade 5' do RNA, resultando na síntese de duas proteínas L, Lab e Lb. Diferem entre si em 28 aminoácidos na extremidade amino terminal (SANGAR *et al.*, 1987). A proteína Lb, a menor das duas proteínas, é sintetizada em grande quantidade nas células infectadas e no sistema livre de células em relação à Lab. Ambas as proteínas são clivadas autocataliticamente da poliproteína viral na junção L/P1 (STREBEL & BECK, 1986). Esta característica contrasta com o que foi visto para os cardiovírus, nos quais a clivagem é feita em trans por uma outra proteína viral denominada 3C (PARKS *et al.*, 1986). Uma segunda função proteásica foi demonstrada para a proteína líder (L) no VFA que consiste na clivagem do componente p220, uma subunidade do complexo proteico que liga o "cap", envolvido na iniciação da tradução no final 5' dos RNA mensageiros dos eucariotas (DEVANEY *et al.*, 1988). A clivagem deste componente resulta na paralização da síntese proteica da célula hospedeira, mas a tradução do RNA do VFA, a qual ocorre por um mecanismo independente do cap, não é afetada (ETCHISON *et al.*, 1982).

A região P1 codifica para as proteínas estruturais do vírion, 1A, 1B, 1C e 1D (VP1 - VP4), que constituem as subunidades do capsídeo ou protômeros (HARRIS *et al.*, 1981; GRUBMAN *et al.*, 1984a). A clivagem das junções 1B/1C, 1C/1D e 1D/2A é devido à atividade da protease 3C (Figura 1), atuando em trans. Diferentemente do que foi visto em poliovírus, onde se demonstrou que este processamento requer a presença adicional de 3CD

(JORE *et al.*, 1988). Os estudos de RYAN *et al.* (1989) mostraram que nos aftovírus a presença da polimerase viral 3D aumenta a eficiência da clivagem entre 1D/2A. A protease 3C é a responsável pela maioria das clivagens na poliproteína. Uma das exceções é a clivagem da proteína VP0 (1AB) durante a etapa de morfogênese viral dando como produtos VP2 (1B) e VP4 (1A) (ARNOLD *et al.*, 1987).

A região P2 codifica para uma proteína de 50 kd que é o precursor das proteínas virais não estruturais 2B e 2C de função biológica não totalmente conhecida. A proteína 2C mapeia o marcador genético de resistência à guanidina (SAUNDERS & KING, 1982), o que lhe designa uma função relacionada com a síntese de RNA *in vivo*. A proteína 2A, presente em poliovírus e cardiovírus demonstrou-se atividade de protease (NICKLIN *et al.*, 1987). Ao contrário, nos aftovírus, 2A é um peptídeo de pequeno tamanho (18 aminoácidos) localizado entre a junção de P1-P2 (Figura 1) e que não está relacionado com esta atividade (BELSHAM *et al.*, 1990).

A região P3 codifica para uma proteína de 96 kd cujo processamento dá origem às proteínas não estruturais requeridas para a replicação viral (CARROLL *et al.*, 1984; FORSS *et al.*, 1984; ROBERTSON *et al.*, 1985). O produto 3ABC é descrito nas primeiras etapas da replicação do VFA e se tem atribuído a ele um papel na inibição metabólica e /ou alteração da estrutura interna da célula hospedeira. Foi sugerido que 3ABC modifica a histona nuclear H3 com o consequente bloqueio da transcrição do DNA celular (GRIGERA & SAGEDAHL, 1986; TESAR & MARQUARDT, 1990). A protease 3C é a responsável pela maioria das clivagens na poliproteína (regiões P1, P2, P3 e entre P2-P3) (FORSS *et al.*, 1984; VAKHARIA *et al.*, 1987; CLARKE & SANGAR, 1988) (Figura 1). O produto 3B é VPg e o produto

3D corresponde à polimerase viral, sendo identificada como a enzima responsável pelo crescimento das cadeias de RNA (fita positiva) nascentes, originadas a partir da cópia do molde de RNA (fita negativa). Também foi demonstrado no sistema *in vitro* sua atividade como poliU-polimerase (POLATNICK & WOOL, 1981).

1.4.4 Ciclo de replicação do vírus da febre aftosa

O evento inicial no ciclo de replicação do VFA consiste da adsorção do vírus à receptores específicos localizados na membrana plasmática da célula hospedeira. Isto representa um processo reversível cuja etapa inicial é dirigida por forças eletrostáticas, sendo necessária a presença de cátions bivalentes (Ca^{2+} - Mg^{2+}) sem os quais o fenômeno não ocorre (BROWN *et al.*, 1962). O componente viral envolvido na ligação do VFA às células alvo tem sido alvo de investigações. Experimentos de competição feitos por BAXT & BACHRACH (1980) com os sorotipos O, A e C do VFA mostraram diferenças na ligação às células BHK. A identificação de uma seqüência conservada dos aminoácidos RGD em VP1 nos diferentes tipos do VFA levaram PFAFF *et al.* (1988) a proporem que esta seqüência, a qual se liga à integrinas presentes na superfície celular, era o receptor para o VFA. Esta seqüência tem um papel central na ligação à glicoproteínas adesivas que atuam como receptores de superfície celular (AKIYAMA & YAMADA, 1985; RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987; TAMKUN *et al.*, 1986; HYNES, 1992). A importância da seqüência RGD foi mostrada por estudos de inibição competitiva utilizando peptídeos sintéticos contendo a seqüência RGD (FOX *et*

al., 1989; BAXT & BECKER, 1990) e através de análises mutacionais (MASON *et al.*, 1994; LEIPPERT *et al.*, 1997). A molécula de superfície, $\alpha v/\beta 3$, a qual reconhece a seqüência RGD, tem sido identificada como receptor para o vírus da febre aftosa nas células em cultura (BERINSTEIN *et al.*, 1995). Isto foi sustentado recentemente por NEFF *et al.* (1998), onde através da utilização de diferentes linhagens de células expressando integrinas definidas, confirmaram a importância da integrina $\alpha v/\beta 3$ na infecção. O VFA pode também entrar nas células através de uma via não mediada por integrina, onde o vírus complexado a um anticorpo pode penetrar nas células que expressam o receptor Fc (BAXT *et al.*, 1995; MASON *et al.*, 1993). Além disso, o heparan sulfato (HS), identificado como co-receptor (JACKSON *et al.*, 1996), pode atuar como um receptor alternativo para algumas cepas do VFA adaptados em cultura de tecidos (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998).

Após a adsorção, o genoma viral entra no citoplasma através de um mecanismo de endocitose mediada pelo receptor. Demonstrou-se que o pH ácido das vesículas pré-lisossômicas (endossomas) proporciona o meio necessário para a liberação do vírus na forma de subunidade proteica 12S, deixando o RNA genômico livre para iniciar sua replicação (CARRILLO *et al.*, 1984, 1985; BAXT, 1987). O genoma liberado no citoplasma se une aos ribossomos e outras proteínas da maquinaria biossintética da célula hospedeira levando à síntese de uma poliproteína que é rapidamente processada (ARLINGHAUS & POLATNICK, 1969).

A replicação do RNA viral envolve a síntese de uma cadeia complementar de polaridade (-) que é utilizada para amplificar o número de cadeias de RNA (+). O alongamento das cadeias (negativa e positiva) se deve à

atividade da enzima viral RNA polimerase dependente de RNA (3D) (NEWMAN *et al.*, 1979; ROBERTSON *et al.*, 1983). O processo de tradução tem lugar mediante à formação de uma estrutura denominada intermediário replicativo (IR) composto por cadeias de RNA (+) e RNA (-) que se encontra associado ao retículo endoplasmático liso (PÉREZ BERCOFF, 1979).

Para a organização das proteínas estruturais é necessário o processamento proteolítico do precursor P1. Este processo resulta na formação das subunidades 5S compostas por um agregado de cada uma das proteínas VP0, VP1 e VP3 (protômeros imaduros) (PUTNAK & PHILLIPS, 1981; GRUBMAN, 1984b). As partículas 5S dispostas em pentâmeros constituem as partículas 12S, cuja organização resultam nos procapsídeos ou partículas vazias (GIACHETTI *et al.*, 1986). Originalmente, pensou-se que a entrada da molécula de RNA no procapsídeo resultava na formação do províron (140S), protegendo-se desta maneira o genoma viral da ação das nucleases (FERNÁNDEZ-TOMAS & BALTIMORE, 1973). Entretanto, recentes estudos parecem demonstrar que o capsídeo é formado ao redor do RNA (EGGER *et al.*, 1996).

Uma das etapas finais durante a maturação do vírus da febre aftosa é a clivagem da proteína VPO do províron entre Ala 85 e Asp 86 para produzir VP4 e VP2. O mecanismo de clivagem é desconhecido, mas acredita-se que a clivagem está envolvida na estabilização da partícula do vírus e na infecção primária das células. Para investigar o processo de clivagem e entender o papel da clivagem da maturação do vírion, tem-se produzido RNAs sintéticos do vírus da febre aftosa com mutações no sítio de clivagem (KNIPE *et al.*, 1997).

Finalmente se produz a liberação dos vírions infecciosos no meio, pela lise da célula infectada (RUECKERT, 1996).

1.4.5 Imunogenicidade e vacinas de hoje

A produção de anticorpos séricos, representa o mecanismo de defesa mais importante do animal susceptível frente à infecção pelo VFA. A resposta sorológica induzida após a infecção ou vacinação com o VFA, tem sido bem caracterizada no gado bovino (COWAN, 1973). Em animais de experimentação, tem-se comprovado que a transferência passiva de soro imune, é suficiente para prevenir a infecção viral (KNUDSEN *et al.*, 1983). Isto sugere que a neutralização por anticorpos, agregação e opsonização dos vírions seguida de sua fagocitose, são provavelmente os efeitos principais da imunidade contra os vírus (McCULLOUGH *et al.*, 1987).

Vários estudos tem enfatizado a importância das VPs sobre a imunogenicidade e antigenicidade do VFA. VP1 é a única das quatro proteínas estruturais do vírus para a qual se tem demonstrado indução de anticorpos neutralizantes (AcN) e protetores ao ser administrada na forma purificada em animais (LAPORTE *et al.*, 1973; BAXT *et al.*, 1984; PARRY *et al.*, 1985; MELOEN *et al.*, 1986). A imunogenicidade desta proteína tem sido localizada na sua metade carboxiterminal, tendo em vista que fragmentos peptídicos desta região, obtidos por diferentes métodos (clivagem com agentes químicos, peptídeos sintéticos) induzem também AcN (BITTLE *et al.*, 1982; PFAFF *et al.*, 1982; DI MARCHI *et al.*, 1986). Em particular, tem-se identificado um estreito segmento dentro da VP1, compreendido entre os

resíduos de aminoácidos 140-160, contendo os epítopos mais importantes na indução de AcN. Uma segunda região localizada na extremidade carboxiterminal (resíduos 200-213) tem sido também implicada neste processo, porém sua potencialidade imunogênica é menor (BITTLE *et al.*, 1982; PFAFF *et al.*, 1982; DOEL *et al.*, 1988). Investigações feitas com anticorpos monoclonais tem determinado a existência de outros epítopos sobre VP2 e VP3 (STAVE *et al.*, 1988; THOMAS *et al.*, 1988; BAXT *et al.*, 1989; KITSON *et al.*, 1990; CROWTHER *et al.*, 1993; XIE *et al.*, 1994).

O desenho de vacinas que asseguram um nível de proteção adequada apresenta sérias dificuldades, devido à grande diversidade antigênica apresentada pelo vírus. Assim, foi descrito para o vírus da febre aftosa a existência de 7 tipos sorológicos e mais de 60 subtipos (DELLA PORTA, 1983). As diferenças imunológicas entre eles são de tal magnitude, que a vacinação empregando vírus de um tipo não protege o animal da infecção por um vírus de um tipo diferente. Mais ainda, a imunidade conferida para uma cepa, não assegura necessariamente a proteção contra a infecção de outro vírus do mesmo subtipo.

As vacinas comerciais utilizadas para prevenir a febre aftosa são constituídas de vírus completos inativados e menos frequentemente, vírus atenuados. Ambos os tipos apresentam uma baixa estabilidade. Com as vacinas inativadas, existem problemas associados à inativação incompleta do vírion, que pode originar o escape dos laboratórios de produção, a baixa duração da imunidade e também o problema de reversão da virulência que algumas vezes pode acontecer (BARTELING & VREESWIJK, 1991).

1.4.6 Vacinas de polipeptídeos manipuladas geneticamente

Frente aos problemas mencionados acima, se iniciou a busca de outras tecnologias na produção de vacinas. Avanços na biotecnologia e síntese de peptídeos nos anos 80, levou à possibilidade de produção de vacinas de subunidades. Recentemente, estes avanços biotecnológicos permitiram a manipulação genética do VFA (ZIBERT *et al.*, 1990; RIEDER *et al.*, 1993), o que poderia permitir a produção de cepas vacinais atenuadas geneticamente.

Vacinas experimentais que reproduzem os antígenos relevantes de VP1 em diferentes sistemas recombinantes de expressão (KLEID *et al.*, 1981) ou por síntese química de peptídeos (BITTLE *et al.*, 1982; DOEL *et al.*, 1990; BROWN, 1992; BROWN, 1995) tem sido desenvolvidas. Os resultados das provas de imunidade tem revelado que tais vacinas, devem ser administradas em quantidades 100 a 1000 vezes maiores que a massa equivalente presente nos vírions completos, para produzir uma resposta similar. Estas observações tem mostrado a importância da configuração espacial dos epitopos para a indução de uma resposta imunológica adequada (BROWN, 1992). Vacinas que utilizam peptídeos sintéticos (para o sorotipo A) foram efetivas na proteção de bovinos e/ou suínos, presumivelmente na indução de anticorpos contra os epitopos contidos na proteína (DiMARCHI *et al.*, 1986; MORGAN & MOORE, 1990). Isto sugere que a indução de anticorpos dirigidos contra epitopos conformacionais pode ter um papel importante na imunidade frente a este sorotipo do VFA. Isto foi suportado por estudos com vírus quiméricos (RIEDER *et al.*, 1994a) e através de avaliação de soro de suínos (MATEU *et al.*, 1995). Recente trabalho demonstrou a falta de proteção sólida, quando um

grande número de bovinos, foram vacinados com peptídeos representando a sequência VP1 do VFA sorotipo C3 Arg 85 (TABOGA *et al.*, 1997).

A todos os inconvenientes previamente mencionados, se somam os problemas derivados da diversidade genética que apresenta o vírus na natureza. As mudanças de antigenicidade do vírus, são de importância na luta contra a doença, já que o grau de proteção da população vacinada depende entre outras coisas, da homologia existente entre a cepa vacinal e a de campo. A natureza *quasispecies* do genoma do VFA (MATEU *et al.*, 1989; DOMINGO *et al.*, 1992) permite a sua rápida adaptação a um novo ambiente, produzindo problemas adicionais na produção de vacinas. Especificamente, vacinas que tem como alvo epitopos limitados (p.e., peptídeos e proteína VP1 recombinante; ver acima), podem fracassar em condições de campo, podem estimular a variação antigênica e causar doença em animais vacinados. Este problema é consistente com o pobre desempenho observado para as vacinas de peptídeos (TABOGA *et al.*, 1997). Além disso, a adaptação de vírus de campo à cultura de tecidos para produzir vacinas, pode resultar em vacinas com propriedades antigênicas alteradas (BOLWELL *et al.*, 1989; RIEDER *et al.*, 1994b; SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997), as quais podem também fracassar em condições de campo. A proliferação de variantes de vírus com características biológicas alteradas tem sido descrita para muitos vírus RNA, particularmente para o vírus da imunodeficiência humana e para o VFA (DOMINGO *et al.*, 1993), mas muitas dessas observações tem sido baseadas nas características de vírus propagados em cultura de tecidos. MEYER *et al.* (1994) demonstraram que variantes do VFA presentes em uma população mista foram selecionadas por crescimento em diferentes sistemas de cultura de células ou em diferentes animais.

1.4.7 Manipulação do genoma viral para produção de vacinas

Com a introdução da tecnologia do DNA recombinante, tem sido desenvolvido uma nova geração de vacinas baseadas em vírus re(construídos). Esta nova vacina iria eliminar os riscos associados com o isolamento de grandes quantidades de vírus infecciosos e impedir a produção de vacinas inativadas inapropriadamente. Além disso, essas vacinas são esperadas ser mais estáveis do que as vacinas de peptídeos. Estas novas tecnologias permitem o conhecimento do (s) fragmento (s) genômico que são responsáveis pela patogenicidade. Eles podem ser transferidos, removidos ou modificados, e usados para construir vírus atenuados. Estes métodos tem sido adaptados para produzir cDNAs infecciosos do VFA sorotipo O (ZIBERT *et al.*, 1990) e do sorotipo A12 (RIEDER *et al.*, 1993), desde que o DNA complementar ao RNA vírus é infeccioso. O DNA correspondente ao gene de interesse é inserido no DNA complementar do VFA, o RNA sintético produzido também de caráter infeccioso, replica para produzir as partículas virais contendo o produto do gene de interesse (Figura 2A). Os organismos recombinantes obtidos dessa maneira tem o potencial para serem utilizados como vacinas vivas. Diferentes métodos para se construir os vírus atenuados da febre aftosa utilizando cDNAs infecciosos, tem sido descritos.

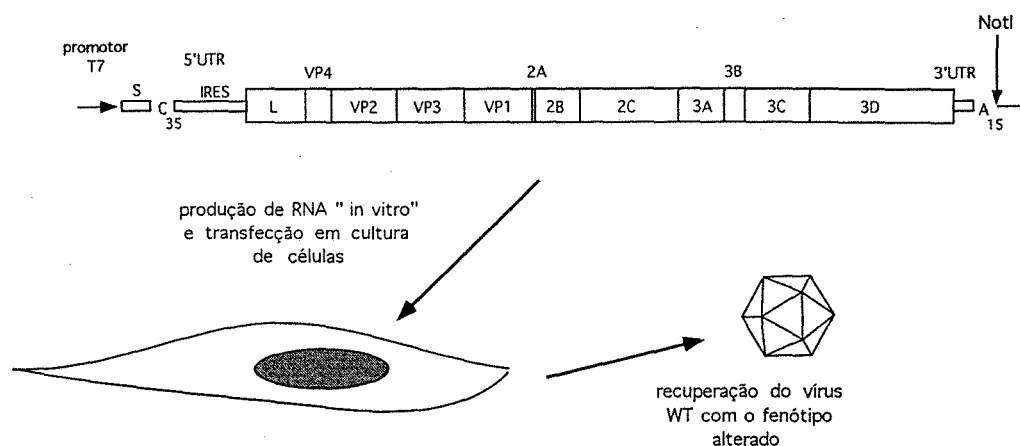
Estudos tem mostrado que uma seqüência altamente conservada dos aminoácidos RGD na proteína VP1 do capsídeo do vírus da febre aftosa é importante para a ligação do vírus às células em cultura (ver acima). Recentemente, tem-se demonstrado que é possível produzir o vírus sintético da

febre aftosa tipo A12 alterado geneticamente, no qual a seqüência codificadora destes três aminoácidos tem sido deletada, abolindo sua habilidade para ligar às células, produzindo uma partícula viral que não é infecciosa em cultura de células ou em animais (McKENNA *et al.*, 1995). Bovinos vacinados com estes vírus deletados no sítio de ligação ao receptor foram protegidos da doença quando desafiados com o vírus virulento, demonstrando que estes vírus deletados da seqüência codificadora dos aminoácidos RGD poderiam servir como base para assegurar as vacinas contra a febre aftosa (McKENNA *et al.*, 1995). Nestes experimentos, uma quantidade pequena de vírus não infecciosos foram armazenados a partir de células transfectadas com genomas de RNA sintético. Se estas partículas virais fossem adaptadas para o cultivo em escala comercial, poderia se criar um produto que fosse produzido e utilizado sem danos à segurança biológica.

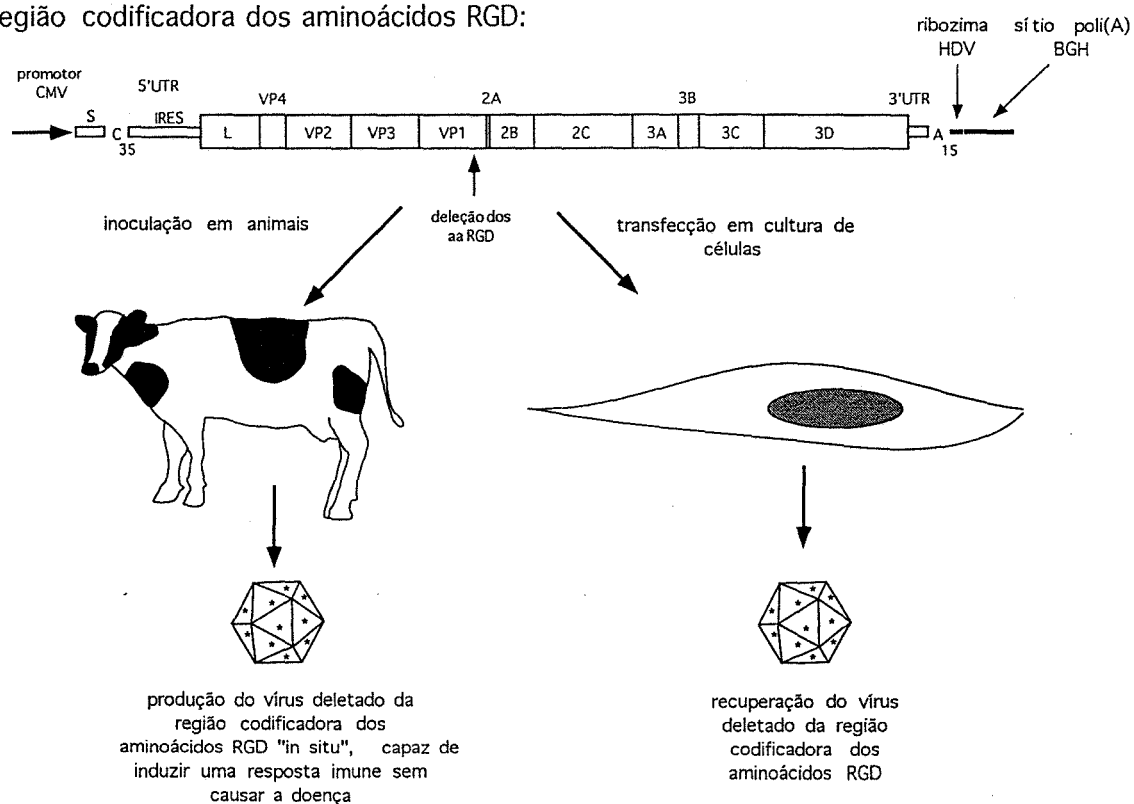
RIEDER *et al.* (1996) construíram um novo receptor para o tipo A12, o qual consistiu de uma cadeia simples de anticorpo (csAc) monoclonal específico do VFA tipo A12 (2PD11) que se liga ao vírus fusionada à molécula de adesão celular 1 (ICAM1; Figura 3). Células que normalmente não são susceptíveis à infecção ao VFA, tornaram-se susceptíveis após serem transfectadas com o DNA que codifica a csAc/proteína ICAM1. Os vírus A12 deletados dos aminoácidos RGD que não são infecciosos nos animais e outros tipos celulares cresceram bem e foram capazes de formar placas nas células expressando csAc/proteína ICAM1 (CHO11.1). No caso do VFA tipo A12, a linhagem de células CHO11.1 é crítica para o crescimento em larga escala do vírus deletado dos aminoácidos RGD. Este novo método poderia ser útil no estudo da entrada do vírus na célula e para o desenvolvimento de vacinas seguras contra patógenos virais animais e humanos.

Figura 2: Representação esquemática do pRMC35, clone infeccioso contendo o genoma completo (FLC) do VFA sorotipo A12 e da vacina de DNA, pWRMH-X

A. pRMC35 contendo o genoma completo do VFA sorotipo A12:



B. pWRMH-X, vacina de DNA contendo o genoma completo do VFA sorotipo A12 deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD:



Ver legenda da Figura 1.

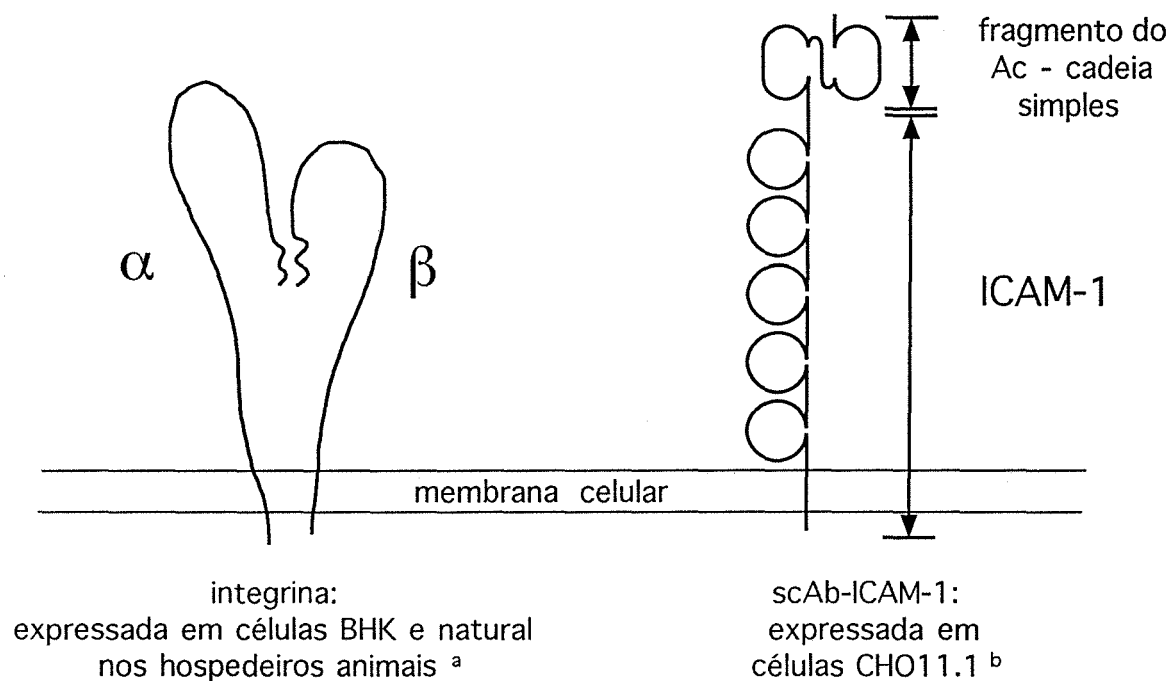
Análises do papel da proteinase líder (L) no ciclo de vida do vírus (ver acima), sugeriu que ela poderia funcionar como um fator de virulência. Portanto, genomas sintéticos virais do tipo A12, faltando o gene L, foram produzidos e a sua viabilidade testada nas células e em animais. O vírus A12 líder menos, o A12-LLV2, replicou mais vagarosamente em células BHK-21 do que o vírus selvagem (WT), foi menos eficiente no bloqueio da síntese proteica do hospedeiro, iniciou a sua síntese proteica tardiamente e demonstrou ser levemente atenuado em camundongos (PICCONE *et al.*, 1995). Em um estudo de patogênese do VFA em bovinos, após exposição por aerosol do A12-LLV2, houve uma infecção inicial dos bronquíolos respiratórios, uma pequena disseminação para os pulmões e nenhum vírus foi detectado em sítios secundários, ao contrário do que foi visto na infecção com o vírus tipo selvagem (WT) derivado do clone infeccioso FL (A12-IC) (BROWN *et al.*, 1996). Recentemente foi demonstrado que o A12-LLV2 pode ser seguramente administrado em bovinos, levando a uma indução da resposta protetora de anticorpos neutralizantes. Animais vacinados com o vírus atenuado não mostraram nenhum sinal clínico da doença e desenvolveram uma resposta de anticorpos neutralizantes quando comparados ao controle (MASON, *et al.*, 1997). Em recente trabalho, CHINSANGARAM *et al.* (1998) mostraram que suínos inoculados com o A12-LLV2 foram protegidos, embora uma limitada replicação do vírus atenuado foi insuficiente para induzir uma completa resposta imune protetora.

Recentemente, candidatos a vacinas de DNA para a febre aftosa foram construídos para produzir partículas do VFA, quando introduzidos em cultura de células ou em animais. Um candidato a vacina, o pWRMHX, que contém o cDNA do tamanho do genoma do vírus A12, deletado da região codificadora

Figura 3: Comparação do receptor natural e do receptor manipulado geneticamente do VFA sorotipo A12

ligação do vírus utilizando a seqüência RGD, na alça G-H em VP1 (o vírus deletado da seqüência RGD não irá crescer)

ligação do vírus utilizando o epitopo 2PD11 (pode suportar o crescimento do vírus deletado da seqüência RGD)



^a Ver Berinstein *et al.* (1995) & Neff *et al.* (1997).

^b Ver Rieder *et al.* (1996).

dos aminoácidos RGD, sob o controle do promotor primário do citomegalovírus (CMV), seguido pelo sítio de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BCH) (Figura 2B) foi construído. Suínos inoculados com este plasmídeo não mostraram sinais de doença, produziram anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre aftosa e foram parcialmente protegidos no desafio (WARD *et al.*, 1997). Este tipo de vacina permite a sua produção em larga escala, além de ser mais segura e mais estável do que a utilizada com o vírus inativado com BEI. Uma alta estabilidade é importante em países onde a febre aftosa não é endêmica, mas que necessitam manter bancos de vacinas para serem utilizados em casos de emergência. Este tipo de vacina pode também ser construída com genomas contendo atenuações em outros sítios (ver acima).

Até agora todos esses tipos de vacinas (RGD-, L- e DNA) que foram desenvolvidas contra o tipo A12, o protótipo do vírus A, não foram relevantes a nível de campo.

Baseado nos resultados com o vírus A12 e com o vírus O1 Campos (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997), nós propusemos produzir um cDNA infeccioso para o tipo A24 Cruzeiro utilizado como cepa vacinal pelo "Centro Panamericano de Fiebre Aftosa" (C.P.F.A; RJ-Brasil). Além disso, nós propusemos produzir vírus atenuados que possam ser utilizados como vacinas vivas e testar os vírus atenuados produzidos em hospedeiros susceptíveis.

MÉTODOS

2.1 CULTIVO CELULAR

2.1.1 Crescimento de células BHK clone 21

Células BHK (BHK-21 clone 13; ATCC # CCL10) foram crescidas como descrito por RIEDER *et al.* (1993). Especificamente, as células foram crescidas em meio nutriente BHK contendo meio basal de Eagle (BME) (LIFE TECHNOLOGIES), 1 x L-glutamina (LIFE TECHNOLOGIES), 1 x antibiótico (penicilina + streptomicina)/antimicótico (fungizona) (LIFE TECHNOLOGIES), 10 % soro de ternreiro (CS) (HYCLONE) e 10 % de caldo de triptose fosfato (DIFCO). O crescimento foi feito em garrafas plásticas estéreis de 850 cm² (DAIGGER) em um incubador giratório a 37 °C (BELLCO). Em seguida, as células foram tripsinizadas decantando o meio em um béquer estéril e lavando a camada de células 2 vezes com 25 ml de uma solução salina-fosfato tamponada (PBS) (LIFE TECHNOLOGIES). Após decantar a solução de PBS, foram adicionados 8 ml de tripsina 0,05 %/ ácido etileno diamino tetra acídico (EDTA) 0,53 mM (LIFE TECHNOLOGIES), as garrafas foram colocadas em um incubador giratório a 37 °C por 10 min., para o desprendimento das células das paredes das garrafas. Foram adicionados 15 ml de meio nutriente BHK e as células ainda aderidas foram removidas por ação de pipetagem. Em seguida as células foram transferidas para um tubo Falcon de 50 ml (CORNING) e ressuspendidas uniformemente passando-as através de uma cânula (PEELVUE) e uma seringa de 35 ml (MONOJECT) por 10 vezes. A concentração de células da suspensão foi determinada em câmara de Neubauer (SPENCER) ao microscópio óptico (NIKON TMS). A quantidade de células necessárias para produzir uma monocamada de células que se tornasse confluenta ou subconfluenta de acordo

com o objetivo do experimento foi calculada e as garrafas ou placas (CORNING) incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO₂) (incubador FORMA SCIENTIFIC). Em alguns casos, suspensões de células preparadas com este protocolo, foram mantidas a 4 °C até uma semana e utilizadas em experimentos posteriores. Ao mesmo tempo, aproximadamente 150 ml de meio nutriente BHK e uma quantidade de células (geralmente uma diluição de 1:10 a 1:40) foram colocados em uma garrafa plástica estéril. Para produzir uma atmosfera de 5 % CO₂ na garrafa, o gás foi introduzido de um cilindro com ar a 5 % CO₂ através de uma conexão, tendo em sua extremidade uma pipeta estéril. As garrafas com esta atmosfera foram incubadas em um incubador giratório a 37 °C até as células ficarem confluentes (48 a 72 h.) e em seguida foram mantidas à temperatura ambiente.

2.1.2 Crescimento de células CHO11.1

Células CHO11.1 foram cultivadas de uma maneira similar às células BHK, exceto que o seu cultivo foi feito em frascos T-25, T-75 ou T-162 (CORNING) e o meio nutriente consistiu de BME + antibiótico/antimicótico + glutamina contendo 10 % de soro fetal de terneiro e 60 mg/ml de G418 (LIFE TECHNOLOGIES) (RIEDER *et al.*, 1996).

2.1.3 Crescimento de células LK

Células de córtex de rim de ovelha ("lamb kidney"-LK) foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por HOUSE & HOUSE

(1989) e crescidas em meio de células CHO.

2.2 CRESCIMENTO DO VÍRUS, DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS E IMUNOPEROXIDAÇÃO

2.2.1 Crescimento do vírus

Células BHK ou CHO11 foram inoculadas, em concentrações apropriadas, em garrafas, placas de 6 poços ou frascos como T-25, T-75 ou T-162, crescidas em um incubador giratório a 37 °C ou em um incubador com uma atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C até à subconfluência por 24 a 48 h. Em seguida, o meio nutriente foi retirado deixando-se apenas a monocamada de células. Na placa de 6 poços, a inoculação foi feita utilizando-se 200 µl de suspensão de vírus. Após incubação por 1 hora a 37 °C em atmosfera de CO₂ com agitação a cada 10 min., foram adicionados em cada poço 2 ml de uma solução VGM (BME + antibiótico/antimicótico + glutamina) contendo 0,5 % de CS. As placas foram colocadas novamente em atmosfera de CO₂ a 37 °C e o efeito citopático observado em 24 h, 48 h e algumas vezes a 72 h. Para permitir replicação adicional do vírus o procedimento acima foi repetido com nova monocamada de células e 200 µl do vírus proveniente da 1ª passagem. Em alguns casos este procedimento foi repetido até atingir a 4ª passagem. A infecção dos outros frascos foi feita por um procedimento análogo ao descrito acima com quantidades de vírus apropriadas.

2.2.2 Ensaios de unidades formadoras de placas

Placas de 6 ou 24 poços contendo a monocamada confluenta de células BHK, LK ou CHO11.1 foram preparadas como descritas previamente (ver ítem 2.1) e os ensaios de unidades formadoras de placas foram realizadas pela modificação de um método descrito por RIEDER *et al.* (1993). Diluições seriadas 10^n do vírus foram feitas em VGM contendo 0,5 % CS. Em cada poço contendo a monocamada de células foram adicionados em duplicata 200 μ l de cada uma das suspensões de vírus. As placas inoculadas foram incubadas em uma atmosfera de 5 % de CO₂, a 37°C por 60 min., com agitação a cada 10 min. Após a incubação, foram adicionados 2 ml de meio de cobertura "tragacanth" contendo 0,6 % de goma de "tragacanth" (FISHER SCIENTIFIC) em VGM contendo 10 % de caldo de triptose fosfato e 1 % CS. As placas foram adicionalmente incubadas a 37°C por 48 h. a 72 h. Terminada a incubação as placas foram visualizadas ou pela coloração por imunoperoxidação (ver ítem 2.2.3) ou através da mistura em cada poço da placa de 2 ml de uma mistura de fixador histológico (AMRESCO) 2 x contendo cristal violeta a 3 g/l (FISHER SCIENTIFIC). As placas foram deixadas por pelo menos 15 min. à temperatura ambiente, o líquido retirado por decantação e os poços lavados com água corrente. As placas foram secas à temperatura ambiente, o número de placas de vírus contados e os resultados expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml).

2.2.3 Ensaio de imunoperoxidase

Células BHK ou CHO11.1 após serem infectadas ou transfectadas, foram lavadas 2 vezes com uma solução PBS e fixadas com 1 ml de uma mistura acetona (SIGMA):metanol (FISHER SCIENTIFIC) (50:50) por no mínimo 20 min. a -20 °C. A mistura acetona:metanol foi retirada, a placa foi seca à temperatura ambiente e as células foram hidratadas com 1 ml de tampão de incubação (TI; BME com 0,1 % de soro albumina bovina (BSA-LIFE TECHNOLOGIES), 25 mM HEPES (LIFE TECHNOLOGIES) e soro normal de cavalo (NHS) a 1 %) (VECTOR LABORATORIES) por 10 min. A solução TI foi retirada, o primeiro anticorpo (fluido de cultura de hibridoma) diluído a 1:5 na solução TI foi adicionado e em seguida incubado por 30 min. à temperatura ambiente com agitação a cada 5 min. O primeiro anticorpo foi removido e em seguida foram feitas 3 lavagens com 2 ml de solução TI sem o NHS. O 2º anticorpo marcado com biotina (VECTASTAIN anti-IgG de camundongo) diluído a 1:400 em solução TI a 1 % foi adicionado e incubado por 30 min. à temperatura ambiente com agitação a cada 5 min. Uma solução contendo os complexos peroxidase-"streptavidin" foi preparada pela mistura de 5 ml de solução de PBS contendo BSA a 0,1 % com 80 µl do reagente A ("Vector ABC" - VECTOR LABORATORIES) e 80 µl do reagente B ("Vector ABC" - VECTOR LABORATORIES), e incubada por 30 min. à temperatura ambiente. O 2º anticorpo foi removido e foram feitas 3 lavagens com 2 ml da solução de PBS. Cinco ml da solução de PBS foram adicionados na solução contendo a mistura A + B preparada anteriormente, 0,5 a 1 ml desta solução foram transferidos para cada poço da placa, a qual foi incubada por 30 min. à temperatura ambiente, com agitação a cada 5 min. Cada poço

da placa foi lavado por 2 vezes com solução de PBS e a cada poço foi adicionado aproximadamente 0,5 ml da mistura de substrato para a peroxidase ("VIP"-VECTOR LABORATORIES). A formação de cor foi examinada durante 5 a 15 min., o substrato removido, a reação paralizada com adição de H₂O e as células observadas ao microscópio óptico.

2.3 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

2.3.1 Caracterização antigênica de isolados virais

A imunoreatividade dos vírus foi testada contra um soro policlonal e anticorpos monoclonais (AcM), utilizando um protocolo similar ao utilizado por SÁ-CARVALHO *et al.* (1997).

Células BHK foram infectadas com estoque de vírus da maneira descrita no item 2.2.1 ou transfectadas com RNA como descrito no item 2.7. Após a incubação das células, elas foram lavadas por 2 vezes com meio de crescimento contendo 5 % da concentração normal de metionina. Seguindo as lavagens, 1 ml meio de crescimento contendo 5 % da concentração normal de metionina e aproximadamente 50-100 μ Ci de ³⁵S-Metionina (AMERSHAM) foram adicionados e as células incubadas em uma atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C. Após aproximadamente 16 horas, as culturas foram congeladas, descongeladas e centrifugadas a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o volume determinado. Foram adicionados 1/20 volume de uma solução de 10 % sódio sarcosil (p/v) (SIGMA) em uma solução tampão TNE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e EDTA 1 mM) e 1/100 volume de uma solução de EDTA 0,5 M (SIGMA). Uma centrifugação foi feita

novamente a 12.000 g por 5 min. à temperatura ambiente.

O gradiente de sacarose foi preparado pela adição de 5,7 ml de uma solução de 10 % sacarose (SIGMA) e 5,6 ml de uma solução de 50 % sacarose em 2 câmaras de um aparelho gerador de gradiente de sacarose. As frações misturadas foram coletadas por gravidade em um tubo BECKMAN #344059 de 14 x 89 mm e um gradiente contínuo de 10 a 50 % foi produzido.

Cada amostra tratada com sarcosil/EDTA foi colocada no gradiente e centrifugada a 40.000 g, durante 17 horas a 4 °C em uma ultracentrífuga (BECKMAN LB-70). As amostras foram coletadas do fundo de cada gradiente utilizando uma bomba peristáltica (RAINEN) em intervalos regulares de tempo (15 segundos) e 25 µl de cada amostra foram transferidos para um tubo contendo 2 ml de líquido de cintilação (PACKARD) e cintilações por minuto (cpm) foram contadas no cintilador líquido (BECKMAN). Os dados de cpm foram colocados em um gráfico e as frações que continham o pico que migrou a aproximadamente 140 S foram agrupadas. Amostras do vírus purificado que continham 1.500 a 5.000 cpm foram misturadas com 25 µl de cada anticorpo, fluido de cultura de hibridoma (ou 2,5 µl de soro bovino anti-VFA) em uma mistura contendo uma solução de 0,5 % Triton x-100 (SIGMA), 0,5 % de desoxicolato de sódio (NaDOC-SIGMA) e 0,05 % de dodecil sulfato de sódio (SDS-BIORAD) tamponada com TNE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e EDTA 5 mM) e incubados por 1 a 2 horas a 4 °C.

Uma quantidade necessária da solução contendo 10 % *S. aureus* (CALBIOCHEM) foi preparada por centrifugação a 13.800 g por 16 segundos em uma microcentrífuga (EPPENDORF 5415 c), ressuspensa em 1 ml de uma solução TNE contendo 0,1 % de Triton x-100 (TNET), misturada no "Vortex Genie" (BAXTER) e incubada por 5 min. à temperatura ambiente. A

lavagem foi repetida por 2 vezes mais e o precipitado ressuspendido em 1,0 volume de TNET (suspensão 8 %).

Cem µl da suspensão 8 % de *S. aureus* foram adicionados a cada mistura contendo anticorpo e em seguida incubados por 1 a 2 horas a 4 °C com agitação ("Multi-purpose rotator"-SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.). As amostras foram centrifugadas por 17 segundos, o sobrenadante descartado com uma ponteira de 200 µl conectada a vácuo e 1 ml de uma solução de TNET foi adicionado. O precipitado/TNET foi misturado, centrifugado novamente por 17 segundos, o sobrenadante removido novamente e o precipitado foi lavado 2 vezes mais com a solução de TNET. Trinta µl de uma solução de Tris-HCl 50 mM pH 6,8 contendo 0,5 % SDS foram adicionados e aquecidos por 5 min a 98 a 100 °C (THERMOLYNE 16500). Após uma centrifugação por 30 seg., todo o sobrenadante foi adicionado em 2 ml de líquido de cintilação e em seguida levado ao cintilador líquido onde cpm foram contadas.

2.3.2 Detecção de anticorpos anti-virais por ensaio de redução de placas (NEUT)

Anticorpos anti-virais foram determinados por ensaio de redução de placas como descrito por RIEDER *et al.* (1994a). Especificamente, a solução de vírus foi preparada em VGM contendo 0,5 % CS e HEPES 25 mM pH 7,5 (LIFE TECHNOLOGIES) utilizando 300 a 500 ufp/ml. Diluições seriadas de soro previamente inativado em VGM contendo 0,5 % CS e HEPES 25 mM pH 7,5 foram feitas. Um volume de 0,3 ml destas diluições foi misturado a 0,3 ml do vírus e em seguida incubados por 60 min. à temperatura ambiente.

Placas de 6 poços contendo a monocamada confluyente de células BHK foram preparadas previamente (ver ítem 2.1.1). O meio nutriente da monocamada de células foi aspirado e 200 µl da mistura vírus/soro foram adicionados em duplicata em cada poço da placa. A placa foi colocada em atmosfera de 5 % de CO₂, por 60 min. a 37 °C, com agitação a cada 10 min., e em seguida o inóculo foi aspirado. Para permitir a formação das placas virais, 2 ml de meio de cobertura "tragacanth" foram adicionados, as placas incubadas por 48 h., e em seguida coradas com cristal de violeta da maneira descrita no ítem 2.2.2. As placas de vírus foram contadas e o cálculo do título de neutralização (PRN) foi feito baseado na redução de 50 ou 70 % do número de placas formadas no poço contendo apenas o vírus (poço controle).

2.3.3 Detecção de anticorpos anti-virais por radioimunoprecipitação (RIP)

Células BHK foram transfectadas com RNA, marcadas radioativamente como descrito no ítem 2.3.1.e incubadas durante a noite a 37 °C. Fluido extracelular (SN) foi separado dos debris celulares por centrifugação a 10.000 g por 10 min. Os debris celulares e as células que permaneceram em cada poço da placa foram lisados em uma solução de TNE contendo 1 % Triton x-100, centrifugados a 12.000 g por 20 min. e em seguida, o sobrenadante (CL) foi coletado. Duzentos µl do conteúdo do SN e CL foram transferidos para um novo tubo eppendorf (LIDA) contendo uma mistura de solução de 0,5 % Triton x-100, 0,5 % NaDOC e 0,05 % SDS tamponada com TNE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e EDTA 5 mM), 2 µl de soro teste e incubados por 1 a 2 horas a 4 °C. Cem µl de uma solução fixadora de *S. aureus* foram

adicionados à mistura antígeno (Ag)/anticorpo (Ac) para permitir a coleta do complexo Ag/Ac de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.1, exceto que na etapa final, o precipitado foi ressuspendido em 14 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 2 % SDS, 0,1 % de azul de bromofenol e 10 % glicerol) e DTT 100 mM. A mistura acima foi agitada, aquecida a 98 a 100 °C por 5 min. e centrifugada a 13.800 g por 5 min.

Um mini-gel de 12 % SDS-proteína foi preparado e em seguida aproximadamente 15 a 20 µl de cada amostra foi aplicada. As amostras foram fracionadas por eletroforese por 1,2 a 1,5 h. a 125 V. O gel foi transferido para um papel especial ("Gel blot paper"-SCHLEICHER & SCHUELL), coberto com plástico e seco por 30 a 40 min. a 80°C. O plástico foi retirado e o papel contendo as amostras radioativas foi exposto ao filme de raio X (KODAK) por 24 a 72 h. O filme foi revelado e as proteínas virais presentes foram analisadas.

2.3.4 Detecção de anticorpos anti-virais por ELISA

O antígeno utilizado neste ensaio consistiu de uma proteína recombinante 3ABCΔ, expressa por baculovírus em células de insetos, *Spodoptera frugiperda*. e a detecção de anticorpos anti-virais por ELISA foi realizada utilizando o protocolo desenvolvido para a proteína recombinante 2C (MEYER *et al.*, 1997).

O antígeno baculovírus foi preparado a partir de células infectadas com a porção recombinante 3ABC do genoma tipo A12. Para facilitar a expressão da proteína pelo baculovírus, o sítio ativo de 3C foi mutado. O lisado de células de insetos contendo ou não a proteína recombinante 3ABC, foi

preparado pela adição de tampão de lise (NaCl 130 mM, Tris-pH 7,5 10 mM, 1 % de Triton X-100, fluoreto de sódio 10 mM, fosfato de sódio pH 7,5 10 mM, pirofastato de sódio pH 7,5 10 mM) para uma concentração final igual a 4×10^6 células/ml.

Em cada poço de uma placa de ELISA (IMUNOLON[®] 2 DYNATECH) foram adsorvidos 100 µl de uma solução preparada pela mistura de um volume de lisado de células de inseto infectadas com baculovírus e 9 volumes de uréia 8 M e em seguida, a placa foi mantida a 4 °C. O soro controle positivo utilizado consistiu de um soro de suíno infectado com o VFA, sorotipo A24 coletado a 42 dias pós-infecção e o controle negativo utilizado consistiu de soro de suínos não infectados. O anticorpo primário foi preparado pela adição de 1 µl de cada soro teste a um tubo contendo 900 µl de solução salina-fosfato tamponada contendo 0,05 % de tween-20 (PBST) e 100 µl de lisado de células de inseto, incubado por 30 min. à temperatura ambiente e misturado por inversão. O anticorpo 2º, anticorpo de cabra marcado com peroxidase (anti-IgG suína-KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES) foi diluído a 1:500 em PBST e 1 % de lisado de células de inseto, incubado por 30 min. à temperatura ambiente e misturado por inversão.

Os poços da placa adsorvidos com o antígeno foram lavados por 6 vezes com PBST. Cem µl do anticorpo preparado como descrito acima foram adicionados, incubados por 30 min. sob microagitação ("Mini Shaker"-DYNATECH) e em seguida, as placas foram lavadas novamente por 6 vezes com PBST. Cem µl do anticorpo 2º foram adicionados e incubados por 1 hora à temperatura ambiente sob microagitação. Em seguida, 100 µl da mistura de substrato contendo tampão citrato fosfato 75 mM, tetrametilbenzidina 0,1 mg/ml (TMB-SIGMA) e 0,01 % de peróxido de hidrogênio (SIGMA) foram adicionados. A reação foi incubada por 3 a 4

min. à temperatura ambiente e paralizada com 100 µl de uma solução de ácido sulfúrico 1 M. A placa foi transferida para um leitor de ELISA (DYNATECH LABORATORIES INC. #MR 700) e as reações foram lidas a 450 nm. Os dados coletados foram analisados utilizando o programa "Lotus 1.2.3 Version 2.4" (LOTUS, INC.), através do cálculo das médias aritméticas dos resultados obtidos com as 8 repetições de cada amostra, subtraídas previamente do valor do controle negativo correspondente a cada repetição. Para cada animal, as leituras de OD450 dos ensaios de ELISA, foram expressadas em % do controle positivo. A variação entre os controles foram mínimas, com uma faixa de valores de 0,950 a 1,121.

2.4 ISOLAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO/TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR

2.4.1 Isolamento de RNA

O RNA foi isolado de amostras utilizando o método TRIzol LS (LIFE TECHNOLOGIES).

Para cada amostra, 0,25 ml de fluido de cultura de células infectadas foram adicionados (em caso contrário, será indicado), 0,75 ml de reagente de TRIzol LS. As amostras foram incubadas por 5 min. à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Um volume de 0,2 ml de clorofórmio (SIGMA) foi adicionado às amostras, as quais foram agitadas vigorosamente com as mãos durante 15 segundos e incubadas à temperatura ambiente for 2 a 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min. a 4 °C e a fase aquosa contendo o

RNA foi transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 0,5 ml de álcool isopropílico (FISHER SCIENTIFIC), as amostras incubadas à temperatura ambiente por 10 min. e centrifugadas a 12.000 g por 10 min. a 4 °C. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70 %, agitado, centrifugado a 7.500 g por 5 min. a 4 °C e o sobrenadante removido novamente. O precipitado de RNA foi seco por um curto período de tempo e ressuspenso em água livre de RNase ou em 25 µl de ditioneitol (DTT) 10 mM (LIFE TECHNOLOGIES) contendo 5 % (vol/vol) de 1-2 unidades (U) de RNase (LIFE TECHNOLOGIES). O RNA foi dissolvido durante incubação a 68 °C por 2 a 30 min e em seguida resfriado no gelo.

2.4.2 Preparação de cDNA

cDNAs de tamanho curto foram preparados pela modificação do método descrito por RIEDER *et al.*, 1993. Um volume de 2,5 µl de RNA foi adicionado em um tubo contendo 1 µl de uma solução de hidróxido de metil mercúrio (MMOH-SIGMA) 40 mM, 0,5 µl de uma solução de "random" hexâmeros 2 a 8 µg/µl (PHARMACIA) e a reação incubada por 10 min. à temperatura ambiente. Uma mistura contendo 5 µl de uma solução de dNTPs 2 mM (PHARMACIA) , 4 µl de uma solução tampão 5 x RT (LIFE TECHNOLOGIES), 2 µl de DTT 0,1 M (LIFE TECHNOLOGIES), 1 µl de MMLV RT (LIFE TECHNOLOGIES) em um volume final de 16 µl, foi adicionada no tubo contendo o RNA. A reação foi incubada por 1 hora em um banho-maria a 37 °C (HAAKE D1), aquecida por 5 min. a 98 a 100 °C e resfriada imediatamente a 4 °C.

cDNAs longos foram preparados pelo método descrito por TELLIER *et*

al. (1996). Cinco μl de RNA ressuspenso em RNasina/DTT foram aquecidos por 5 min. a 68 °C, resfriados no gelo e em seguida, adicionados a uma uma solução contendo 1 μl de dNTPs 10 mM, 2,5 μl de oligo antisenso 10 mM (LIFE TECHNOLOGIES), 1 μl (200 U) da enzima SuperScript II RT (LIFE TECHNOLOGIES) e 4 μl de tampão 5 x RT. A mistura foi incubada por 60 min. em banho-maria a 42 °C (HAAKE W13). Em seguida, 1 μl de RNase H (LIFE TECHNOLOGIES) e 1 μl de RNase T1 (LIFE TECHNOLOGIES) foram adicionados e a mistura incubada por 20 min. a 37 °C.

2.4.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

PCR foi utilizado para amplificar fragmentos curtos de DNAs plasmidiais linearizados por endonucleases de restrição ou cDNAs hexaméricos utilizando o método descrito por RIEDER *et al.* (1993).

Cinco μl de cada cDNA-hexâmero ou 0,1 a 2 μg de DNA plasmidial foram misturados com 45 μl da mistura contendo 5 μl de tampão 10 x PCR (PERKIN ELMER), 3,75 μl de uma solução de dNTPs 2 mM, 0,5 pmoles de oligo senso (LIFE TECHNOLOGIES), 0,5 pmoles de oligo antisenso (LIFE TECHNOLOGIES), 0,25 μl de Amplitaq polimerase (PERKIN ELMER) em um volume final de 50 μl . A mistura foi colocada na máquina de PCR (PERKIN ELMER 2400) a 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 30 segundos a 60 °C e extensão por 1 min. a 72 °C.

A técnica de PCR utilizada para amplificar fragmentos longos de DNAs plasmidiais, linearizados por endonucleases de restrição ou cDNAs SuperScript foi feita utilizando o método descrito por TELLIER *et al.* (1996).

DNA plasmidial ou 1 μ l de cDNA SuperScript foram adicionados a uma mistura contendo 2,5 μ l de tampão 10 x específico para PCR (LIFE TECHNOLOGIES), 20 pmoles de oligo antisense (LIFE TECHNOLOGIES), 20 pmoles de oligo senso (LIFE TECHNOLOGIES), 2,5 μ l de uma solução de dNTPs 2 mM, 0,5 μ l de enzima Advantage (CLONTECH) em um volume final de 25 μ l. A reação foi colocada na máquina de PCR por 1 min./94 °C, por 30 ciclos de 30 segundos/94 °C e 8 min./68 °C, por 90 min./68 °C e 90 min./15 °C.

2.5 CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA VIRAL

2.5.1 Recuperação em gel de agarose dos fragmentos amplificados por PCR

Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose (FMC Bioproducts) 0,6 a 2,0 % em uma solução tampão Tris-Acetato 0,04 M contendo EDTA 0,001 M (TAE). Após a realização da eletroforese em uma voltagem apropriada por 1 a 3 horas em tampão TAE, o gel foi corado em 2,5 μ g/ml de solução de brometo de etídio (SIGMA). A porção do gel contendo o fragmento de DNA de tamanho esperado foi recortado e transferido para um tubo eppendorf. Cem μ l de uma solução STE (NaCl 0,1 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) foram adicionados à banda purificada, a qual foi incubada por 3 min. a -40 °C (Bio-Cool-FTS SYSTEMS, INC) e em seguida transferida para o banho-seco a 68 °C. Este procedimento de resfriamento/aquecimento foi repetido por mais 3 vezes, o conteúdo transferido para um tubo estéril dotado de um filtro (LIDA)

acoplado a um tubo eppendorf e centrifugado a 13.800 g por 1 min. Um μl de glicogênio de ostra 10 mg/ml (SIGMA) e 200 μl de Sec-butanol (SIGMA) foram adicionados ao filtrado que foi agitado e centrifugado a 13.800 g por 2 minutos. A fase superior contendo o sec-butanol/água/brometo de etídio foi desprezada, um volume de 2,5 vezes de etanol foi adicionado e o tubo incubado por 10 min. em um banho a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14.926 g por 15 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BIOFUGE 13-BAXTER), o precipitado lavado com aproximadamente 1 ml de etanol 70 %, seco na bomba de vácuo (SAVANT SVC100) e ressuspendido em uma solução de 1/10 TE pH 8,0 (Tris-HCl 1 mM e EDTA 0,1 mM).

2.5.2 Reação de ligação e transformação bacteriana

Os fragmentos de PCR purificados ou DNAs plasmidiais foram digeridos com enzimas de restrição (BIOLABS, LIFE TECHNOLOGIES ou BOEHRINGER MANNHEIM) em 15 μl do tampão apropriado. As reações foram aplicadas no gel como descrito anteriormente e as bandas de tamanho apropriado foram purificadas como descrito no item 2.5.1. Os fragmentos de DNA, purificados do gel, foram ligados aos fragmentos de DNA plasmidial. As reações de ligação foram feitas utilizando um método rápido de ligação de DNA (BOEHRINGER MANNHEIM), onde foram utilizados 50 a 100 ng do fragmento de DNA e 10 a 50 ng do DNA plasmidial contendo a origem de replicação e o marcador de resistência a antibiótico (vetor). Estes DNAs foram diluídos para 5 μl utilizando-se tampão 5 x de diluição de DNA (BOEHRINGER MANNHEIM). Cinco μl do tampão de ligação do DNA (BOEHRINGER MANNHEIM), 0,5 μl da enzima ligase (BOEHRINGER

MANNHEIM) foram adicionados e a reação incubada por 5 min. à temperatura ambiente.

Os DNAs ligados foram utilizados para transformar células de *Escherichia coli* cepa DH5 α . Vinte μ l de células competentes DH5 α ("Maximum Efficiency"-LIFE TECHNOLOGIES) foram misturados com 1 μ l da mistura de ligação e incubados por 30 min. no gelo. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 40 segundos e transferidas imediatamente para o gelo. Oitenta μ l de meio de crescimento SOC (LIFE TECHNOLOGIES) foram adicionados em condições assépticas e a suspensão celular incubada por 60 min. a 37 °C com agitação contínua (incubador BELLCO BIOTECHNOLOGY). O conteúdo foi espalhado em uma ou 2 placas de 10 cm de diâmetro contendo o meio 2 x YT (16 g de bactotriptona-SIGMA, 10 g de extrato de bactolevedura-DIFCO e 5 g de NaCl-SIGMA) contendo 50 μ g/ml de ampicilina (SIGMA) e 1,2 % ágar-DIFCO e as placas incubadas a 37 °C por 12 a 16 horas.

2.5.3 Triagem bacteriana por PCR

Colônias individuais de bactérias foram coletadas diretamente da placa de transformação com um palito estéril. O palito foi colocado em contato com a superfície interna de uma placa 2 x YT/Amp., com posição numerada e as bactérias restantes foram transferidas para um tubo de 500 μ l contendo 15 a 30 μ l de uma solução tampão TE contendo 50 μ g de Proteinase K (SIGMA). Dependendo do experimento, os tubos individuais continham 1 a 10 diferentes colônias bacterianas. Cada tubo foi incubado por 15 min. a 55 °C, seguido por 15 min. de incubação a 80 °C, utilizando um programa na máquina de PCR.

A mistura foi resfriada no gelo por 1 min. e centrifugada por 1 min. Um μl de DNA/proteinase K foi adicionado a um coquetel de PCR contendo 1 μl de tampão 10 x PCR (PERKIN ELMER ou BOEHRINGER MANNHEIN), 1 μl de uma solução de dNTPs 2 mM, 0,5 pmoles de oligo senso, 0,5 pmoles de oligo antisenso e 0,05 μl de Taq polimerase (BOEHRINGER MANNHEIN) em um volume final de 10 μl . As reações se processaram na máquina de PCR por 30 ciclos (desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 30 segundos a 60 °C e extensão por 1 min. a 72 °C). Após o término das reações, os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 0,8 a 2 % em uma solução tampão Tris-Borato 0,045 M contendo EDTA 0,001 M (TBE) ou em gel de poliacrilamida 6 % (BIORAD) em tampão TBE. O gel foi corado em solução de brometo de etídio, descorado em água e fotografado com o uso de um transiluminador UV (HOEFFER).

2.5.4 Triagem bacteriana por digestão de minipreparação de DNA plasmidial

Um ml de meio nutriente 2 x YT contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina foi adicionado em tubos eppendorf previamente numerados. Utilizando palitos estéreis, um número de colônias foram transferidas da placa de transformação para cada tubo eppendorf recém-preparado. O mesmo palito depositado em cada tubo foi colocado em contato com a superfície interna da placa 2 x YT/Amp, previamente numerada de acordo com a numeração dos tubos eppendorf. Os tubos eppendorf foram colocados a 37 °C com agitação vigorosa durante a noite e a placa contendo as réplicas foi cultivada e mantida a 4 °C.

Os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados em uma microcentrífuga a 12.000 g por 2 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante aspirado cuidadosamente. Um volume de 250 µl de tampão STET (8 % sacarose, 5 % Triton x-100, EDTA 50 mM pH 8,0, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e 1 mg/ml de lisozima-SIGMA) foi adicionado e o tubo agitado vigorosamente. Cada tubo foi incubado em banho de água fervente por 1 min. e centrifugado imediatamente a 12.000 g por 10 min. à temperatura ambiente. O precipitado dos debris bacterianos foi removido com um palito estéril e 250 µl de isopropanol (FISHER SCIENTIFIC) foram adicionados. O tubo foi misturado por inversão, centrifugado novamente a 12.000 g por 10 min. à temperatura ambiente, o sobrenadante aspirado cuidadosamente e o precipitado seco na bomba de vácuo por aproximadamente 5 min. Cada precipitado foi ressuscitado em 20 µl de uma solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM), aquecido por 10 min. a 68 °C, agitado e centrifugado a 12.000 g por 2 min. à temperatura ambiente.

Um coquetel de digestão contendo o(s) tampão(ões) da(s) enzima(s), 2 a 5 µl de cada DNA (dependendo do tamanho e qualidade do plasmídeo) e enzima(s) de restrição(ões) em um volume final de 10 µl foi preparado. A reação foi incubada por 60 min. a 37 °C e paralizada com 2,5 µl de uma solução SLB contendo EDTA 55 mM (8 partes de 6 x SLB mais uma parte de EDTA 0,5 M pH 8,0) e RNase A 200 µg/ml. As digestões foram analisadas por eletroforese como descrito no item 2.5.3.

2.5.5 Preparação de DNA de alta pureza para subclonagem, sequenciamento, preparação de RNA, transfecção ou inoculação de animais

Após a identificação dos clones positivos por PCR e/ou análise por digestão da minipreparação de DNA, diferentes preparações de DNA foram feitas.

2.5.5.1 Preparação de DNA pelo método de WIZARD

Esta preparação, foi feita utilizando o kit WIZARD (PROMEGA), com o objetivo de produzir DNAs para mapeamento detalhado através de enzimas de restrição, sequenciamento parcial, preparação de RNA e transfecção.

Colônias de bactérias selecionadas foram crescidas em um tubo de ensaio contendo 7 ml de meio nutriente 2 x YT contendo ampicilina 100 µg/ml por 16 a 20 horas a 37 °C com agitação. Três ml da cultura celular foram centrifugados a 12.000 g por 2 min. em uma microcentrífuga, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em 200 µl de solução de ressuspensão celular (PROMEGA). Duzentos µl de solução de lise celular (PROMEGA) foram adicionados e o tubo misturado por inversão por algumas vezes até que a suspensão celular se tornasse límpida. Em seguida, 200 µl de solução neutralizante foram adicionados, o tubo misturado algumas vezes por inversão e centrifugado a 12.000 g por 10 min. em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi decantado em um novo tubo contendo 1 ml de resina de purificação de minipreparação de DNA Wizard (PROMEGA) e misturado por inversão. A resina contendo o DNA foi colocada em uma mini-coluna acoplada a uma bomba de sucção ("Vaccum Manifold"-PROMEGA), lavada

com uma solução de lavagem (PROMEGA) e em seguida o DNA foi eluído com uma solução tampão TE aquecida a 68 °C.

2.5.5.2 Produção de DNA em larga escala

Colônias bacterianas selecionadas foram crescidas em um volume maior de meio cultura com o objetivo de se purificar uma quantidade maior de DNA para ser utilizado nas reações de sequenciamento em larga escala.

Uma única colônia bacteriana ou bactérias coletadas de culturas estoques congeladas foram inoculadas em 50 ml de meio nutriente 2 x YT contendo ampicilina 100 µg/ml durante a noite em um agitador a 37 °C. A cultura celular foi centrifugada em um tubo de centrífuga ("Oak Ridge"-NALGENE) a 5.000 g por 5 min. a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado agitado, ressuspensionado por ação de pipetagem com 2 ml de uma solução gelada de GTE (glicose 50 mM-SIGMA, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0) contendo lizozima 2 mg/ml (SIGMA) e incubado por 5 min. no gelo. Em seguida, foram adicionados 4 ml de uma solução NaOH 0,2 N contendo SDS 1 % e a mistura incubada por 5 min. no gelo. Após a incubação, 3 ml de acetato de potássio gelado (potássio 3 M e acetato 5 M) foram adicionados, misturados por inversão por 10 segundos e incubados por 10 min. no gelo. Foi feita uma centrifugação utilizando um rotor SL-50T de uma centrífuga SORVALL, a uma velocidade de 26.816 g, por 15 min. a 4 °C e em seguida, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo Falcon de 50 ml. Ao sobrenadante foram adicionados 20 µl de uma solução de RNAase A 10 mg/ml e uma incubação por 15 min. a 37 °C foi feita. Um volume igual da mistura fenol (LIFE TECHNOLOGIES):clorofórmio:álcool isoamílico (FISHER

SCIENTIFIC) foi adicionado na proporção de 25:24:1. A mistura foi agitada, centrifugada a 1072 g por 5 min. e a fase aquosa foi transferida para o tubo de centrífuga. Duas vezes o volume de etanol foram adicionados à fase aquosa, misturados e precipitados por 5 min. no gelo. Foi feita uma centrifugação a 26.816 g por 20 min., o sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com etanol 70 % e seco. O precipitado foi dissolvido em 300 µl de H₂O e transferido para um tubo eppendorf. Em seguida, foi feita uma microcentrifugação a 12.000 g por 10 min. a 4 °C, o sobrenadante transferido para outro tubo eppendorf e incubado por 5 min. a 37 °C. Um igual volume de NaCl 0,8 M/13 % de polietilenoglicol (PEG) foi adicionado, misturado e incubado por 20 min. no gelo. Foi feita novamente uma microcentrifugação a 12.000 g por 20 min. a 4 °C, o sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com etanol 70 %, seco e ressuspendido em 100 µl de uma solução tampão TE ou 1/10 TE.

2.5.5.3 Centrifugação em gradiente de CsCl

Este procedimento foi realizado para se obter uma solução ultra-pura de DNA para ser utilizado nas inoculações em animais.

Uma colônia bacteriana ou bactérias coletadas de culturas estoques congeladas foram crescidas em 250 ml de meio nutriente 2 x YT. O DNA foi purificado seguindo o procedimento 2.5.5.2, exceto que o precipitado de etanol, nesta preparação, foi ressuspendido em 4 ml de uma solução de CsCl preparada pela adição de 4 g de CsCl a 4 ml de TE. Em seguida, 50 µl de solução de brometo de etídio foram adicionados, a mistura transferida para tubos BECKMAN # 362185 de 4,9 ml, misturada por inversão e centrifugada

em um rotor VTi 65.2 (BECKMAN) de ultracentrífuga a 416.000 g por 18 horas a 20 °C. A banda contendo o DNA foi removida cuidadosamente com uma seringa de 3 ml, transferida para um tubo de polipropileno e tratada com um volume igual de butanol saturado em água por 4 a 5 vezes, até a remoção completa do brometo de etídio. Foram adicionados 3 x volume de uma solução tampão 1/10 TE e 1/10 volume de uma solução de acetato de sódio 3 M pH 5,2. Um volume igual de isopropanol foi adicionado e o tubo incubado por 20 min. no gelo. Foi feita uma centrifugação a 12.000 g por 20 min. a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com etanol 70 % e seco. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 100 a 500 µl de uma solução tampão 1/10 TE e o DNA quantificado a 260 nm em um espectrofotômetro (SPECTRONIC 601-MILTON ROY).

2.5.5.4 Acoplamento de DNA à partículas de ouro

Este método foi realizado com o objetivo de se preparar as vacinas de DNA para serem inoculadas, utilizando "Accell Particle Delivery Device" ("gene gun").

O complexo DNA/ouro utilizado na inoculação via "gene gun" foi preparado com DNA purificado em gradiente de CsCl, utilizando reagentes e aparelhos provenientes da POWDERJECT VACCINES, INC.

Um capilar plástico (TEFZEL), longo foi inserido dentro de uma tubulação metálica previamente irradiada e nitrogênio (N₂) foi injetado por 1/2 hora. Aproximadamente 25 mg de pó de ouro de 2,6 µm de diâmetro foram pesados em um tubo eppendorf, 100 µl de uma solução de espermidina 50 mM foram adicionados, agitados, sonicados em um sonicador (HERT

SYSTEMS) e em seguida, 2 µg de DNA/mg de ouro foram adicionados. Cem µl de uma solução CaCl₂ 1 M foram adicionados no momento em que o tubo contendo DNA/ouro foi agitado vagarosamente. O ouro foi precipitado e em seguida, mantido em repouso por 10 min. à temperatura ambiente. Foi feita uma centrifugação a 12.000 g por 20 segundos e o sobrenadante desprezado. Duas gotas de etanol desidratado (SPECTRUM CHEMICAL MFG. CORP.) foram adicionadas ao precipitado, agitado vagarosamente e a ele foram adicionados mais 750 µl de etanol desidratado. Foi feita novamente uma centrifugação a 12.000 g por 20 segundos e o sobrenadante novamente desprezado. As etapas de precipitação com etanol desidratado e centrifugação foram repetidas por 2 vezes mais. Ao precipitado final foi adicionado etanol desidratado calculado da seguinte maneira: mg ouro/3,5 = ml etanol para 0,5 µg DNA/injeção. Um volume de 1/20 de polivinilpolaridina (PVP; mg/ml de etanol) foi adicionado. As esferas cobertas com o DNA foram lavadas com etanol desidratado, sonicadas e agitadas para permitir a formação de uma suspensão. O capilar de dentro da tubulação metálica foi retirado e a suspensão contendo DNA/ouro foi transferida para o capilar com o auxílio de uma seringa. O capilar foi introduzido novamente dentro da tubulação metálica e foi feito um movimento giratório, permitindo que a solução introduzida cobrisse todo o interior do tubo. O mecanismo de rotação utilizado seguiu as seguintes etapas: 0° até atingir a marca de 15 segundos, 90° até atingir a marca de 45 segundos, 180° até atingir a marca de 1:15 segundos, 270° até atingir a marca de 3 min. e um movimento giratório por mais 1/8. O etanol foi retirado com o auxílio de uma bomba peristáltica a 5 ml/min., o capilar foi deixado em repouso por mais 30 segundos e em seguida, ele foi seco com N₂ por 20 min. a 4 litros/min. O capilar contendo DNA/ouro foi retirado do interior da tubulação e cortado em fatias que foram inseridas

dentro do cartucho da "gene gun".

2.6 SEQUENCIAMENTO

Parte das reações de sequenciamento foram feitas manualmente utilizando o sistema de sequenciamento "Fidelity" (ONCOR) e grande parte foi feito no sequenciador automático (APPLIED BIOSYSTEMS, INC. MODEL 373 A).

2.6.1 Sequenciamento manual

Todos os componentes biológicos utilizados neste procedimento foram provenientes da ONCOR; os aparelhos de eletroforese foram provenientes da LIFE TECHNOLOGIES e as fontes foram provenientes da E.C. CORPORATION.

As placas de sequenciamento foram limpas com água, sabão e etanol. Uma das placas foi tratada com silicone ("Rainex"-UNELCO) e as 2 placas foram sobrepostas com espaçadores de 0,4 mm entre elas e fixadas com garras até o momento da mistura ser colocada.

O gel foi preparado com uma mistura contendo 80 ml de uma solução ultrapura de Sequagel-6 (NATIONAL DIAGNOSTICS), 20 ml do tampão reagente (NATIONAL DIAGNOSTICS) e 0,8 ml de uma solução de 10 % persulfato de amônio (APS) (LIFE TECHNOLOGIES). A mistura foi colocada entre as placas previamente montadas, um espaçador foi inserido na parte superior do gel para formar uma grande canaleta e o conjunto deixado descansando para a polimerização da acrilamida/bis-acrilamida.

Aproximadamente 2,5 μg de DNA foram misturados com H_2O em um volume total de 18 μl . Dois μl de uma solução de NaOH 2 N foram adicionados, incubados por 5 min. à temperatura ambiente e em seguida, a reação foi neutralizada com 3 μl de uma solução de acetato de sódio 3 M. Sete μl de H_2O foram adicionados e a reação foi misturada. Setenta e cinco μl de etanol foram adicionados, a reação foi misturada novamente, incubada por 10 min. a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida centrifugada a 12.000 g em uma microcentrífuga por 20 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O precipitado foi lavado com etanol 70 % e seco. Ao DNA desnaturado, foram adicionados 10 μl de uma solução tampão 1 x de anelamento contendo 0,5 pmoles de oligo. A reação de anelamento foi feita por aquecimento a 2 min. a $68\text{ }^\circ\text{C}$, resfriada vagarosamente para $35\text{ }^\circ\text{C}$, centrifugada brevemente e mantida no gelo. Três μl de tampão de reação T4, 2,2 μl de dH_2O , 8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ de $\alpha\text{ }[^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ (AMERSHAM) e 2 μl de T4 DNA polimerase foram adicionados à mistura de anelamento. A mistura marcada foi agitada, incubada por 10 a 15 min. a $40\text{ }^\circ\text{C}$, mantida no gelo e a ela foram adicionados 6 μl da mistura T4 acessória. Um volume de 5,5 μl da reação marcada foi colocado em tubos contendo 2 μl das misturas individuais de terminação e incubados por 5 min. a $40\text{ }^\circ\text{C}$. Essas reações foram paralizadas pela adição de 5 μl de uma mistura contendo três partes (15 μl) de solução de parada e uma parte (5 μl) de solução de proteinase K. As reações foram incubadas por 15 min. a $40\text{ }^\circ\text{C}$ e mantidas a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Depois de ocorrida a polimerização, as placas foram ajustadas no aparelho S2 (LIFE TECHNOLOGIES). A parte da placa onde a solução acrilamida/bis-acrilamida não foi polimerizada, foi lavada com uma solução 1 x TBE e em seguida foi feita uma pré-corrída do gel por aproximadamente 30 min. a 65 W. Pequenas canaletas foram criadas onde a solução acrilamida/bis-acrilamida não foi polimerizada, através da inserção de um pente com dentes

curtos. As amostras foram aquecidas por 5 min. a 98 °C e aplicadas nas canaletas do gel. A corrida do gel foi feita de 1,5 a 5 horas a 65 W, dependendo do sequenciamento. Após a eletroforese, as placas foram separadas e a placa com a camada do gel foi colocada em uma solução de ácido acético a 5 % e isopropanol a 5 % por 15 min. O excesso da solução foi retirado por sucção e o gel transferido para uma folha de papel. O papel foi coberto com plástico e seco por no mínimo 1 hora a 80 °C ("Gel dryer"-BIO-RAD). O plástico foi retirado e o papel contendo a amostra radioativa foi colocado em contato direto com um filme de raio X. O filme foi exposto por um dia em um cassete escuro, revelado em um revelador automático (KODAK) e em seguida, foi feita a leitura das seqüências encontradas com o auxílio de um transiluminador (FOTODYNE). As seqüências encontradas foram comparadas às seqüências já existentes, utilizando o programa "Mac Vector" (IBI).

2.6.2 Sequenciamento automático

As placas foram lavadas com água e sabão, secas com papel-toalha e transferidas para a máquina de sequenciamento, onde foram checadas por "scanning" com o uso de "laser" para detectar sujeiras que poderiam interferir com a análise das seqüências. Em casos onde o "laser" detectou fluorescência, o procedimento de limpeza foi repetido até que as placas ficassem perfeitamente limpas. Depois de limpas, as 2 placas foram sobrepostas com espaçadores entre elas, vedadas e fixadas com garras.

A preparação do gel foi feita com uma mistura contendo 50 ml de uma solução de 5,7 % acrilamida (0,3 % bisacrilamida e 50 % de uréia preparada

em TBE) polimerizada com 0,5 % de APS e 0,04 % de TEMED. A mistura foi colocada entre as placas previamente montadas, um espaçador foi inserido na parte superior do gel para formar uma grande canaleta e o conjunto deixado descansando para a polimerização da acrilamida/bis-acrilamida.

Em um tubo de PCR, 2 a 4 μg de DNA e 0,5 pmoles de oligo foram pipetados em um volume final de 12 μl . Oito μl de uma mistura pronta para uso contendo Amplitaq FS (PERKIN ELMER) foram pipetados e em seguida as reações colocadas na máquina de PCR por 25 ciclos de 10 seg. a 96 °C, 5 seg. a 50 °C e 4 min. a 60 °C. Para cada reação foi preparado um tubo eppendorf contendo 2 μl de uma solução de NaAc 3M pH 5,2 e 50 μl de etanol. O conteúdo de 20 μl dos tubos de reação de PCR foi transferido para o tubo eppendorf contendo a solução de etanol, agitado, mantido no gelo por 15 min. e centrifugado a 12.000 g, a 4 °C por 30 min. Em seguida, o etanol foi removido cuidadosamente, o precipitado foi lavado com 750 μl de etanol 70 %, o etanol aspirado e o precipitado seco. O precipitado foi ressuscitado em 5 μl de uma mistura contendo 5 partes de uma solução de formamida deionizada (LIFE TECHNOLOGIES) e uma parte de uma solução de EDTA 50 mM pH 8,0. Cada amostra foi agitada, centrifugada rapidamente, aquecida por 2 min. a 98 a 100 °C e mantida no gelo até o momento da aplicação no gel.

Depois de ocorrida a polimerização do gel, as fitas adesivas e as garras foram retiradas e as placas foram limpas novamente nas suas superfícies externas. Elas foram transferidas para o sequenciador e o procedimento de checagem de limpeza foi repetido. Todo o sistema de ajuste das placas ao aparelho foi montado, o espaçador inserido na parte superior do gel foi removido e a grande canaleta formada, foi lavada com uma solução 1 x TBE. Em seguida, foi feita uma pré-corrida do gel por aproximadamente 10 min. a

1280 V, 24 mA e 30 W a 40 °C. Pequenas canaletas foram criadas no espaço deixado pelo espaçador, através da inserção de um pente. As amostras foram aplicadas nas canaletas e a eletroforese foi processada por 14 horas nas condições acima.

Em seguida, análises das seqüências obtidas foram feitas utilizando o programa do sistema "ABI 373 A" e eletroesferogramas foram examinados no programa "Edit View" (IBI) para que as indefinições fossem resolvidas. As seqüências foram alinhadas/agrupadas utilizando o programa "Assembly align" (IBI) e avaliadas utilizando o programa o "MacVector".

2.7 TRANSFECCÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE

2.7.1 Preparação de RNA *in vitro*

Dois a 5 µg de DNA foram digeridos a 37 °C durante a noite na presença de 5 a 20 unidades de enzima para a produção do molde linearizado. Após a digestão, possíveis RNases presentes na reação foram removidas pelo tratamento com 20 µg de proteinase K na presença de 0,1 % de SDS por 15 min. a 55 °C e 15 min. a 80 °C. Um igual volume de fenol foi adicionado, a mistura agitada, centrifugada a 12.000 g por 2 min. e a fase aquosa superior coletada. Um volume igual de clorofórmio foi adicionado, a mistura agitada e centrifugada novamente a 12.000 g por 2 min. O DNA da fase aquosa foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol na presença de 10 µg de glicogênio de ostra. O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 g por 20 min. a 4 °C e ressuspendido em 1/10 volume de uma solução tampão

TE filtrado.

A reação de transcrição foi feita utilizando o sistema "Ambion MEGAscript", onde foram utilizados 7,5 mM de ATP, CTP, GTP e UTP, 0,5 a 1 µg de DNA e 1 µl de uma mistura de enzima T7 polimerase em um volume final de 10 µl. A reação foi incubada por 4 horas a 37 °C e o RNA analisado por eletroforese em gel de agarose em tampão 1 % TBE.

2.7.2 Eletroporação de células BHK

Células BHK foram transformadas com RNAs sintéticos por eletroporação como descrito por MASON *et al.* (1994)

Uma garrafa contendo uma monocamada de células subconfluentes foi lavada 2 vezes com PBS. Oito a 10 ml de tripsina/EDTA foram adicionados, a garrafa foi incubada por 10 min. em um incubador giratório a 37 °C e em seguida, 5 a 6 ml de meio nutriente BHK foram adicionados. As células foram ressuspensas pela passagem através de uma cânula por 10 vezes e centrifugadas a 207 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas pela adição de 50 ml de meio nutriente BHK e centrifugadas novamente a 207 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas pela adição de 50 ml de uma solução de PBS mantido previamente no gelo e centrifugadas novamente a 207 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado novamente, as células foram ressuspensas pela adição de 2 ml da solução gelada de PBS e pela passagem através de uma cânula por 5 vezes. A concentração das células na suspensão foi determinada em câmara de Neubauer ao microscópio óptico, a concentração ajustada para 2×10^7 células/ml e mantidas em seguida no gelo.

Um tubo contendo 12,5 ml de meio nutriente BHK foi preparado para cada reação de eletroporação. Dois a 10 µg de RNA foi colocado em uma cubeta estéril (BTX, INC) juntamente com 0,8 ml de suspensão de células e misturados. A cubeta foi inserida no aparelho ("gene ZAPPER" 450/2500-IBI) ligado a 14 µF e 1500 V. Foram dados 2 pulsos utilizando os comandos acima e imediatamente as células foram transferidas para os tubos contendo o meio nutriente. Dois a 5 ml das células eletroporadas foram transferidas para cada poço de 35 mm de diâmetro da placa e deixadas por 2 a 3 horas em um incubador de atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. As células mortas foram removidas por 2 a 3 lavagens com 1 ml de VGM contendo 0,5 % CS. Dois ml de VGM contendo 0,5 % CS foram adicionados e as células colocadas novamente em um incubador de atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C durante a noite. Em alguns casos, o VGM foi substituído por VGM contendo 5 % da concentração de metionina normal e as células foram marcadas radioativamente com 50 a 100 µCi de ³⁵S-Metionina durante a noite.

2.7.3 Infecção de células BHK por "Lipofectin™"

Células BHK subconfluentes foram preparadas previamente em placas de 6 poços de 35 mm de diâmetro, mantidas em uma atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C e transformadas com uma solução catiônica de lipossomo, "Lipofectin™", utilizando o protocolo descrito pelo fabricante (LIFE TECHNOLOGIES).

Uma solução A foi preparada em um tubo de poliestireno 12 x 75 (ELKAY PRODUCTS, INC.) contendo 18 µl do reagente "Lipofectin™" (LIFE TECHNOLOGIES), 82 µl de BME contendo HEPES 25 mM (LIFE

TECHNOLOGIES) e incubada por 30 a 45 min. à temperatura ambiente.

Uma solução B foi preparada contendo 0,5 a 2 μg de RNA em 100 μl de BME/HEPES. Cem μl da solução A foram adicionados em cada tubo contendo a solução B, misturados gentilmente e incubados por 10 a 15 min. à temperatura ambiente.

As placas contendo a monocamada de células BHK foram lavadas uma vez com 2 ml de BME/HEPES e levadas novamente ao incubador de atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 °C.

Um volume de 0,8 ml de BME/HEPES foi adicionado em cada tubo contendo o complexo "LipofectinTM"/RNA. O conteúdo de cada tubo foi misturado gentilmente e transferido para a monocamada de células BHK após a retirada do meio. As células foram incubadas por 5 horas a 37 °C, o meio contendo RNA foi substituído com 2 ml de VGM contendo 0,5 % CS para a recuperação de vírus (ver item 2.2.1) ou com 2 ml de cobertura de "tragacanth" para determinação de ufp pela coloração com cristal violeta (ver item 2.2.2) ou por imunoperoxidação (ver item 2.2.3).

2.7.4 Recuperação de vírus

A recuperação de vírus a partir de células transfectadas com RNAs sintéticos (ver itens 2.7.2 e 2.7.3) foi feita através de passagens em células BHK ou CHO11.1 (ver item 2.2.1) ou através de ensaios de unidades formadoras de placas em células BHK ou CHO11.1 detectadas pela coloração com cristal violeta (ver item 2.2.2) ou por ensaios de imunoperoxidação (ver item 2.2.3).

2.7.5 Purificação do vírus

Após a transfecção celular, os vírus foram crescidos por diversas passagens (3 ou 4) em células BHK ou CHO11.1 em um número maior de frascos T-162 ou em garrafas plásticas e purificados como descrito por BAXT *et al.* (1984).

Depois de alcançado o efeito citopático esperado, os frascos ou garrafas foram colocados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongelados e em seguida, foram adicionados a cada um 1/100 do volume de 10 % Triton x-100 (p/v). Toda a suspensão celular foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugados a 11.648 g por 10 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi decantado em um novo tubo, o volume foi determinado e 8 % do volume de PEG foi adicionado. A mistura contendo PEG foi agitada, mantida por 1 h. no gelo com agitação periódica, centrifugada a 11.648 g por 10 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante desprezado e todo o PEG residual foi retirado com um aplicador. O precipitado foi ressuspenso em 1/30 a 1/10 do volume inicial com uma solução gelada de TNE e centrifugado novamente a 11648 g por 10 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, o volume determinado e 1/20 volume de uma solução de 10 % sódio sarcosil (p/v) em uma solução tampão TNE e 1/100 volume de uma solução de EDTA 0,5 M foram adicionados. Cinco a 6 ml de cada amostra foram aplicados em tubos SW28 (BECKMAN) preparados com gradiente contínuo de sacarose 10 a 50 % (ver item 2.3.1), exceto que o volume de solução de sacarose utilizado foi de 15,6 e 15,7 ml para preencher um tubo de maior capacidade. Os tubos foram centrifugados no rotor SW28 (BECKMAN) a 72.000 g em uma ultracentrífuga por 12 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram coletadas do fundo de cada gradiente em intervalos regulares

de tempo (30 segundos) com o uso de uma bomba peristáltica e levadas a um espectrofotômetro. A densidade óptica a 260 nm foi medida, os dados coletados foram colocados em um gráfico, o pico de 140 S foi identificado e as frações que formaram o pico foram agrupadas. A OD₂₆₀ foi novamente medida e a concentração do vírus foi determinada baseado no valor de OD₂₆₀ de 129 µg/ml (BAXT & BACHRACH, 1980).

2.8 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

2.8.1 Estudos de patogênese e vacinação em bovino

Um bovino da raça Holstein de 10 meses de idade foi inoculado com vírus vivo purificado no gradiente de densidade de sacarose, pela rota intradermolingual. Primeiramente, o animal foi anestesiado intramuscularmente com 0,1 mg/kg de "Xylazine" (MILES, INC). Em seguida, a língua do animal foi puxada para fora e com uma seringa de vidro de 1 ml (BECTON-DICKINSON) e uma agulha de 22 "g", foram dadas 5 injeções de 50 µl de cada diluição do vírus em BME na face superior da língua. As amostras provenientes da mesma série de diluições utilizadas na inoculação acima foram tituladas nas células BHK (ver ítem 2.2.2). Após a inoculação, a temperatura retal do animal foi verificada diariamente e os dados foram arquivados para análise posterior. Em dias selecionados, o animal foi anestesiado (ver acima), as suas patas, língua e narinas foram examinadas pela observação de formação de vesículas.

O sangue do animal foi coletado em intervalos regulares com um tubo de 13 ml ("Vacutainer"- BECTON-DICKINSON). O soro foi separado,

inativado por aquecimento a 30 min. a 56 °C e estocado a -20 °C para determinação subsequente de anticorpos neutralizantes através do ensaio de redução de placas (NEUT) (ver ítem 2.3.2) em células BHK e anticorpos dirigidos contra proteínas estruturais e proteína não-estrutural 3D por radioimunoprecipitação (RIP) (ver ítem 2.3.3).

O animal foi desafiado pela mesma rota com aproximadamente 10.000 ufp (ID₅₀) do vírus selvagem e observado seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

2.8.2 Suínos

2.8.2.1 Estudos patogênicos

Trinta e cinco suínos da raça Yorkshire pesando de 15 a 30 kg foram utilizados, sendo que os mesmos foram separados em grupos de 5 animais e mantidos em ambientes diferentes. Em cada grupo, 2 animais foram anestesiados com 4 mg/kg de "Xylazine", 8 mg/kg de "Ketaset" (FORT DODGE LABORATORIES, INC.), 3 mg/kg de "Telazol" (FORT DODGE LABORATORIES, INC.) e inoculados com o vírus vivo purificado no gradiente de densidade de sacarose diluído nas concentrações de 0,5 e 0,05 µg em BME. A rota de inoculação utilizada foi a combinação da rota intradermal com a esfoliação da pele na banda coronária externa na pata direita do animal e no lado direito do nariz. Os 3 restantes foram mantidos como animais controles. Após a inoculação, a temperatura retal de todos os suínos foi coletada diariamente e os animais foram examinados diariamente nos primeiros 10 dias de experimento com o objetivo de se detectar o

aparecimento de lesões vesiculares nas patas, nariz e boca. Os animais que foram mantidos por mais de 10 dias, foram examinados apenas 3 a 4 vezes por semana. Em dias selecionados, os animais que se tornaram positivos para a aftosa foram anestesiados, fluidos vesiculares e/ou amostras de epitélios vesiculares foram coletados, ressuspensos em BME contendo antibiótico/antimicótico, glutamina e 10 % de soro fetal de terneiro e mantidos a -70 °C para serem testados posteriormente. A presença do vírus foi detectada através de passagens em células BHK ou CHO11.1 (ver ítem 2.2.1) ou através de RT-PCT (ver ítem 2.4) seguido por análises de sequenciamento (ver ítem 2.6).

O sangue dos animais foi coletado em intervalos regulares. O soro foi separado, inativado por aquecimento a 30 min., 56 °C e estocado a -20 °C para determinação subsequente de anticorpos neutralizantes através do ensaio de redução de placas (NEUT) em células BHK (ver ítem 2.3.2) e anticorpos dirigidos contra proteínas estruturais e não-estruturais por RIP (ver ítem 2.3.3) ou por ELISA (ver ítem 2.3.4).

2.8.2.2 Estudos de vacinação

Vinte suínos da raça Yorkshire pesando 25 a 30 kg foram divididos em 3 ambientes. No primeiro ambiente, 2 animais foram inoculados no músculo quadríceps com 4 µg do vírus tipo O1, inativado por 48 h. com etilenamina binária (BEI) (BAHNEMANN, 1990) em emulsão de óleo mineral. Em um 2º ambiente, 3 animais foram inoculados na orelha direita via intraderme com 200 µl de BME contendo 4 µg de vírus vivo purificado no gradiente de densidade de sacarose; 3 animais foram inoculados subcutaneamente na área

posterior da escápula com 3 ml de BME contendo 4 µg de vírus e os outros 2 restantes permaneceram como controles. No terceiro e último ambiente, 2 animais foram inoculados via intraderme na orelha direita com 200 µl de PBS contendo 200 µg de DNA; 6 animais foram inoculados via "gene gun" na pele da região inguinal com 6 injeções de 0,5 µg de DNA acoplado a 0,5 mg de ouro (ver ítem 2.5.5.4) por imunização utilizando uma pressão de 500 "pounds per square inch" (PSI) e os 2 restantes permaneceram como controles.

RESULTADOS

3.1 PRODUÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTENDO CÓPIAS DO TAMANHO DO GENOMA INFECCIOSO DO VÍRUS A12 COM O SEU CAPSÍDEO SUBSTITUÍDO PELO CAPSÍDEO DO VÍRUS A24

3.1.1 Produção de clone de cDNA contendo o genoma completo (FLC) do tipo A24 do vírus da febre aftosa (VFA)

3.1.1.1 Vírus estoque

Vírus vacinal A24 (cepa Cruzeiro, 1955) foi originário do "Centro Panamericano de Fiebre Aftosa" (C.P.F.A), cultivado em células BHK na Universidade Federal do Rio de Janeiro (U.F.R.J.), RJ, Brasil. Em "Plum Island Animal Disease Center" (P.I.A.D.C), Greenport, NY, U.S.A, dois estoques do vírus foram obtidos a partir do estoque original. Um estoque foi crescido por uma passagem em células BHK. Um segundo estoque, proveniente da primeira passagem em células BHK e cultivado por 3 passagens em células CHO11.1 para permitir o isolamento do vírus A24 contendo o sítio antigênico de 2PD11, necessário para a propagação do vírus deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD. A primeira passagem em células CHO11.1 não produziu efeito citopático (ecp), levando à realização das 2^a e 3^a passagens, as quais produziram um ecp satisfatório, demonstrando seleção dos vírus adaptados para propagação nas células CHO11.1.

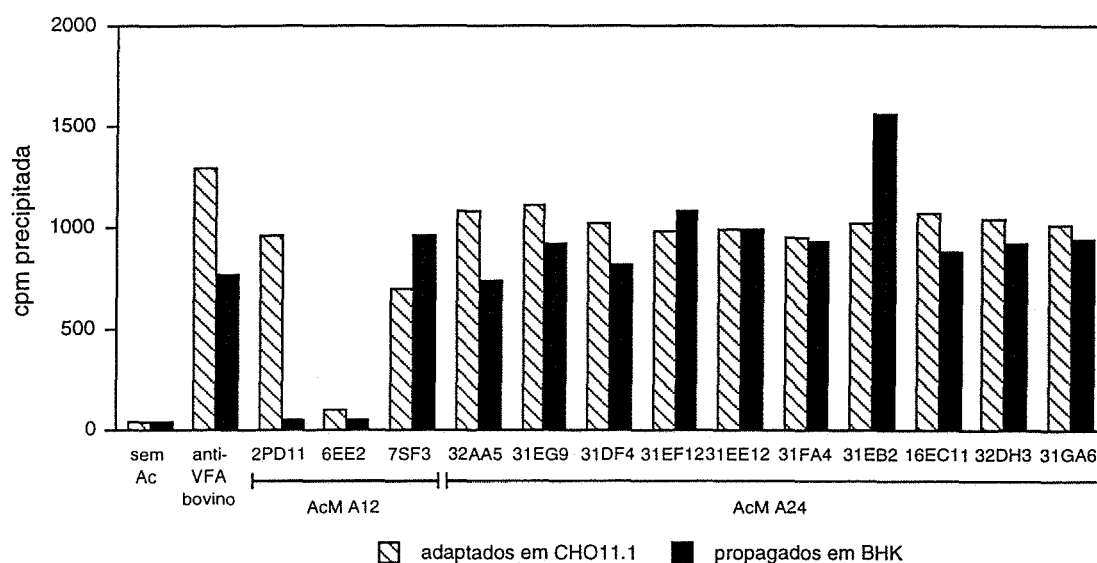
Para confirmar a autenticidade do vírus A24 propagado em células BHK e para comprovar se os vírus propagados em células CHO11.1 não foram alterados antigenicamente, eles foram avaliados utilizando-se anticorpos

monoclonais (AcM) originários do C.P.F.A para avaliar vacinas (ALONSO *et al.*, 1994) e fluidos de hibridomas originários de P.I.A.D.C (BAXT *et al.*, 1989) (Figura 4). Os dados da Figura 4 mostraram que os vírus propagados em células BHK e os adaptados em células CHO11.1 reagiram com todos os 10 AcM específicos do vírus A24. Quando testados com 3 AcM específicos do vírus A12, os vírus crescidos em células BHK reagiram apenas com um deles, enquanto os vírus adaptados em células CHO11.1 reagiram com 2 deles, sendo um deles o AcM 2PD11, o qual foi utilizado para produzir o receptor sintético expressado pelas CHO11.1 (RIEDER *et al.*, 1996).

3.1.1.2 Amplificação por PCR

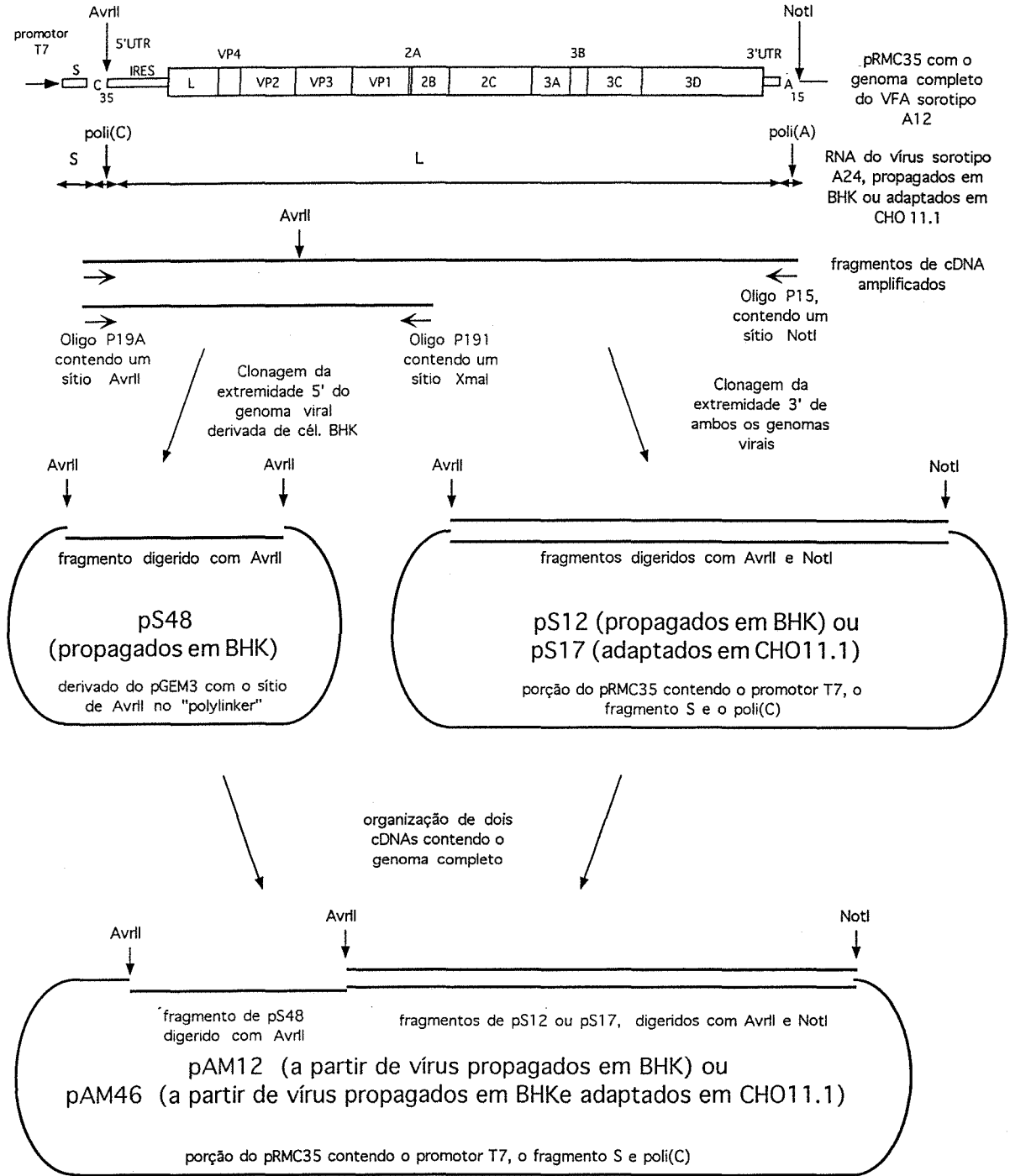
Tentativas preliminares para se produzir um cDNA infeccioso do capsídeo do vírus da febre aftosa (VFA) sorotipo A24, utilizando-se uma estratégia similar à utilizada para o VFA sorotipo O1 (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997) falharam. Foi criada uma nova estratégia para amplificar todo o fragmento L do genoma A24 e este fragmento foi adicionado ao fragmento S no genoma A12 (Figura 5). A amplificação foi obtida utilizando-se um oligonucleotídeo que continha um sítio de endonuclease de restrição *Not* I e 15 Ts (P15, 5'GGC GGC CGC TTT TTT TTT TTT TTT 3'), um oligonucleotídeo que correspondeu ao final da extremidade 5' do fragmento L (P19A, 5' GCG AAT TCC TAG GTT CTA CCG TCG TTC CC 3') e que continha um sítio de endonuclease de restrição *Avr* II que foi utilizado para construir o cDNA original infeccioso do vírus A12 (RIEDER *et al.*, 1993). Para minimizar a chance de mutações que poderiam surgir no capsídeo

Figura 4: Reatividade dos vírus A24 com diferentes anticorpos monoclonais (AcM)



Quantidades iguais de vírus purificados no gradiente de sacarose, radioativamente marcados, foram reagidos com AcM e a quantidade de radioatividade precipitada por *S. aureus* foi determinada como descrito (ver Métodos). Sem Ac indica nenhuma adição de anticorpos na reação; anti-VFA bovino refere ao soro convalescente de um bovino inoculado com múltiplos sorotipos de VFA; 7SF3, AcM específico no reconhecimento da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 2PD11 e 6EE2, AcM específicos no reconhecimento de um epítipo fora da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 32AA5, 31DF4, e 16EC11, AcM específicos no reconhecimento de epítipos presentes na região VP1 no vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994); 31EG9, 31EF12, 31EE12, 31FA4, 31EB2, 32DH3, e 31GA6, AcM conformacionais específicos do vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994).

Figura 5: Representação esquemática do genoma do VFA e estratégia para organização de FLC do tipo A24 do VFA



Ver legenda da Figura 1.

durante a amplificação, a região codificadora do capsídeo de ambos os RNAs virais foi também amplificada com o oligonucleotídeo P191 (5' GAC CGG CCG TTA CCC GGG GTT GGA CTC AAC GTC 3') que contem o sítio de restrição *Xma* I, adicionado por mutagênese nos resíduos altamente conservados de Pro-Gly, os quais correspondem aos 2 últimos aminoácidos da região 2A e o oligonucleotídeo P19A (Figura 5).

O RNA foi purificado de ambos os estoques virais propagados em células BHK e adaptados em células CHO11.1 (Tabela 4). cDNAs de tamanho do fragmento L (~ 7,8 kb) e do tamanho da região IRES → 2A (~ 3,6 kb) foram gerados a partir de ambos os estoques de RNAs utilizando-se os oligos P15/P19A ou P191/P19A por 30 ciclos de amplificação (30 seg./94 °C, 8 min./68 °C); 8 min./68 °C com a polimerase "Clontech advantage".

3.1.1.3 Clonagem e recuperação do vírus vivo contendo todo o fragmento L do genoma do vírus A24

Para inserir o fragmento L no cDNA infeccioso do vírus A12 (pRMC35), foi necessário a utilização de um protocolo de 2 etapas devido à presença de um sítio interno de *Avr II* na região VP3 (Figura 5). Para realizar a clonagem, primeiramente inseriu-se o fragmento VP3 → poli A de 5,5 kb, derivado do fragmento de PCR P15/P19A no lugar do fragmento de 8,0 kb no genoma do vírus A12, produzindo o pS12 (BHK) e o pS17 (CHO11.1) (Figura 5). O outro fragmento *Avr II* de 2,3 kb, derivado do fragmento de PCR P19A/P191, proveniente do cDNA do vírus cultivado por uma vez em células BHK, que se estendeu dos pseudonós até a região VP3 foi

Tabela 4: Propriedades dos vírus A24 Cruzeiro em cultura de células BHK e CHO11.1

Fonte do vírus	Título ^d (UFP/ml)	Fenótipo das placas ^d
A24/BHKp1 ^a	$4,2 \times 10^7$	pequenas (0,5 cm diam.) & transparentes
A24/CHO11.1p1 ^b	$1,0 \times 10^5$	pequenas (0,4 cm diam.) & transparentes
A24/CHO11.1p3 ^c	9×10^6	pequenas (0,4 cm diam.) & transparentes

a Cepa vacinal A24 proveniente do C.P.F.A, cultivada por uma passagem em células BHK.

b Cepa vacinal A24 proveniente do C.P.F.A, cultivada por uma passagem em células BHK e uma passagem em células CHO11.1.

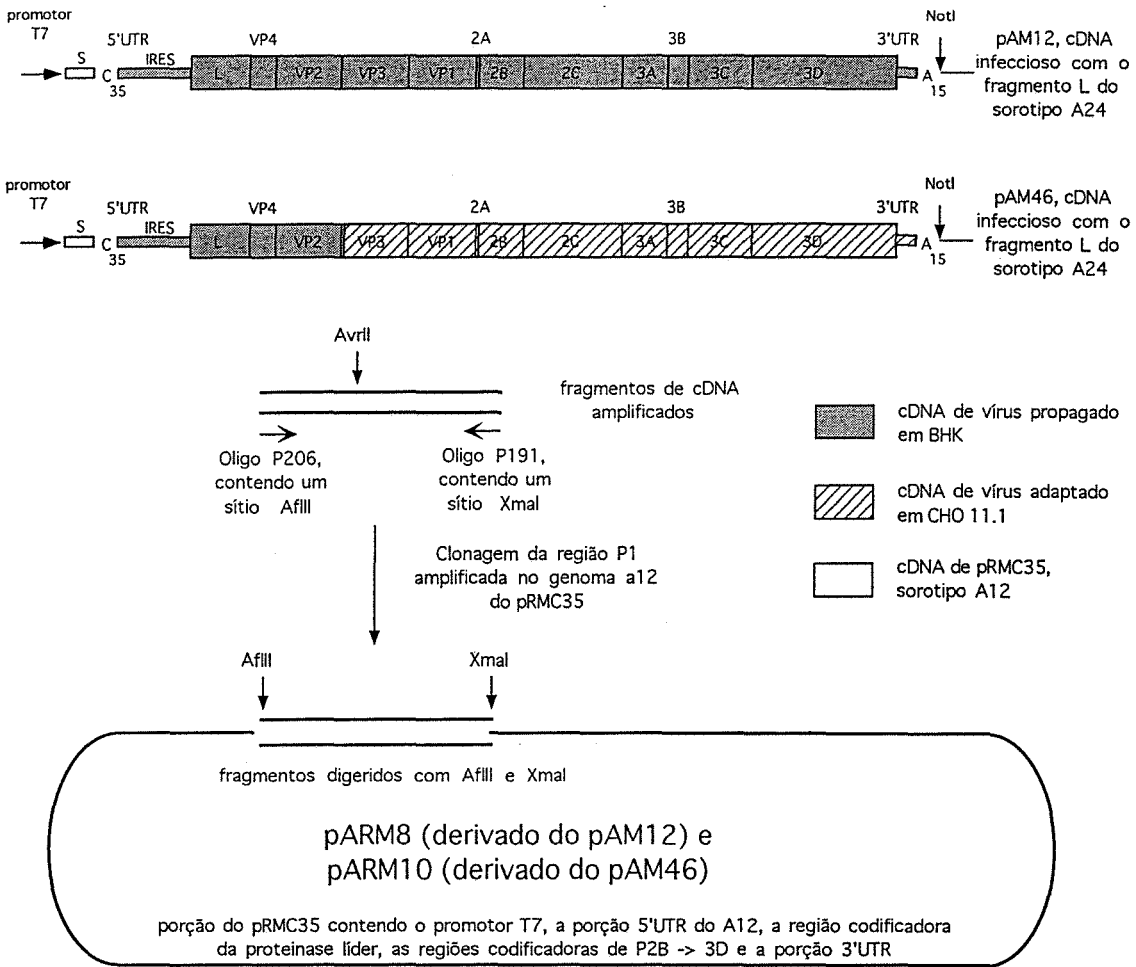
c Cepa vacinal A24 proveniente do C.P.F.A, cultivada por uma passagem em células BHK e três passagens em células CHO11.1.

d Determinados em células BHK e em células CHO11.1, corados a 48 e 72 horas pós-infecção, respectivamente.

clonado em um derivado do pGEM3 (PROMEGA), contendo um sítio de *Avr II* na região "polylinker", produzindo o pS48 (Figura 5). No final da etapa de montagem, o pS12 e o pS17 foram digeridos com *Avr II* e o fragmento de 2,3 kb do pS48 foi inserido, produzindo plasmídeos com os cDNAs FLC do fragmento L do vírus A24, pAM12 e pAM46. O pAM12 continha ambos os fragmentos do vírus propagado em células BHK (Figuras 5 e 6). O outro plasmídeo, o pAM46, continha o fragmento de 5,5 kb originário do vírus adaptado em células CHO11.1 e o fragmento de 2,3 kb originário do vírus propagado em células BHK (Figuras 5 e 6).

O pAM12 apresentou um genoma viável, desde que transcritos *in vitro* mostraram uma infectividade específica similar a do cDNA do vírus A12 (Tabela 5). Entretanto, o pAM46 não foi viável, o que sugeriu que este cDNA FLC continha uma mutação em alguma parte do genoma. Eventualmente, o vírus derivado do pAM46 foi recuperado, sugerindo que ele corrigiu a mutação e que provavelmente foi uma mutação puntual. Análises do vAM46 para testar sua habilidade de crescer em células CHO11.1, mostraram que ele continha o sítio antigênico do capsídeo do vírus derivado das células CHO11.1, o qual foi requerido para a propagação nas células CHO11.1 (RIEDER *et al.*, 1996). A habilidade do vírus para crescer em células CHO11.1 derivada do pAM46, demonstrou que a seqüência codificadora do epitopo requerido para se ligar às células CHO11.1 foi codificada pelo cDNA correspondente ao pS17 ("downstream" do sítio *Avr II* em VP3, Figuras 5 e 6).

Figura 6: Representação esquemática da estratégia para organização de FLC tipo A24/A12 do VFA



Ver legenda da Figura 1.

3.1.2 Clonagem e recuperação do vírus vivo contendo apenas a região P1 do genoma do vírus A24

A idéia inicial de se utilizar o pAM46 para produzir a deleção dos códons que codificam para os aminoácidos RGD seria muito difícil, desde que os RNAs derivados deste cDNA foram pobremente viáveis (Tabela 5). Uma possível estratégia para melhorar a viabilidade, poderia ter sido a substituição da porção do genoma viral que continha o fragmento mutado (ver acima) por cDNAs adicionais.

Assim, selecionou-se uma outra estratégia, onde apenas a região P1 do vírus A24 seria introduzida no cDNA do vírus A12. Esta estratégia foi facilitada pela disponibilidade da seqüência total do cDNA FLC do A12 e a utilização deste tipo de quimera P1A24/A12 poderia facilitar estratégias futuras de construção de vacinas.

Para amplificar a região P1, primeiramente as seqüências no sítio de clivagem L/VP0 do A24 foram analisadas através do sequenciamento do produto de PCR obtido do RNA do vírus cultivado por uma vez em células BHK. Utilizando-se dos dados de sequenciamento, o oligonucleotídeo P206 (5' CCG CTT AAG GGG GCC GGG CAA TCC 3') foi construído. Este oligo continha o sítio da enzima de restrição *Afl* II do sorotipo A12 nos últimos 2 códons da região codificadora da proteinase líder (L), fusionado aos primeiros 15 nucleotídeos da seqüência codificadora da proteína VP0 do vírus A24. Utilizando-se os oligos P206 e P191 (continha o sítio da enzima de restrição *Xma* I, ver acima), um fragmento de 2,3 kb foi amplificado a partir dos plasmídeos pAM12 e pAM46, usando-se um número menor de ciclos (15) para diminuir a chance de mutagênese mediada por PCR. Este produto foi

Tabela 5: Características de RNAs sintéticos contendo o fragmento L do vírus A24 com o fragmento S e o poli C do vírus A12 na monocamada de células BHK, transfectadas pelo uso de "Lipofectin™"

Fonte de RNA	Infectividade específica (UFP/μg) ^d
pRMC35 ^a	>100.000
pAM12 ^b	275.000
pAM46 ^c	≤ 1

a cDNA FLC do vírus A12.

b cDNA FLC contendo o fragmento S e poli C do vírus A12 e o fragmento L do vírus A24 (ver Figura 5).

c cDNA FLC do vírus A24 contendo o fragmento S e poli C do vírus A12 e o fragmento L do vírus A24 com a região VP3, VP1, P2 e P3 do vírus cultivada em células CHO11.1 (ver Figura 5).

d Determinação de UFP detectadas nas monocamadas de células BHK transfectadas com os RNAs dos plasmídeos indicados utilizando "Lipofectin™"

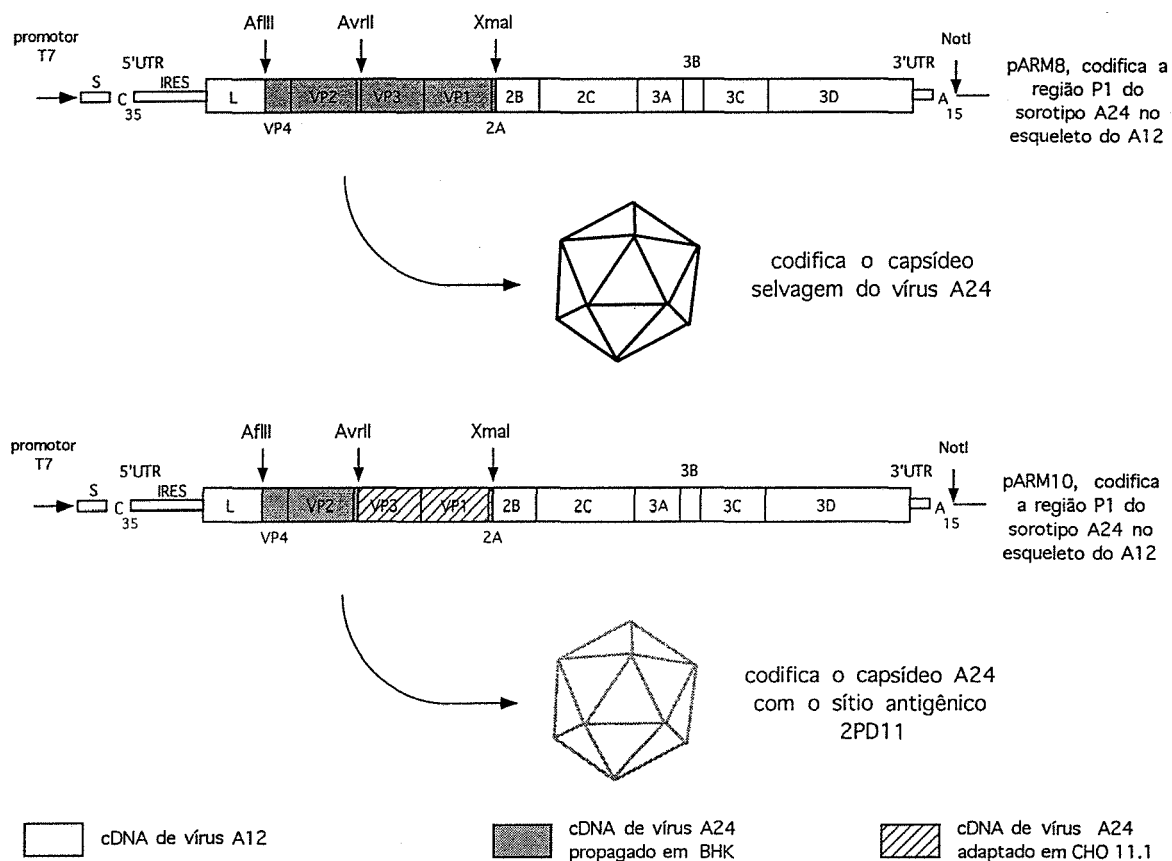
posteriormente clonado em um plasmídeo derivado do pRM35 (A12), utilizando-se o sítio da enzima de restrição *Afl* II natural na região L e o sítio *Xma* I adicionado no final da região 2A (Figura 6). Os plasmídeos obtidos nesta etapa de clonagem foram avaliados para confirmar a inserção do fragmento P1 do A24 pela análise da aquisição do sítio de restrição *Avr* II, específico do A24 (Figura 6).

Foram obtidos alguns clones com o mapa de restrição esperado e foram selecionados apenas dois para trabalhar. Um cDNA FLC com o fragmento P1A24 derivado apenas do vírus cultivado em células BHK (pARM8) e o outro cDNA FLC com o fragmento P1 derivado de células BHK e CHO11.1 (pARM10), o qual continha o sítio antigênico necessário para a propagação em células CHO11.1 foram selecionados (Figura 7).

Testes de transcritos de RNAs dos pARM8 e pARM10 confirmaram que os seus cDNAs foram viáveis, uma vez que essas transcrições mostraram uma infectividade específica alta (Tabela 6). Evidências posteriores mostrando que estes cDNA foram realmente viáveis foram obtidas dos estudos de caracterização morfológica das placas formadas por estes vírus. As placas formadas pelos pARM8 e pARM10 foram similares para cada transcrito e foram indistinguíveis entre eles.

Desde que estes cDNAs apresentaram as propriedades corretas para a produção de vacinas, grandes quantidades de RNA foram transfectadas nas células por eletroporação e os vírus estoques marcados radioativamente e não marcados foram produzidos. Os vírus estoques não marcados foram cultivados por 2 passagens em células BHK e em seguida, expandidos para uma grande preparação que foi utilizada como fonte de vírus purificado pelo gradiente contínuo de sacarose (Figura 8). A quantidade de vírus recuperada

Figura 7: Representação esquemática dos vírus A24 quiméricos



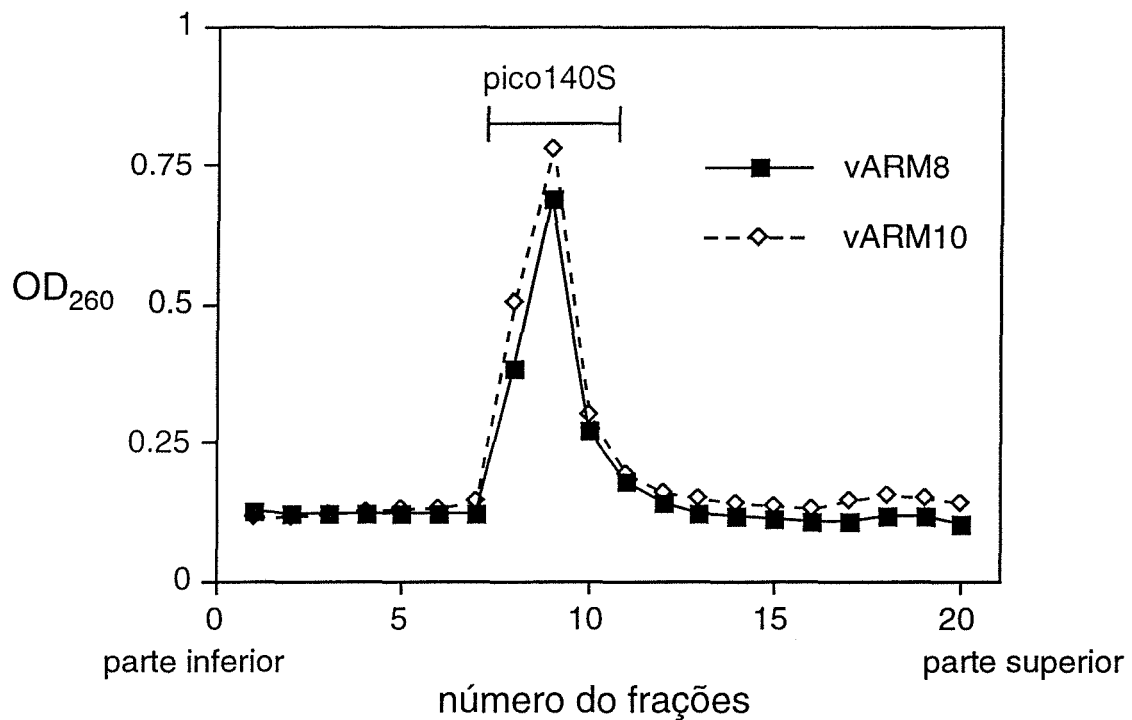
Ver legenda da Figura 1.

Tabela 6: Características de RNAs sintéticos contendo a região P1 do vírus A24 no genoma do vírus A12 na monocamada de células BHK, transfectadas pelo uso de "Lipofectin™"

Fonte de RNA	Infectividade específica (UFP/ μ g) ^c
pARM8 ^a	575.000
pARM10 ^b	775.000

- a cDNA FLC do vírus contendo a região P1/2A do vírus A24 cultivado em células BHK.
- b cDNA FLC do vírus contendo a região P1/2A do vírus A24 cultivado em células CHO11.1.
- c Determinação de UFP detectadas nas monocamadas de células BHK transfectadas com os RNAs dos plasmídeos indicados utilizando "Lipofectin™".

Figura 8: Perfis dos gradientes de densidade de sacarose dos vARM8 e vARM10



Perfis de A₂₆₀ dos gradientes de densidade de sacarose preparados dos vírus quiméricos derivados dos vírus propagados em células BHK (vARM8) e adaptados em células CHO11.1 (vARM10), utilizando condições padrões de crescimento seguido pela precipitação com PEG, antes da centrifugação no gradiente contínuo de sacarose como descrito por BAXT *et al.* (1984). O pico da fração 9 corresponde a sedimentação das partículas virais 140 S.

no gradiente de sacarose mostrada na Figura 7 corresponde a uma produção de 85 µg do vARM8 e 95 µg do vARM10 purificado a partir de 2×10^8 células BHK.

3.1.3 Avaliação dos vírus ARM8 e ARM10

3.1.3.1 Caracterização antigênica

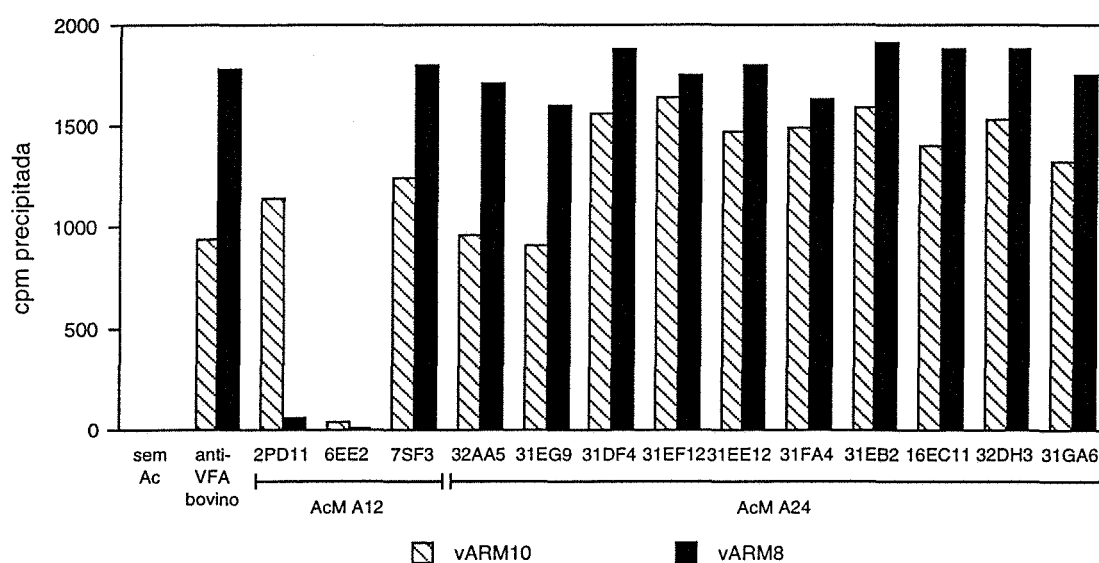
Com o objetivo de se verificar a autenticidade dos vírus quiméricos, preparações dos vírus vARM8 e vARM10 marcados radioativamente, purificados a partir de células BHK eletroporadas foram testadas com o painel de anticorpos monoclonais utilizado na Figura 4. Os resultados mostrados na Figura 9 confirmam a autenticidade dos vírus vARM8 e vARM10 derivados geneticamente. Especificamente, os vírus sintéticos mostraram o mesmo perfil antigênico dos vírus utilizados como fontes dos cDNAs FL (Figura 4).

3.1.3.2 Caracterização genética

Para determinar as características genéticas destes 2 vírus, os cDNAs FLC pARM8 e pARM10 utilizados na sua produção foram sequenciados.

Toda a região P1/2A do pARM8, estendendo-se do sítio da enzima de restrição *Afl* II até o sítio da enzima de restrição *Xma* I (Figura 7) foi sequenciada, utilizando-se uma estratégia de sequenciamento baseada no uso de oligonucleotídeos na fita senso ou antisenso em toda a região P1. A seqüência

Figura 9: Reatividade dos vírus quiméricos vARM8 e vARM10, os quais expressam capsídeos do tipo A24 Cruzeiro, com diferentes AcM



Quantidades iguais de vírus purificados no gradiente de sacarose, radioativamente marcados, foram reagidos com AcM e a quantidade de radioatividade precipitada por *S. aureus* foi determinada como descrito (ver Métodos). Sem Ac indica nenhuma adição de anticorpos na reação; anti-VFA bovino refere ao soro convalescente de um bovino inoculado com múltiplos sorotipos de VFA; 7SF3, AcM específico no reconhecimento da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 2PD11 e 6EE2, AcM específicos no reconhecimento de um epítipo fora da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 32AA5, 31DF4, e 16EC11, AcM específicos no reconhecimento de epítipos presentes na região VP1 no vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994); 31EG9, 31EF12, 31EE12, 31FA4, 31EB2, 32DH3, e 31GA6, AcM conformacionais específicos do vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994).

de nucleotídeos deste plasmídeo foi comparada com a seqüência da cepa A24 Cruzeiro (ano desconhecido), proveniente de Pirbright (Pir) (ABRAMS, C.C., dados não publicados) (Figura 10). Na Figura 10 foram detectadas diferenças entre o pARM8 e a seqüência Pir3, sendo 3 diferenças na região VP4, 4 diferenças na região VP2, 3 diferenças na região VP3 e 4 diferenças na região VP1. A única diferença detectada entre o pARM8 e a seqüência Pir na região 2A correspondeu à substituição intencional introduzida como parte do sítio da enzima de restrição *Xma* I codificado pelo oligo P191 (Figura 10). Das 15 diferenças detectadas na seqüência de nucleotídeos entre o pARM8 e a seqüência Pir, apenas 5 resultaram na mudança predizível de aminoácidos (Figura 11).

Uma vez que o pARM10 contem a região entre o sítio da enzima de restrição *Afl* II e o sítio da enzima de restrição *Avr* II do pARM8 (ambos os pARM8 e pARM10 foram derivados do plasmídeo S48, o qual contem o fragmento *Avr*II derivado do vírus crescido em células BHK; Figuras 5, 6 e 7), apenas a região *Avr* II → *Xma* I foi sequenciada. As diferenças de nucleotídeos entre o pARM8 e pARM10 foram em número de 4, sendo uma na região VP3 e 3 na região VP1 (Figura 10). Seqüências de aminoácidos deduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos destes 2 plasmídeos revelaram apenas 2 diferenças: no pARM8, o códon 56 em VP1 = A; no pARM10, o códon 56 em VP1 = T; no pARM8, o códon 99 em VP1 = L e no pARM10, o códon 99 em VP1 = W (Figura 11). Desde que os vírus derivados destes 2 plasmídeos diferenciaram na sua habilidade para reagir com o AcM 2PD11, estes dados de sequenciamento sugerem que o epitopo pode incluir um ou ambos os resíduos em VP1. A Figura 12 mostra a representação estrutural do VFA tipo O1, com os resíduos 56 e 99 da proteína VP1 representados em

Figura 10: Alinhamento de dados de seqüência determinados para a região P1/2A do pARM8, dados de seqüência determinados para a porção P1/2A entre o sítio Avr II e o final da região 2A do pARM10 e a seqüência do cDNA P1/2A do vírus A24 proveniente do laboratório de Pirbright (Pir)

	VP4->	
pARM8	GGGGCCGGGCAATCCAGTCCGGCGACCGGCTCGCAGAACCAATCTGGCAACACTGGCAGC	0060
PirA.....	
	NcoI	
pARM8	ATAATTAACAACACTACTACATGCAGCAATACCAGAACTCCATGGACACACAGTTGGGAGAC	0120
Pir	
pARM8	AATGCCATCAGTGGAGGTTCCAACGAGGGCTCCACGGACACAACCTTCAACACACACAACC	0180
PirC.....	
pARM8	AACACTCAAACAATGACTGGTTCTCGAAGCTCGCCAGTTCAGCTTTTACCGGTCTGTTC	0240
Pir	
	VP2->	
pARM8	GGTGCCTGATCGCCGACAAGAAGACAGAGGAAACGACACTTCTTGAGGACCGCATCCTC	0300
PirC.....T.....	
pARM8	ACCACCCGCAACGGGCACACCACCTCGACGACCCAATCGAGTGTGGGTGTCCACACACGGG	0360
Pir	
pARM8	TACTCCACAGAGGAGGACCACGTTGCTGGGCCAACACATCGGGCCTGGAGACGCGAGTG	0420
PirG.....	
pARM8	GTGCAGGCAGAGAGATTCTACAAAAAGTACTTGTITGACTGGACAACGGACAAGGCATTT	0480
Pir	
	SstI	
pARM8	GGACACCTGGAAAAGCTGGAGCTCCCGTCCGACCACCACGGTGTCTTTGGACACTTGGTG	0540
Pir	
pARM8	GATTTCGTACGCCCTATATGAGAAATGGCTGGGATGTTGAGGTGTCCGCTGTTGGCAACCAG	0600
PirA	
	NcoI	
pARM8	TTCAACGGCGGGTGCCTCCTGGTGGCCATGGTACCTGAATGGAAGGAATTTGACACACGG	0660
Pir	
pARM8	GAGAAATACCAACTCACCCCTTTTCCCGCACCAGTTTATTAGCCCCAGAACTAACATGACT	0720
Pir	
pARM8	GCCCACATCACGGTCCCTACCTTGGTGTGAACAGGTATGATCAGTACAAGAAGCATAAG	0780
Pir	

Figura 10 (Continuação)

pARM8	CCCTGGACATTGGTTGTCATGGTCGTGTCGCCACTTACGGTCAACAACACTAGTGCCGCA	0840
Pir	
pARM8	CAAATCAAGGTCTACGCCAACATAGCTCCGACCTATGTTACGTTGGCCGGTGAACCTCCCC	0900
PirT...	
	VP3->	
pARM8	TCGAAAGAGGGGATTTTCCCGTTGCATGTGCGGACGGTTACGGAGGATTGGTGACGACA	0960
PirG.....	
	AvrII	
pARM8	GACCCGAAGACAGCTGACCCCTGCTTATGGCAAGGTGTACAACCCGCCCTAGGACTAACTAC	1020
Pir	
pARM10	
pARM8	CCTGGGCGCTTCACCAACCTGTTGGACGTGGCCGAAGCGTGTCCCACTTTCCTCTGCTTT	1080
Pir	
pARM10	
pARM8	GACGACGGGAAACCGTACGTACCCACGCGGACGGATGACACCCGACTTTTGGCCAAGTTT	1140
Pir	
pARM10	
pARM8	GACCTTTCCTTTGCCGCAAAACATATGTCCAACACATACCTGTCAGGGATTGCTCAGTAC	1200
Pir	
pARM10	
pARM8	TACACACAGTACTCTGGCACCATCAATTTGCATTTTCATGTTTACAGGTTCCACTGATTCA	1260
PirC.....	
pARM10C.....	
pARM8	AAGGCCCGATACATGGTGGCCTACATCCCACCTGGGGTGGAGACACCACCGGACACACCT	1320
Pir	
pARM10	
pARM8	GAAAGGGCTGCCCACTGCATTACGCTGAATGGGACACTGGACTAAACTCCAAATTCACT	1380
Pir	
pARM10	
	SacII	
pARM8	TTCTCAATCCCGTACGTATCCGCGCGGATTACGCGTACACAGCGTCTGACACGGCAGAA	1440
PirT.....	
pARM10	
pARM8	ACAATCAACGTACAGGGATGGGTCTGCATCTACCAAATTACACACGGGAAGGCTGAAAAT	1500
Pir	
pARM10	
pARM8	GACACCTTGGTTCGTGTCGGTTAGCGCCGGCAAAGACTTTGAGTTGCGCCTCCCGATTGAC	1560
Pir	
pARM10	

Figura 10 (Continuação)

	VP1->	
pARM8	CCCCGCCAGCAGACCACCGCTACCGGGGAATCAGCAGACCCGGTCACCACCACCGTGGAG	1620
PirGA.....	
pARM10	
pARM8	AACTACGGCGGTGAGACACAAATCCAGAGACGTCACCACACGGACATTGGTTTCATCATG	1680
Pir	
pARM10	
pARM8	GACAGATTTGTGAAGATCCAAAGCTTGAGCCCAACACATGTCATTGACCTCATGCAGGCT	1740
PirA..	
pARM10A..	
pARM8	CACCAACACGGTCTGGTGGGTGCCTTGCTGCGTGCAGCCACGTACTACTTTTCTGACCTG	1800
Pir	
pARM10	
pARM8	GAAATTTGTTGTACGGCACGAAGGCAATCTGACCTGGGTGCCCAACGGCGCCCCTGAATCA	1860
Pir	
pARM10	
pARM8	GCCCTGTTGAACACCAGCAACCCCACTGCCTACAACAAGGCACCATTTCACGAGACTCGCT	1920
Pir	
pARM10G.....	
pARM8	CTCCCCTACACTGCGCCGCACCGTGTGCTGGCAACAGTGTACAACGGGACGAGTAAGTAT	1980
Pir	
pARM10C.....	
pARM8	GCTGTGGGTGGTTTCAGGCAGAAGAGGGCAGCATGGGGTCTCTCGCGGCGGAGTCGTGAAA	2040
Pir	
pARM10	
pARM8	CAGCTTCCTGCTTCATTTAACTACGGTGCATCAAGGCCGACGCCATCCACGAACCTCTC	2100
Pir	
pARM10	
	SstI	
pARM8	GTGCGCATGAAACGGGCGGAGCTCTACTGCCCCAGACCGCTGTTGGCAATAGAGGTGTCT	2160
PirC.....	
pARM10	
	2A->	
pARM8	TGC AAGACAGGCACAAGCAAAGATCATTGCACCAGCAAAGCAGCTTCTGAATTTTGAC	2220
Pir	
pARM10	

Figura 10 (Continuação)

	XmaI	
pARM8	CTGCTCAAGTTGGCCGGAGACGTTGAGTCCAAC <u>CCCCGGG</u>	2259
PirT...	
pARM10	
P191	

A numeração inicia com o primeiro nucleotídeo codificador da proteína VP4. As posições do início das regiões codificadoras para cada um dos peptídeos maduros são mostradas acima da seqüência do pARM8. Sítios de endonucleases de restrição são listados acima da seqüência do pARM8 e os seus sítios de reconhecimento estão sublinhados. A porção do oligo antisense P191 é mostrada abaixo da seqüência 2A. Identidade com a seqüência do pARM8 é indicada por ".".

Figura 11: Alinhamento dos dados de seqüência de aminoácidos predizíveis determinados para a região P1/2A do pARM8, dos dados de seqüência de aminoácidos predizíveis determinados para a porção P1/2A entre o sítio Avr II e o final da região 2A do pARM10 e os dados de seqüência de aminoácidos predizíveis determinados para o cDNA P1/2A do vírus A24 proveniente do laboratório de Pirbright (Pir)

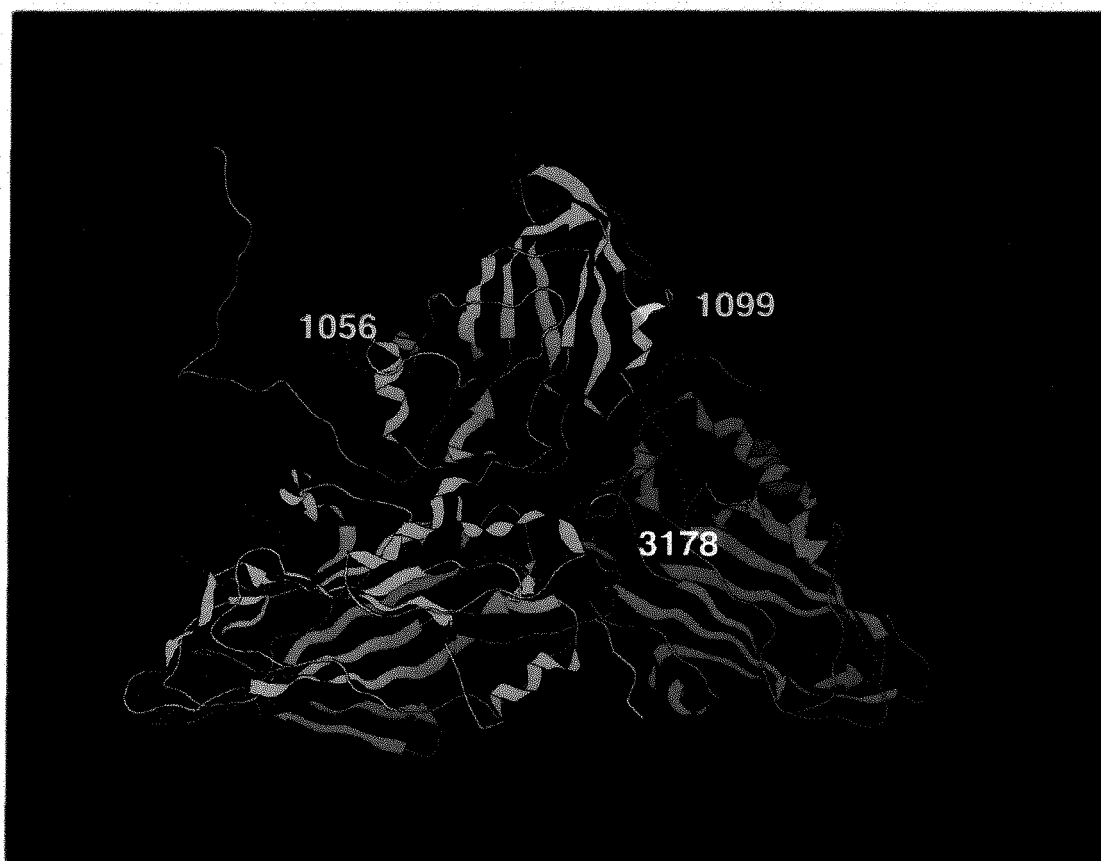
	VP4->		
pARM8	GAGQSSPATGSONQSGNIGSIIINNYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNEGSTDITSTHTT	4060	
PirS.....		
	VP2->		
pARM8	NTQNNDWFSKCLASSAFTGLFGALIAADKKTEETTLLEDRIILITRNIGHTTSTTQSSVGVTHG	2035	
PirL.....M.....		
pARM8	YSTEEDHVAGPNTSGLETRNVQAERFYKKYLFDWITDKAFGHLEKLELPSDHHGVFGHLV	2095	
Pir		
pARM8	DSYAYMRNGWDVEVSAVGNQFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRINMT	2155	
Pir		
pARM8	AHITVPYLGVNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVNNTSAAQIKVYANIAPTIVHVAGELP	2215	
Pir		
	VP3->		
pARM8	SKEGIFPVACADGYGGLVITDPKTADPAYGKVVNPPRTINYPGRF*INLLDVAEACPTFLCF	3057	
Pir		
pARM10		
pARM8	DDGKPYVITRITDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQYYTQYSGTINLHFMFTGSTDS	3117	
Pir		
pARM10		
pARM8	KARYMVAYIPPGVETPPDTPERAHCIIAEWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAE	3177	
Pir		
pARM10		
	VP1->		
pARM8	TINVQGWCTYQITHGKAENDTLVSVSAGKDFELRLPIDPRQQT*ATGESADPVTITVE	1016	
PirT.....		
pARM10		
pARM8	NYGGETQIQRRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGLLRAATYYFSDL	1076	
PirT.....		
pARM10T.....		
pARM8	EIVVRHEGNLITWPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRVLATVYNGTSKY	1136	
Pir		
pARM10W.....		

Figura 11 (Continuação)

pARM8	AVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHELLVRMKRAELYCPRPLLAIEVS	1196
Pir	
pARM10	
	2A->	
pARM8	SQDRHKQKTIAPAKQLLNFDLLKLAGDVESNPG	2A018
Pir	
pARM10	

A numeração inicia com o primeiro aminoácido da proteína VP4. As posições do início das regiões codificadoras para cada um dos peptídeos maduros são mostradas acima da seqüência do pARM8. Os números localizados à direita correspondem a um polipeptídeo individual (p.e., 1= VP1, 2= VP2, 3= VP3, 4= VP4), seguido pela posição neste peptídeo (p.e., 4060= posição 60 em VP4). Identidade com a seqüência do pARM8 é indicada por ".".

Figura 12: Posições dos resíduos dos aminoácidos 56 e 99 em VP1 e 178 em VP3 no protômero do VFA sorotipo O1



VP1 está representada em azul claro, VP2 está representada em verde e VP3 está representada em lilás. VP4, a qual não se encontra exposta na superfície do vírion, tem sido deletada para maior clareza. O resíduo 178 de VP3 (3178) é mostrado em branco, e os resíduos 56 e 99 de VP1 (1056 e 1099) são mostrados em amarelo. A figura foi produzida com as coordenadas 3° da forma reduzida do VFA sorotipo O1 ("Brookhaven National Laboratory, Protein Database" Arquivo número "1FOD"; Logan et al., 1993) utilizando o programa "MolView" 1.3 (Smith, 1995).

amarelo e o resíduo 178 da proteína VP3, o qual tem sido implicado como parte do epitopo 2PD11 no vírus tipo A12 (BAXT *et al.*, 1989; RIEDER *et al.*, 1996), representado em branco.

3.1.3.3 Caracterização patogênica

3.1.3.3.1 Infecção de suínos com o vARM8

Cinco suínos (26, 28, 29, 30 e 31) foram mantidos em um mesmo ambiente e dois deles foram inoculados com 0,5 ou 0,05 μg de vARM8 vivo purificado no gradiente contínuo de sacarose.

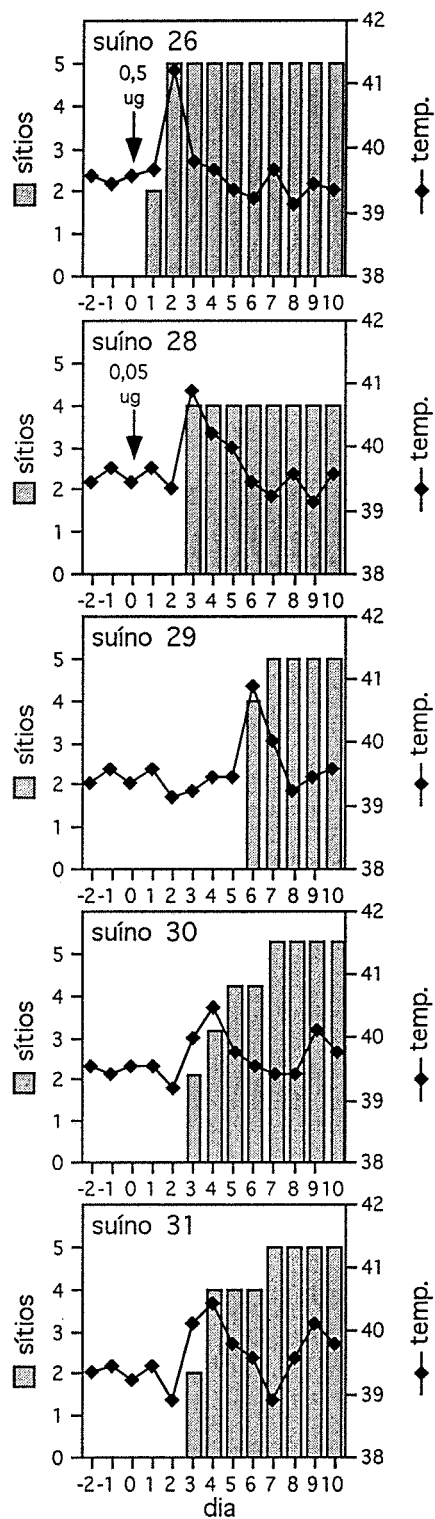
O animal 26 inoculado com 0,5 μg do vírus apresentou lesões em 2 sítios diferentes (para este experimento, foram definidos sítios como cada pata e área do nariz/boca totalizando 5 pontos; Figura 13) no primeiro dia pós-inoculação (d.p.i.). Até o final do experimento, lesões de 1 a 2 cm de diâmetro foram detectadas em todas as patas, no nariz e na boca.

O animal 28 inoculado com 0,05 μg do vírus apresentou lesões em todas as patas, mas não na boca ou nariz a partir do 3º d.p.i. (Figuras 13 e 14).

Todos os 3 animais não inoculados, animais 29, 30 e 31 mostraram sinais da doença do 3º ao 6º d.p.i. (Figura 13) e até o final do experimento, foram verificadas lesões em todos os sítios, com uma doença severa indistinguível da apresentada pelo animal 28.

Todos os 5 animais mostraram uma temperatura elevada no 1º ou 2º dia depois do aparecimento das lesões (Figura 13).

Figura 13: Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM8



Dos 5 animais mantidos no mesmo ambiente, 2 foram inoculados com vARM8 (ver Métodos; neste experimento, o título de vARM8 utilizado revelou uma infectividade específica de 420.000 ufp/ μ g). As barras representam o número de sítios anatômicos (cada pata e cada área do nariz/boca; um número total de 5), nos quais as vesículas foram detectadas. As linhas representam as temperaturas retais.

Figura 14: Fotografias das patas dos suínos infectados com o vARM8 (Painel A) ou com vARM10 (Painel B)

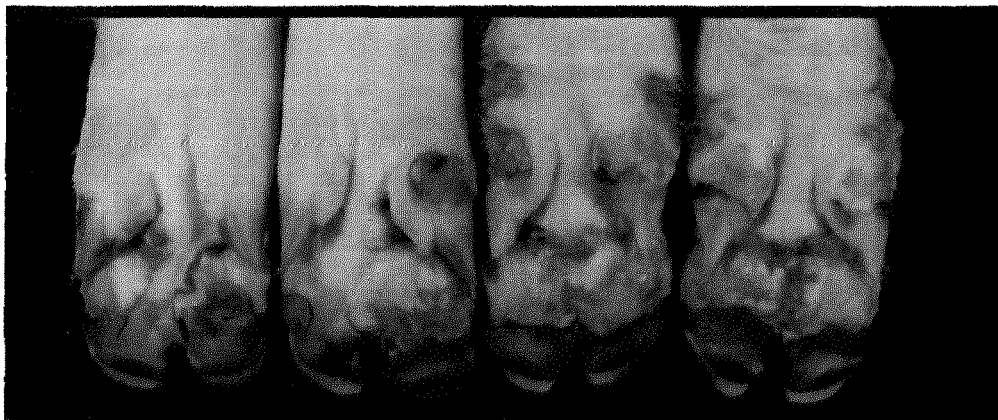
Painel A: Suíno 28

PED PDD PET PDT



Painel B: Suíno 603

PED PDD PET PDT



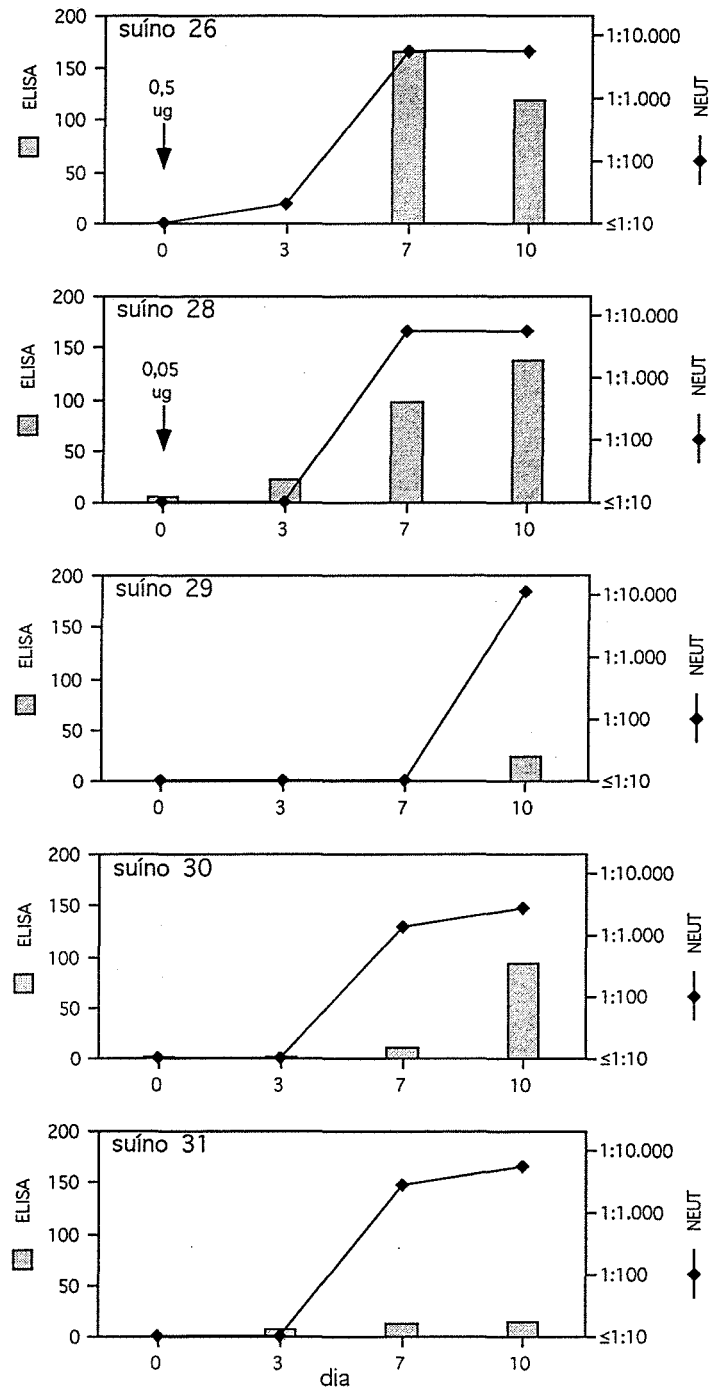
Painel A: fotografia das patas do suíno 28 aos 10 dias, após ter sido inoculado com 0,05 μ g de vARM8. Painel B: fotografia das patas do suíno 603 aos 10 dias, após ter sido inoculado com 0,05 μ g de vARM10. Abreviaturas: PED, pata esquerda dianteira; PDD, pata direita dianteira; PET, pata esquerda traseira; PDT, pata direita traseira.

O sangue dos animais coletados nos 3° e 7° d.p.i. foram titulados em células BHK para detecção de unidades formadoras de placas (ufp). Das 10 amostras analisadas, vírus foi apenas detectado no 3° d.p.i. nas amostras 28 ($2,7 \times 10^7$ ufp/ml), 30 ($3,5 \times 10^2$ ufp/ml) e 31 ($7,5 \times 10^2$ ufp/ml). A ausência do vírus no sangue do suíno 26 no 3° d.p.i. e a ausência em todas as outras amostras coletadas no 7° d.p.i., sugere que o aparecimento do vírus foi transitório, entretanto, não se teve certeza do tempo exato do curso do aparecimento do vírus na corrente sangüínea.

Os soros destes animais foram testados contra a presença de anticorpos neutralizantes (NEUT) e anticorpos dirigidos contra 3 ABC Δ detectados por ELISA. Exceto o suíno 29, todos os outros animais mostraram significantes títulos de anticorpos neutralizantes no dia 7. O animal 29 foi o que desenvolveu título mais alto de anticorpos (PRN50 de 1:10.240; Figura 15) até o dia da necrópsia. As leituras de ELISA contra 3ABC Δ obtidas com o soro dos animais inoculados (suínos 26 e 28) foram mais altos do que as leituras obtidas com os soros dos animais não inoculados (suínos 29 e 31; Figura 15). O suíno 30 não inoculado também apresentou uma resposta positiva para 3ABC Δ no dia 10 (Figura 15).

Os resultados desses experimentos demonstraram que o vARM8 produzido por engenharia genética mostrou uma alta virulência em suínos.

Figura 15: Títulos de anticorpos neutralizantes (NEUT) e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM8.



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada no dia 0. As barras representam os resultados de ELISA para a proteína 3ABCΔ determinados no soro pré-imune (mostrado no dia 0) e soros coletados nos dias 3, 7 e 10 (ver Métodos), expressados em % do controle positivo. As linhas representam os títulos de NEUT nos soros coletados nos dias 0, 3, 7 e 10. Os valores mostram a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 50 % (ver Métodos).

3.1.3.3.2 Infecção de suínos com o vARM10

Cinco suínos (600, 603, 605, 611 e 613) foram mantidos em um mesmo ambiente e dois deles foram inoculados com 0,5 ou 0,05 μg de vARM10 vivo purificado no gradiente contínuo de sacarose.

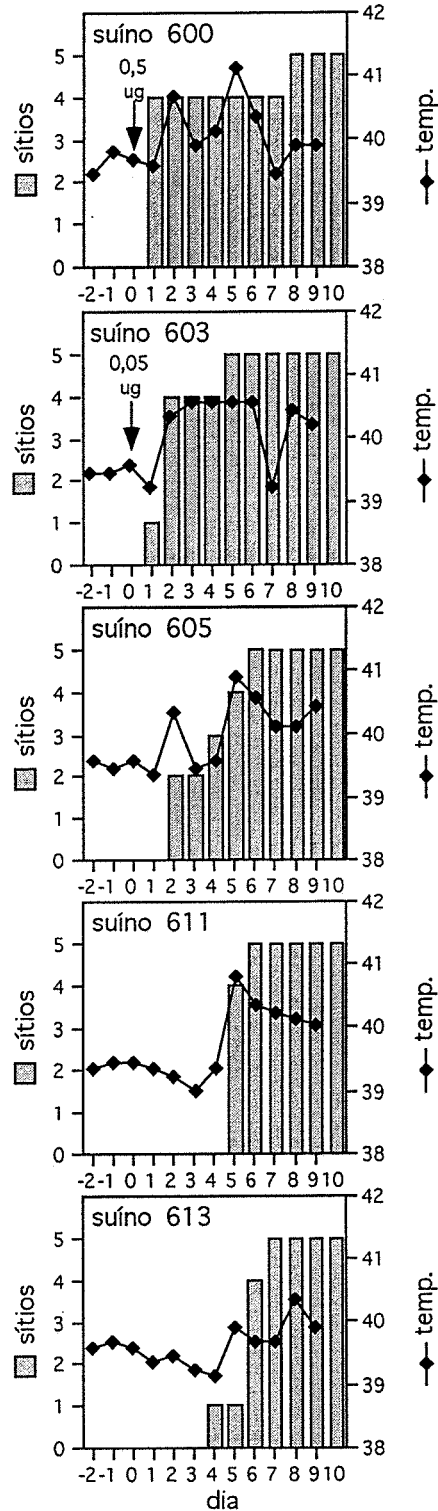
O animal 600, inoculado com 0,5 μg do vírus, e o animal 603, inoculado com 0,05 μg do vírus, apresentaram sinais da doença em 1 a 4 sítios (para este experimento, sítios foram definidos como cada pata e área do nariz/boca totalizando 5 pontos, Figura 16) já no primeiro dia após inoculação. Até o final do experimento, eles desenvolveram lesões no nariz, na boca, em todas as patas estendendo-se através de toda a banda coronária e em geral a sola de quase todas as patas apresentaram erupções (suíno 603; Figura 14). O animal 603 desenvolveu uma vesícula de 3 cm de comprimento e 1 cm de largura no dorso do nariz.

Todos os 3 animais não inoculados, animais 605, 611 e 613 mostraram sinais da doença do 2º ao 5º d.p.i. (Figura 16). Até o final do experimento, eles desenvolveram lesões em todos os sítios apresentando uma doença severa indistinguível do animal 603.

Exceto o animal 613, todos os outros 4 animais mostraram uma temperatura elevada no 1º ou 2º dia depois do aparecimento das vesículas (Figura 16).

O sangue dos animais coletados nos 3º e 7º d.p.i. foram titulados em células BHK. Nas 10 amostras analisadas, vírus foi detectado apenas no 3º d.p.i. nas amostras 600 ($2,5 \times 10^2$ ufp/ml), 603 ($1,8 \times 10^3$ ufp/ml) e 605 ($5 \times$

Figura 16: Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM10



Dos 5 animais mantidos no mesmo ambiente, 2 foram inoculados com vARM10 (ver Métodos; neste experimento, o título de vARM10 utilizado revelou uma infectividade específica de 1.000.000 ufp/μg). As barras representam o número de sítios anatômicos (cada pata e cada área do nariz/boca; um número total de 5), nos quais as vesículas foram detectadas. As linhas representam as temperaturas retais.

10¹ ufp/ml). Estes dados suportam a conclusão sobre a viremia transitória proposta anteriormente.

Os soros destes animais foram testados contra a presença de anticorpos neutralizantes e anticorpos dirigidos contra 3 ABCΔ detectados por ELISA. Todos os animais apresentaram títulos de NEUT variando de 1:40 a 1:160 no dia 7 (Figura 17). No dia 10, os suínos não inoculados (611 e 613) foram os que mostraram títulos mais altos de anticorpos neutralizantes (PRN50 de 1:520 para ambos; Figura 17). As leituras de ELISA contra 3ABCΔ obtidas com o soro dos animais inoculados (suínos 600 e 603) no dia 10 foram mais altas do que as leituras obtidas com o soro dos animais não inoculados (605, 611 e 613; Figura 17).

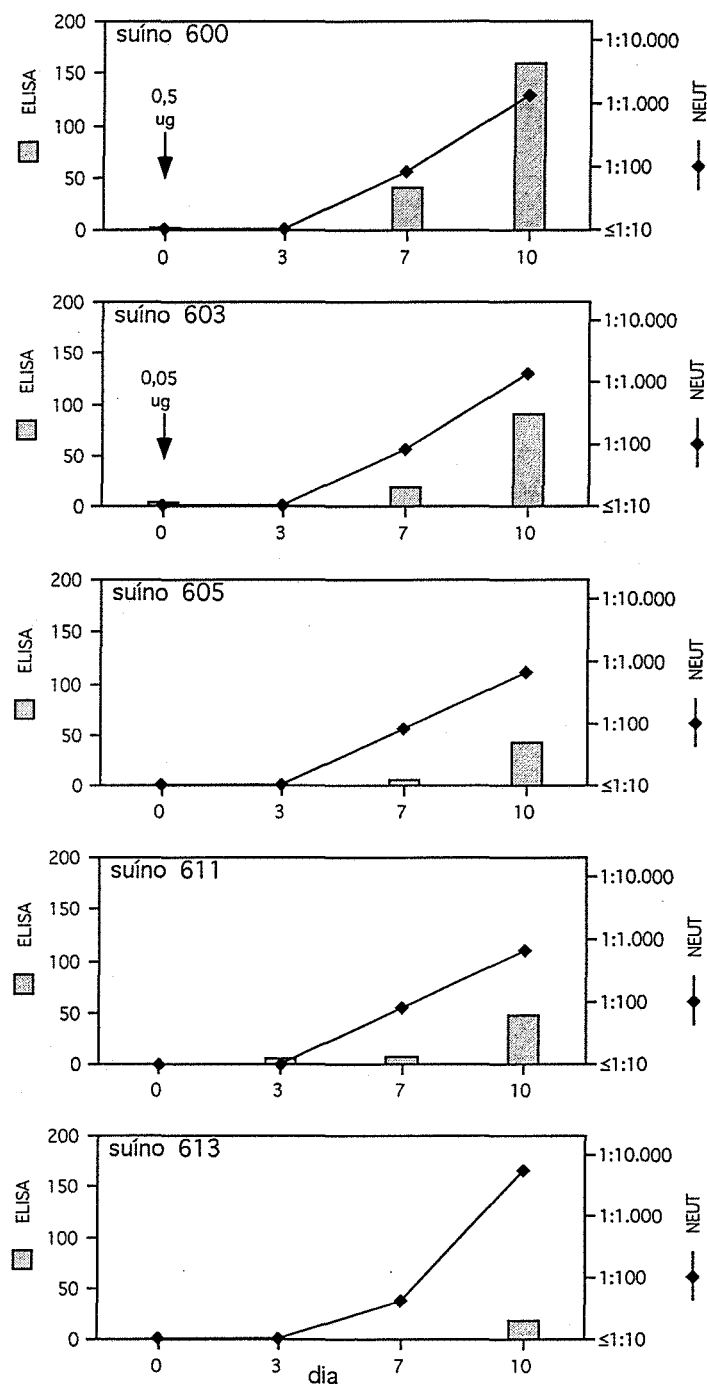
3.2 PRODUÇÃO DO VÍRUS A24 ATENUADO

3.2.1 Produção do vírus A24 deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD a partir do vARM10

3.2.1.1 Construção do plasmídeo mutante pARM10-RGD-

O plasmídeo deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD foi construído utilizando-se a técnica de sobreposição de mutações introduzidas por PCR (HIGUCHI *et al.*, 1988). Primeiramente, amplificou-se o pAM46 com o oligo P207 (GCC CAC TGC ATT CAC GCT) e o oligo antisense P227 (AGG GAT CCG GGG TTC GAA CCA CCC ACA GCA TA), que codificou a deleção dos códons 142 a 147 na região codificadora de VP1 e os sítios das

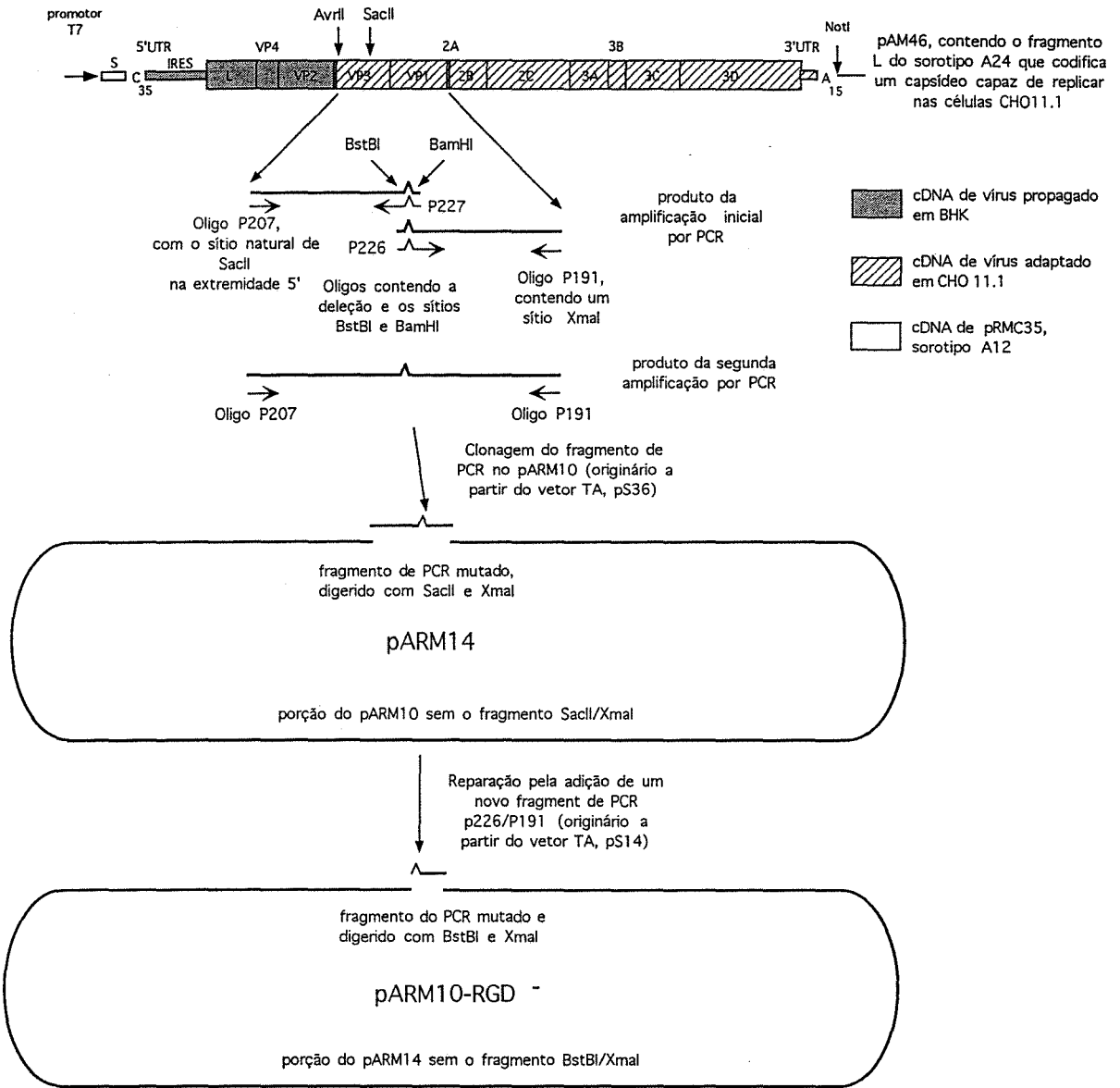
Figura 17: Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM10



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada no dia 0. As barras representam os resultados de ELISA para a proteína 3ABCΔ determinados no soro pré-imune (mostrado no dia 0) e soros coletados nos dias 3, 7 e 10 (ver Métodos), expressados em % do controle positivo. As linhas representam os títulos de NEUT nos soros coletados nos dias 0, 3, 7 e 10. Os valores mostram a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 50 % (ver Métodos).

enzimas de restrição *Bst* BI/*Bam* HI (Figura 18), por 15 ciclos de 30 seg./94 °C, 30 seg./55 °C, 30 seg./72 °C e uma incubação por 10 min./72 °C, produzindo um fragmento de 690 pb (Figura 18). Em seguida, o pAM46 foi também amplificado com os oligos P191 e o oligo senso P226 (GGT TCG AAC CCC GGA TCC CTA GCG GCG CGA GTC GTG), que codificou a mesma deleção citada acima e os mesmos sítios das enzimas de restrição, produzindo um fragmento de 270 pb (Figura 18). Os dois fragmentos foram purificados do gel de poliacrilamida, agrupados e amplificados com os oligos P191/P207, primeiramente por uma incubação a 5 min./94 °C, 15 ciclos de 30 seg./94 °C, 30 seg./55 °C, 30 seg./72 °C e em seguida 2 incubações por 10 min./72 °C, originando um fragmento de 940 pb (Figura 18). Este fragmento foi clonado no vetor TA (INVITROGEN) originando o plasmídeo S36, o qual foi digerido com *Bst* BI e *Bam* HI para verificar a presença da deleção. Em seguida, o pS36 foi digerido com as enzimas *Sac* II/*Xma* I, produzindo um fragmento de 840 pb. Este fragmento foi clonado no pARM10 contendo os sítios equivalentes das mesmas enzimas de restrição (Figura 18). O plasmídeo resultante, pARM14, foi incapaz de produzir vírus, e análises de seqüências revelaram a deleção esperada da região codificadora dos aminoácidos RGD e uma deleção adicional de um único nucleotídeo no códon 153 na região codificadora de VP1 (Figura 18). Para corrigir esta última mutação entre os sítios *Bst* BI/*Bam* HI, foi amplificado um novo fragmento de cDNA a partir do pAM46, utilizando-se os oligos P226/P191 e em seguida, ligado a um vetor TA, produzindo o pS14. O pS14 foi sequenciado para confirmar os sítios de clonagem e a deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD. Em seguida, este plasmídeo foi digerido com as enzimas *Bst* BI/*Xma* I, produzindo

Figura 18: Representação esquemática da construção do pARM10-RGD⁻



seqüência de pARM10	nuc 1981 of pARM10	GCT GTG GGT GGT TCA GGC AGA AGA GGC GAC ATG GGG TCT CTC GCG GCG CGA		
	códon 1137 de VP1	CGA CAC CCA CCA AGT CCG TCT TCT CCG CTG TAC CCC AGA GAG CGC CGC GCT		
seqüência de oligonucleotídeos	P227 (3'→5')	ATACGA CAC CCA CCA AGc	ttg ggg	Cct Agg GA
	P226 (5'→3')	GGT TCg	aac ccc	GGa Tcc Cta GCG GCG CGA GTCGTG
seqüência de pARM10-RGD ⁻			BstBI	BamHI
		GCT GTG GGT GGT TCG	AAC CCC	GGA TCC CTA GCG GCG CGA
		CGA CAC CCA CCA AGC	TTG GGG	CCT AGG GAT CGC CGC GCT
	A V G G S	N P	G S L A A R	*

* indica deleção gratuita detectada no pARM14

Ver legenda da Figura 1.

um fragmento de 270 pb, o qual foi inserido no pARM14 digerido com as mesmas enzimas, produzindo assim o pARM10-RGD⁻ (Figura 18).

3.2.1.2 Recuperação do vírus vivo e caracterização *in vitro*

RNAs sintéticos produzidos a partir do pARM10-RGD⁻ foram comparados ao RNAs do pARM10 pela transfecção por "Lipofectin™" em células BHK. Vírus recuperados a partir das células transformadas com estes RNAs foram testados para comprovar sua habilidade de crescer em diferentes linhagens de células (Tabela 7). Os resultados destes ensaios indicaram que o receptor celular normal do vARM10-RGD⁻ foi removido, mas que este vírus foi ainda capaz de crescer nas células CHO11.1. Além disso, estes estudos confirmaram que a replicação do vírus foi dependente da presença do receptor derivado do AcM 2PD11, desde que o vARM10-RGD⁻ não pode crescer nas células CHO normais (Tabela 7).

Desde que o cDNA FLC do pARM10-RGD⁻ apresentou as propriedades esperadas para a especificidade do receptor (crescimento limitado em células CHO11.1), este clone foi selecionado para posterior caracterização. Assim, uma grande quantidade de RNA foi transfectada nas células BHK por eletroporação e os estoques de vírus não marcados e marcados radioativamente foram produzidos.

Para examinar as proteínas produzidas pelos vírus, foi feita uma radioimunoprecipitação (RIP) dos extratos de células eletroporadas marcadas radioativamente. As células BHK transformadas com ambos os RNAs produziram as proteínas esperadas para o vírus A24, embora apresentasse uma

Tabela 7: Habilidade de formação de placas do WT-A24 (vARM10) e do VFA deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD (vARM10-RGD⁻), em diferentes culturas de células

Vírus	Habilidade de formação de placas na linhagem de célula indicada ^c		
	BHK	CHO (WT)	CHO11.1
vARM10 ^a	2 x 10 ⁵	0	1,4 x 10 ⁴
vARM10-RGD ^{-b}	0	0	1,9 x 10 ³

a Vírus A24 WT.

b Vírus A24 contendo a deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD.

c Títulos determinados pela coloração das monocamadas de células a 72 horas após a infecção.

diferença na migração de uma das proteínas do capsídeo, presumivelmente VP1 (Figura 19). Análises da reatividade de um painel de AcM com o vARM10-RGD⁻, confirmou que a deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD resultou na perda do sítio de ligação para um dos 10 AcM contra o vírus A24 testados (16EC11; Figura 20). Esta perda da reatividade não foi inesperada, desde que este anticorpo foi um dos AcM capazes de reconhecer um epítipo na região VP1 (ALONSO *et al.*, 1994).

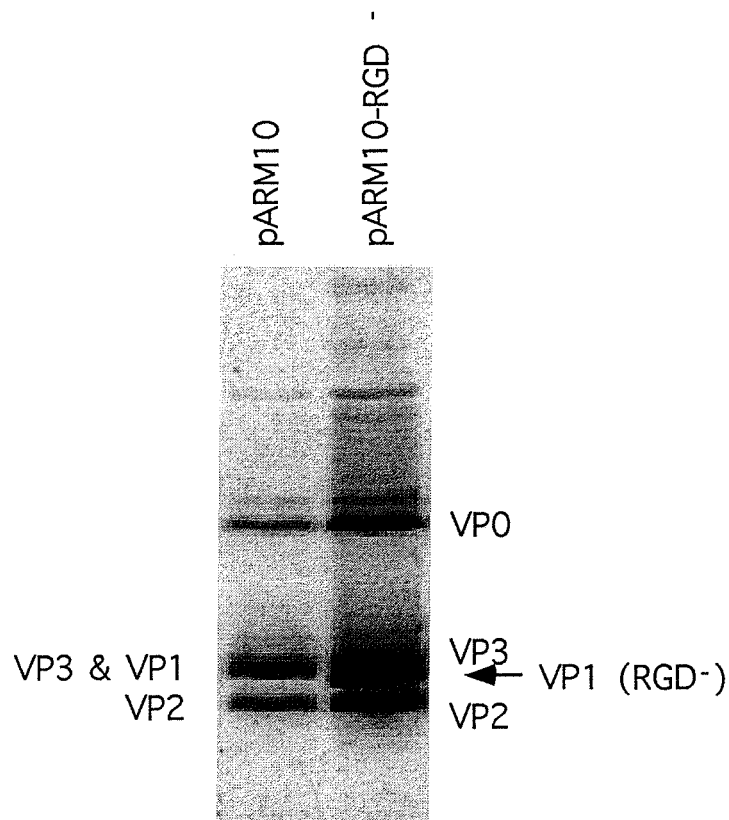
O estoque de vírus não marcado foi crescido por 2 vezes em células CHO11.1, expandindo-se em seguida para uma grande preparação que foi usada como fonte de purificação no gradiente contínuo de sacarose do vARM10-RGD⁻. Com o objetivo de se detectar possíveis contaminações e reversão da deleção introduzida neste vírus que seria utilizado para infectar os animais, 1,3 µg deste vírus foi inoculado em células BHK, cultivado por mais 2 passagens e nenhum efeito citopático foi detectado, confirmando que este vírus perdeu o seu receptor celular normal. Este vírus também foi sequenciado para confirmar a deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD e os dados de sequenciamento não mostraram nenhuma alteração na seqüência do pARM10-RGD⁻ (Figura 18).

3.2.1.3 Caracterização patogênica

3.2.1.3.1 Suínos infectados com vARM10-RGD⁻

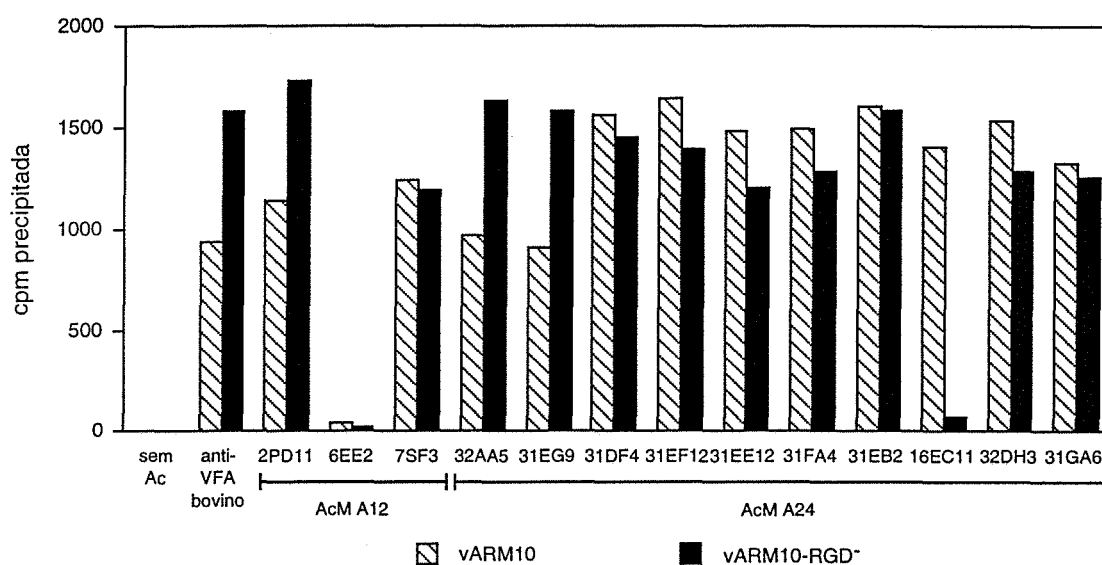
Cinco suínos (627, 628, 629, 630 e 631) foram mantidos em um mesmo ambiente e os animais 627 e 628 foram inoculados com uma dose de 0,5 µg e

Figura 19: Autorradiograma mostrando as proteínas do VFA expressadas pelos vARM10 e vARM10-RGD⁻



Proteínas imunoprecipitadas de fluido de cultura de células transfectadas com transcritos de RNA. Células BHK-21 foram eletroporadas com 2 diferentes RNAs (plasmídeos de origem estão indicados acima da linha) e marcadas radioativamente com ³⁵S-Met. Os fluidos de cultura de células foram preparados, imunoprecipitados com o AcM 2PD11 e analisados em gel 12 % SDS-PAGE. Estas preparações contêm capsídeos contendo ácido nucleico e capsídeos vazios. A proteína VP4 não aparece neste autorradiograma.

Figura 20: Comparação da reatividade do vARM10 e do vARM10-RGD⁺ com diferentes AcM



Quantidades iguais de vírus purificados no gradiente de sacarose, radioativamente marcados, foram reagidos com AcM e a quantidade de radioatividade precipitada por *S. aureus* foi determinada como descrito (ver Métodos). Sem Ac indica nenhuma adição de anticorpos na reação; anti-VFA bovino refere ao soro convalescente de um bovino inoculado com múltiplos sorotipos de VFA; 7SF3, AcM específico no reconhecimento da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 2PD11 e 6EE2, AcM específicos no reconhecimento de um epítipo fora da alça G-H da proteína VP1 no vírus A12 (BAXT *et al.*, 1989); 32AA5, 31DF4, e 16EC11, AcM específicos no reconhecimento de epítopos presentes na região VP1 no vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994); 31EG9, 31EF12, 31EE12, 31FA4, 31EB2, 32DH3, e 31GA6, AcM conformacionais específicos do vírus A24 (ALONSO *et al.*, 1994).

0,05 µg, respectivamente, do vARM10-RGD⁻ vivo purificado no gradiente contínuo de sacarose.

O animal 627 apresentou apenas uma vesícula plana, branca de aproximadamente 1 a 1,5 cm de diâmetro na pata direita traseira (diferente do sítio de inoculação) no 27º d.p.i. (Figura 21). Não foi detectado nenhuma lesão na boca ou no nariz.

O animal 628 apresentou sinais no 5º d.p.i. (Figura 21) e até o final do experimento foram detectadas vesículas planas e brancas de ~ 0,5 cm de diâmetro nas patas, boca e nariz. Este animal apresentou uma doença mais severa quando comparado aos restantes. Entretanto, a severidade desta doença foi dramaticamente diferente do vARM10 contendo os aminoácidos RGD.

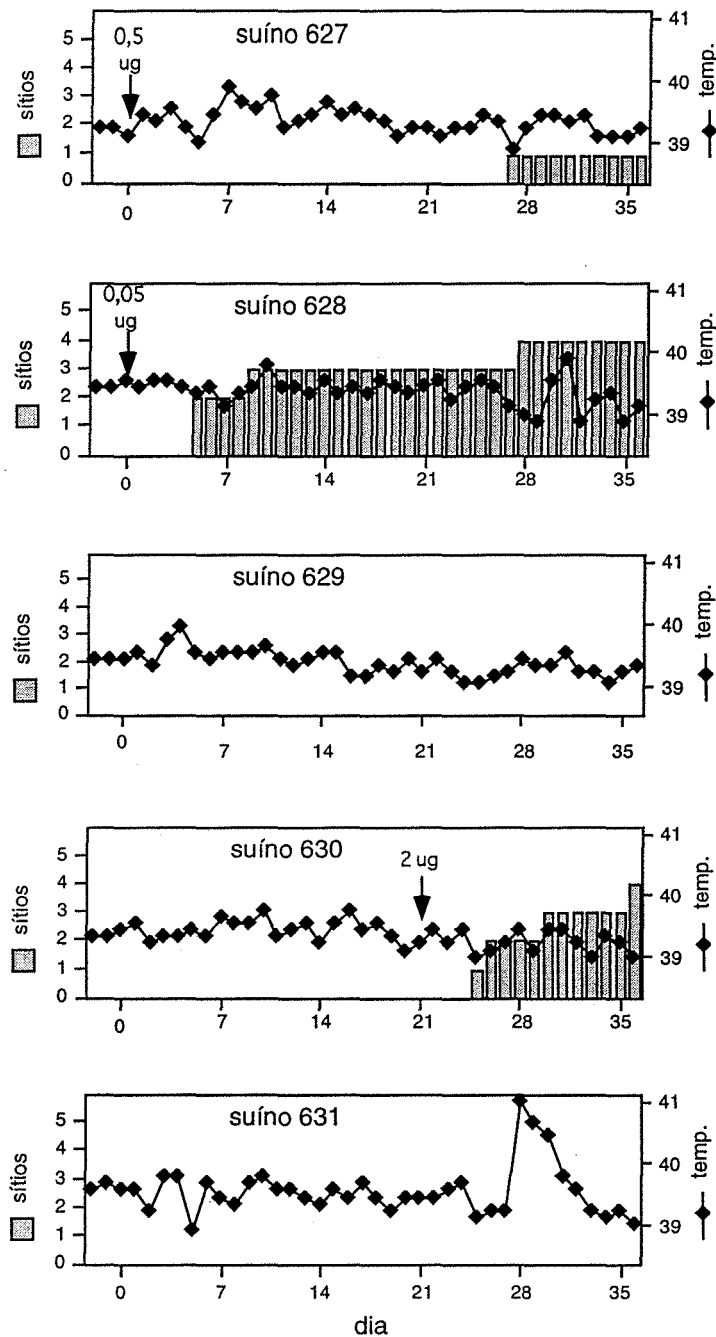
Os animais não inoculados 629 e 631 não desenvolveram nenhum sinal da doença nos 36 dias de experimento (Figura 21). O animal 630, após ter sido inoculado com 2 µg do vírus ARM10-RGD⁻ no 21º dia, apresentou lesões estreitas e de ~ 0,5 cm de comprimento nas patas e boca com características similares às descritas para o animal 628 no 4º d.p.i. (Figuras 21 e 22).

Exceto o animal 631 que desenvolveu uma ferida grave na cauda, não relacionada à doença aftosa, os outros 4 animais não apresentaram temperatura elevada durante o experimento (Figura 21).

Todas as vesículas detectadas nestes animais foram marcadamente diferentes daquelas detectadas nos suínos inoculados com o vARM10 com relação ao seu tamanho e distribuição (Figuras 14 e 22).

O sangue dos animais coletados nos 3º e 7º d.p.i. foram titulados em células CHO11.1. De todas as 10 amostras testadas, vírus foi apenas detectado no 3º d.p.i. na amostra 628 (5×10^3 ufp/ml) e no 7º d.p.i. também na amostra 628 (10 ufp/ml). Interessantemente, os títulos de vírus detectados nestes

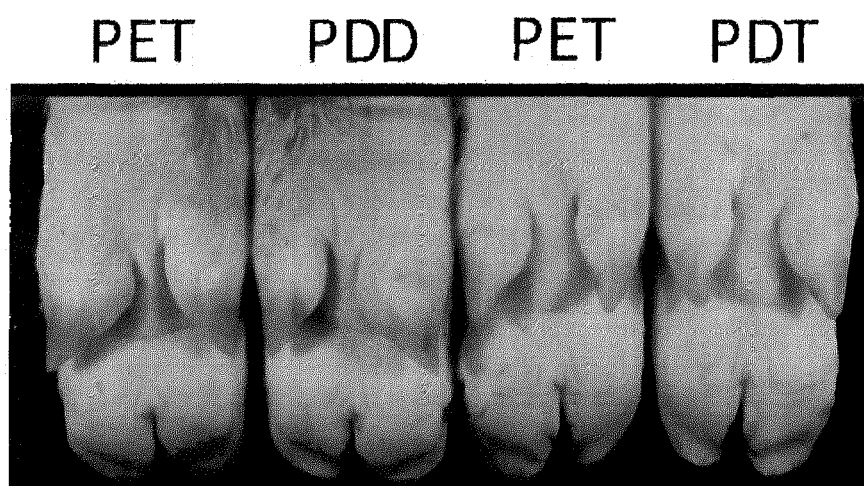
Figura 21: Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vARM10-RGD-



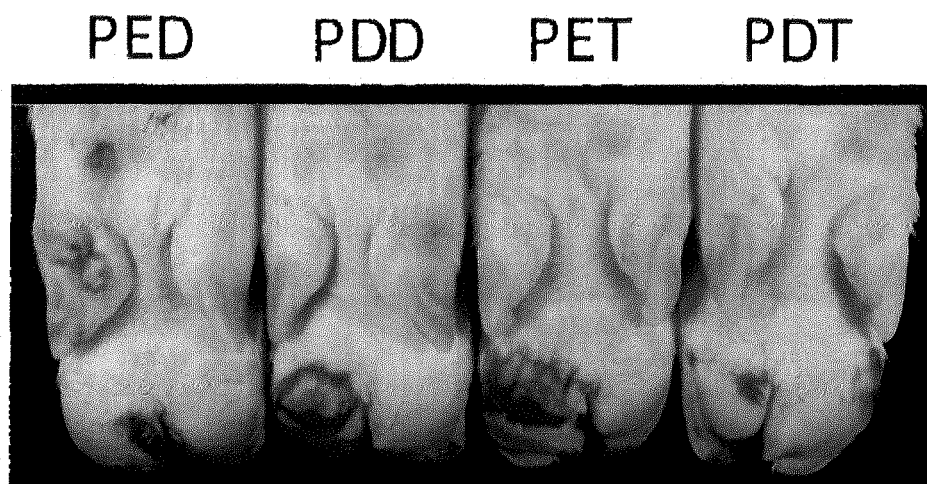
Dos 5 animais mantidos no mesmo ambiente, 3 foram inoculados com o vARM10-RGD- nos dias indicados (ver Métodos; neste experimento, o título de vARM10-RGD- utilizado revelou uma infectividade específica de 3.800.000 ufp/ μ g). As barras representam o número de sítios anatômicos (cada pata e cada área do nariz/boca; um número total de 5), nos quais as vesículas foram detectadas. As linhas representam as temperaturas retais.

Figura 22: Fotografias das patas dos suínos infectados com o vARM10-RGD- (Painel A) ou com vLLARM8 (Painel B)

Painel A: Suíno 630



Painel B: Suíno 626

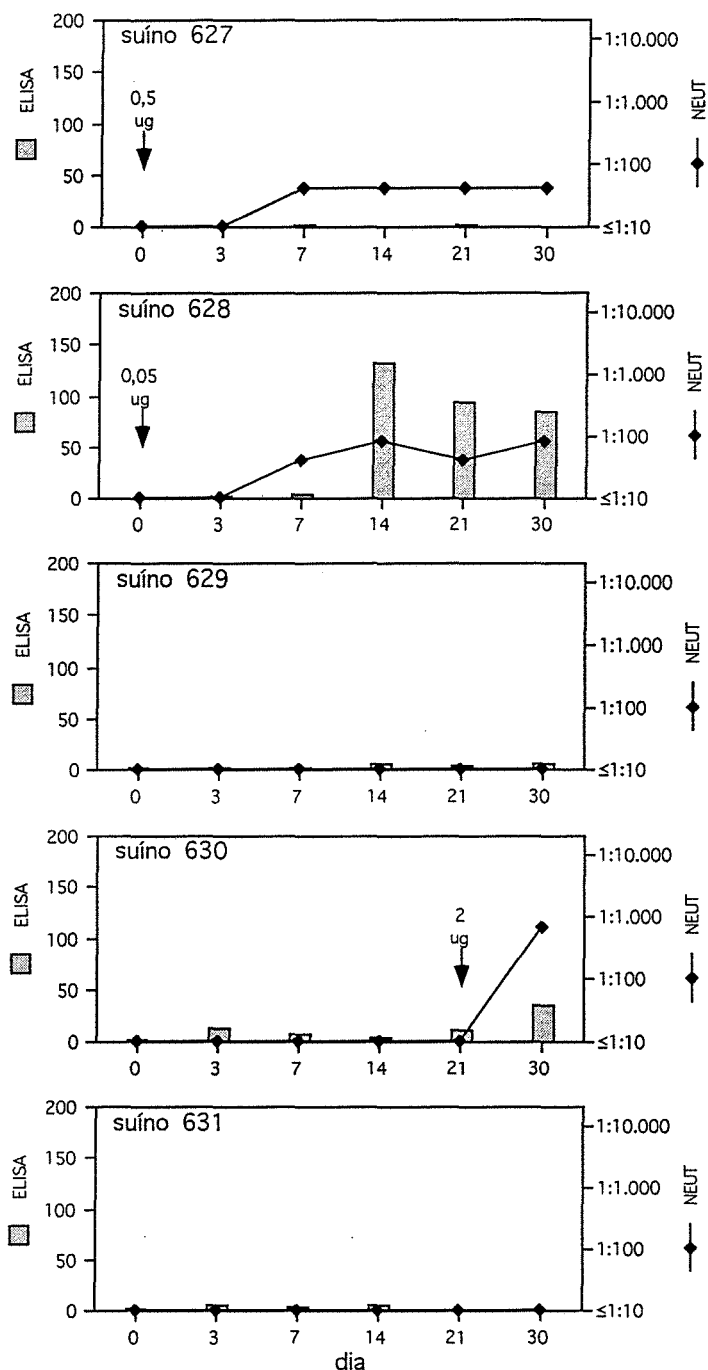


Painel A: fotografia das patas do suíno 630 aos 15 dias, após ter sido inoculado com 2 μ g de vARM10-RGD-. Painel B: fotografia das patas do suíno 626 aos 14 dias, após ter sido inoculado com 2 μ g de vLLARM8. Abreviaturas: PED, pata esquerda dianteira; PDD, pata direita dianteira; PET, pata esquerda traseira; PDT, pata direita traseira.

animais foram similares aos títulos detectados nos animais inoculados com o vARM10. Entretanto, devido a natureza transitória do vírus e como o sangue foi apenas coletado e analisado em certos dias, não foi possível determinar a exata relação entre virulência baseada neste critério. Todavia, a detecção de viremia claramente sugeriu que o vírus deletado dos aminoácidos RGD foi capaz de replicar no suíno 628 inoculado.

O soro dos animais foram testados para a presença de anticorpos neutralizantes e anticorpos contra 3 ABCΔ detectados por ELISA. Todos os animais deste grupo apresentaram títulos de NEUT baixos quando comparados ao grupo de suínos inoculados com o vírus contendo o sítio normal de ligação ao receptor (vARM10) (Figuras 17 e 23). O animal inoculado com alta dose de vARM10-RGD⁻ (suíno 630) apresentou um título alto de NEUT no 7º d.p.i. (PRN50 de 1:640; Figura 23). Os outros animais inoculados, suínos 627 e 628 apresentaram títulos de NEUT variando de 1:40 a 1:80 no dia 30 (Figura 23). Nenhum dos animais não inoculados apresentaram uma resposta imune, consistentes com os dados de aparecimento de sinais clínicos (Figuras 21 e 23). Os dados de leituras de ELISA contra 3ABCΔ da Figura 23 mostram que apenas os soros do suíno 628 foram capazes de reagir contra a proteína não estrutural 3ABCΔ. O animal 630 apresentou uma resposta no 7º d.p.i., diferentemente do animal 628 que só apresentou uma resposta a partir do 14º d.p.i. (Figura 23).

Figura 23: Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vARM10-RGD-



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada no dia 0 (suínos 627 e 628) e no dia 21 (suíno 630). As barras representam os resultados de ELISA para a proteína 3ABCA determinados no soro pré-imune (mostrado no dia 0) e soros coletados nos dias 3, 7, 14, 21 e 30 (ver Métodos), expressados em % do controle positivo. As linhas representam os títulos de NEUT nos soros coletados nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 30. Os valores mostram a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 50 % (ver Métodos).

3.2.1.3.2 Recuperação e avaliação do vírus

Fluido vesicular e amostras de epitélio vesicular de 0,4 cm de diâmetro foram coletados da pata direita traseira do animal 628 no 6º d.p.i. Estas amostras foram cultivadas por 3 vezes em células CHO11.1 e em células BHK na tentativa de se recuperar o vírus. Vírus foi recuperado nas células CHO11.1 somente a partir de amostras de epitélio ($0,5 \times 10^6$ ufp/total da amostra), e nenhum crescimento foi observado nas células BHK em todas as amostras testadas.

A amostra de epitélio coletada do animal 628 e uma amostra de epitélio de 1 cm de diâmetro coletada do animal 630 (6º d.p.i.), foram também testadas por RT-PCR. Produtos de PCR de ambas as amostras foram produzidos, utilizando oligos de ambos os lados da deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD e análises de sequenciamento destas amostras revelaram que vírus recuperado destes animais mantiveram a mesma seqüência do vírus inoculado, demonstrando assim que a deleção não foi revertida.

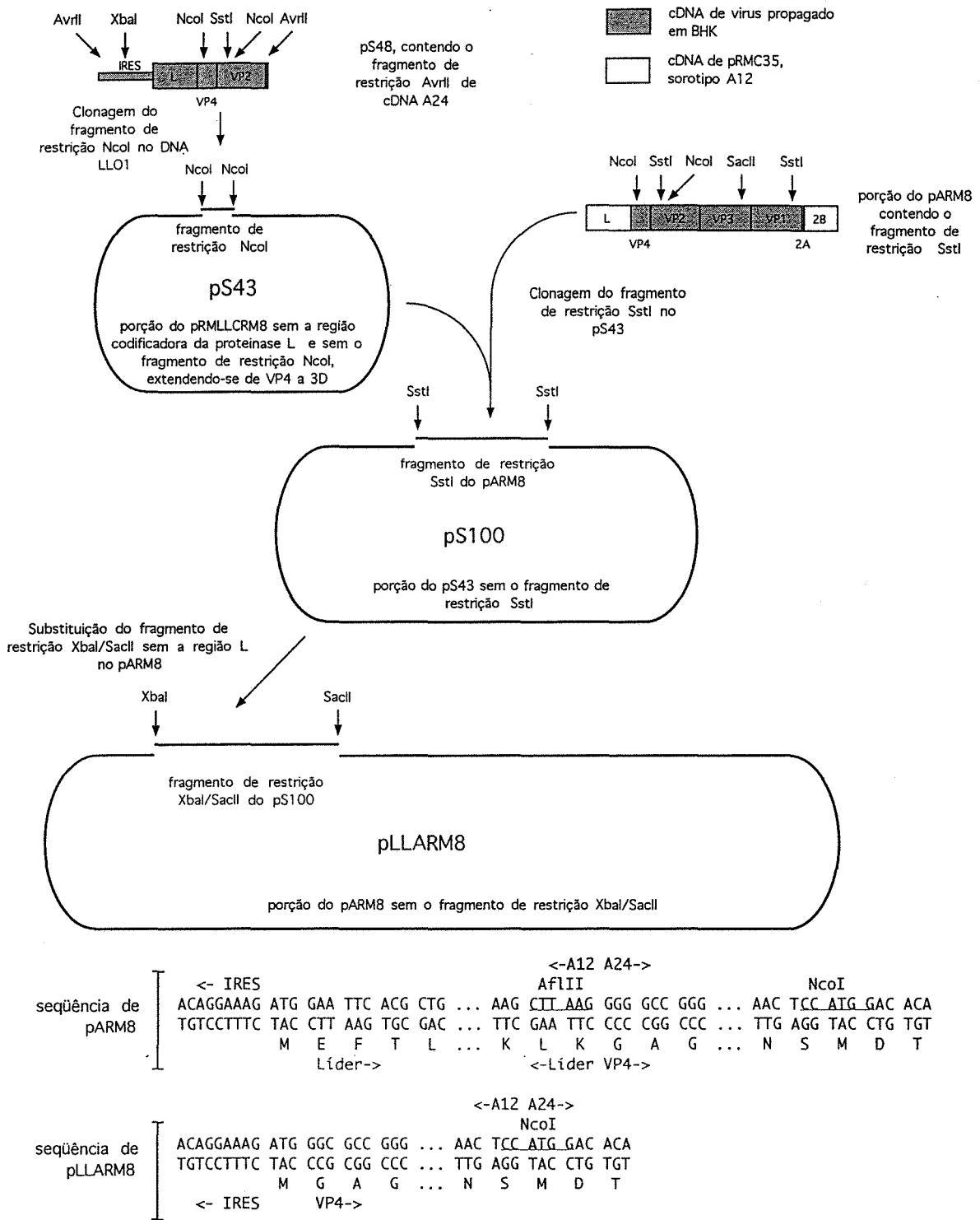
3.2.2 Produção do vírus A24 deletado da região codificadora da proteinase líder a partir do vARM8.

3.2.2.1 Construção do plasmídeo mutante LLARM8

O plasmídeo LLARM8 foi construído em diferentes etapas. Primeiramente, ligou-se um fragmento do 0,58 kb originário do plasmídeo

S48 (usado para construir o pARM8 e pARM10) digerido com Nco I, correspondente a porção de VP4 → VP2 com o fragmento de ~5,4 kb originário do pLLCRM8 (ALMEIDA *et al.*, 1998; ver abaixo e Figura 28), correspondente ao cDNA FLC líder menos do vírus O1 sem a porção VP4 → VP3, dando origem ao plasmídeo S43. Este plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *Sst* I e um fragmento de 4,6 kb (correspondente ao genoma líder menos do vírus O1 contendo a porção VP4 do A12, o restante da região VP4 do vírus A24, 248 pb do cDNA da região VP2 do A24 e sem o restante da região P1, P2 e uma porção de P3) foi purificado e ligado a um fragmento *Sst* I de 1,6 kb do pARM8 (correspondente a porção VP2 → VP1; Figura 24). O plasmídeo resultante, pS100, foi digerido com as enzimas *Xba* I/*Sac* II e um fragmento de 1,8 kb (correspondente a porção do IRES → VP3) foi purificado (Figura 24). Este fragmento foi ligado a um fragmento *Xba* I/*Sac* II de 8,7 kb originário do pARM8, produzindo o pLLARM8 (Figura 24). Assim, o FLC líder menos A24, pLLARM8, codificou um capsídeo híbrido, o qual continha 97 nucleotídeos da porção VP4 do genoma A12 seguido pelo capsídeo A24. Dos 97 nucleotídeos da porção VP4 do A12, apenas 7 diferenças de nucleotídeos foram detectadas quando comparados à mesma porção do genoma no pARM8 A24, incluindo uma mudança silenciosa nos códons codificadores dos aminoácidos Gly-Ala utilizados para produzir a fusão da porção VP4 à região do IRES (PICCONE *et al.*, 1995). As outras 6 diferenças neste fragmento foram todas na 3ª posição dos códons. Desta maneira, a proteína VP4 codificada pelo pLLARM8 foi esperada ser idêntica à proteína codificada pelo pARM8 (Figura 24).

Figura 24: Representação esquemática da construção do pLLARM8



Ver legenda da Figura 1.

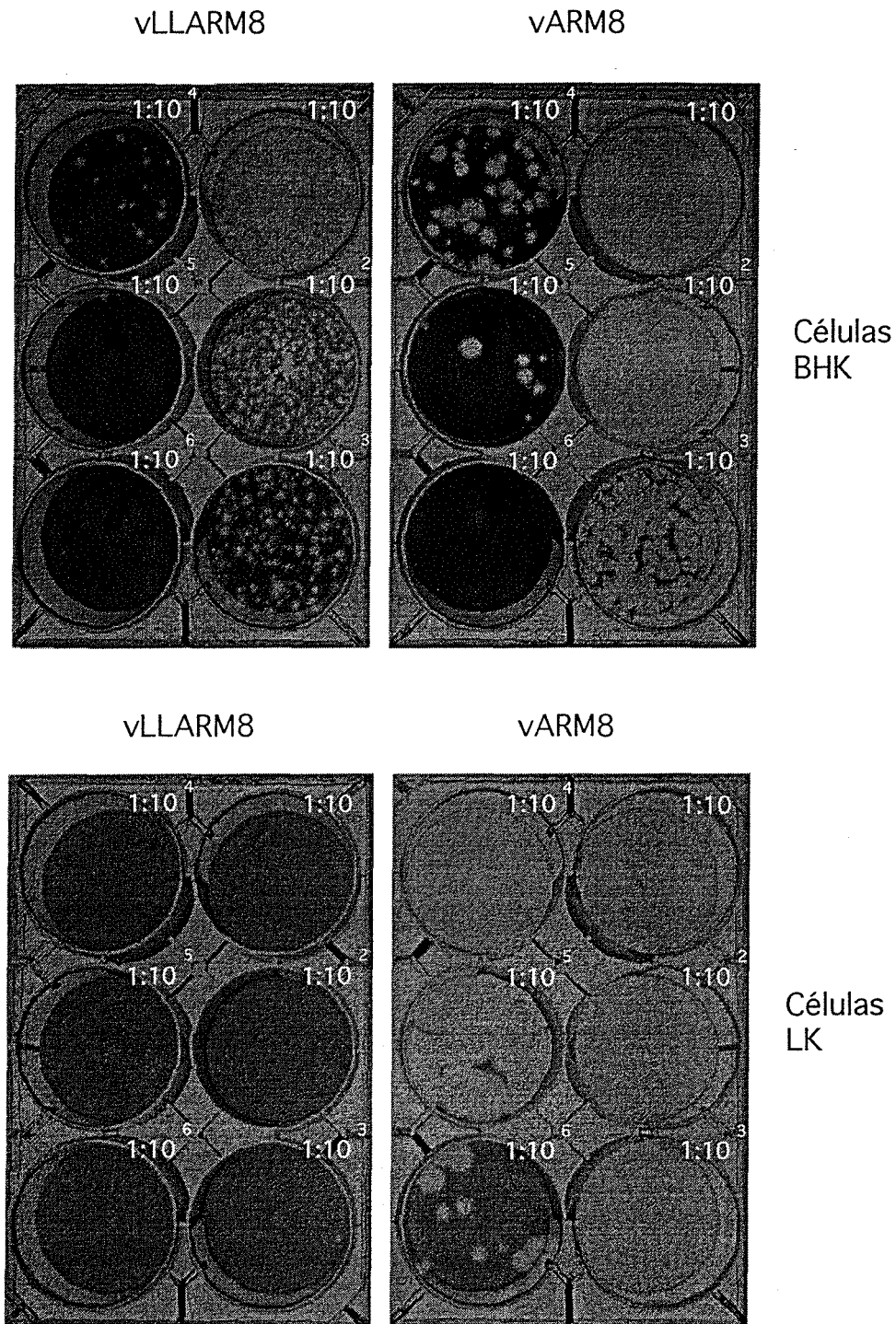
3.2.2.2 Recuperação do vírus vivo e caracterização *in vitro*

RNAs sintéticos produzidos a partir do pLLARM8 foram comparados aos RNAs do pARM8 por transfecção em células BHK. Células transfectadas com transcritos de pARM8 mostraram um efeito citopático maior a 16 horas pós-eletrporação quando comparados às células transfectadas com RNA de pLLARM8 que mostraram um efeito citopático menor, consistente com um prévio trabalho com o pRM-LLV2, demonstrando que vírus deletados da proteinase líder possuíam um menor efeito citopático em células BHK do que os correspondentes vírus contendo a proteinase líder (PICCONE *et al.*, 1995).

Uma grande quantidade de RNA foi transfectada nas células BHK por eletrporação produzindo-se um estoque de vírus marcado radioativamente. Extratos de células eletrporadas marcadas radioativamente revelaram por radioimunoprecipitação que as células BHK transformadas produziram as proteínas esperadas para o vírus A24 e confirmou-se a deleção da proteinase líder.

O estoque de vírus não marcado de células eletrporadas foi crescido por 2 vezes em células BHK. Foi feita uma comparação lado-a-lado da formação de placas em células BHK do vARM8 e do vLLARM8 e foi observado que os vírus derivados do pLLARM8 formaram placas levemente menores do que aquelas formadas pelo vARM8 (Figura 25). Além disso, o vLLARM8 (diferente do vARM8) foi incapaz de formar placas nas células LK. Estes dados foram consistentes com prévios estudos com vírus da aftosa contendo a região da proteinase líder deletada, mostrando que estes vírus não poderiam formar placas em células LK, provavelmente devido a sua

Figura 25: Formação de placas pelo vARM8 ou pelo vLLARM8 em monocamadas de cultura de células BHK e LK



Placas formadas por 6 diluições seriadas do VFA vARM8 e vLLARM8, nas monocamadas de células BHK e LK após 48 h. de incubação (ver Métodos).

inabilidade para suprimir a tradução de proteínas tais como interferons, os quais fazem parte de respostas anti-virais primárias (ALMEIDA *et al.*, 1998). Em seguida, o vírus foi crescido por uma passagem a mais em células BHK, expandido para uma grande preparação, que foi posteriormente utilizada como fonte de purificação do vLLARM8 em gradiente contínuo de sacarose e utilizado para infectar os animais.

3.2.2.3 Caracterização patogênica

3.2.2.3.1 Suínos infectados com vLLARM8

Cinco suínos (622, 623, 624, 625 e 626) foram mantidos em um mesmo ambiente e os animais 622 e 623 foram inoculados com 0,5 e 0,05 μg do vLLARM8, respectivamente. Os animais 624, 625 e 626 foram os animais não inoculados.

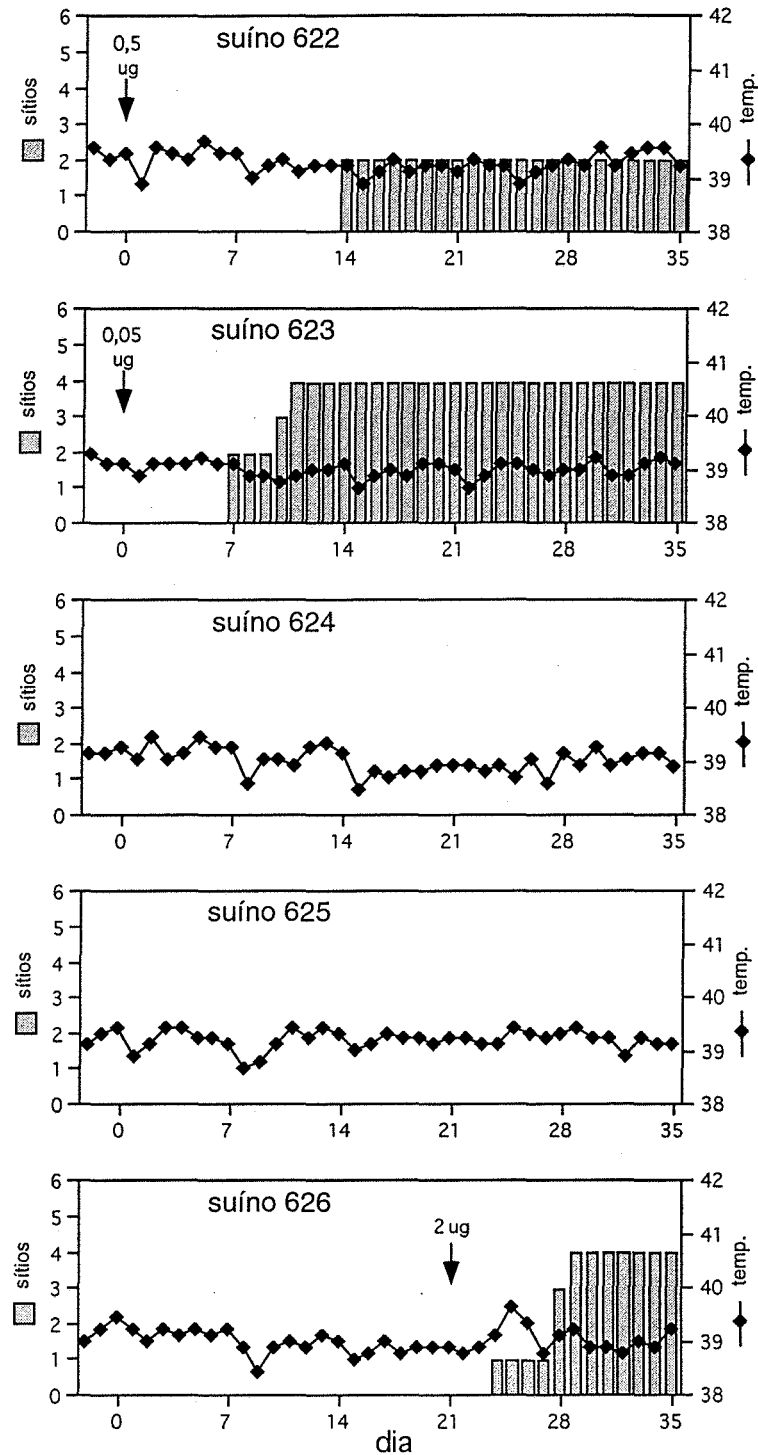
O animal 622 apresentou lesões pequenas, brancas e planas nas patas esquerda dianteira e traseira a partir do 14º dia (Figura 26).

O animal 623 apresentou lesões em 2 diferentes sítios (para este experimento, sítios foram definidos como cada pata e área do nariz/boca totalizando 5 pontos) no 7º dia (Figura 26). Durante o decorrer do experimento, lesões pequenas foram detectadas em 3 patas e no nariz.

Os animais 624 e 625 não apresentaram nenhum sinal da doença nos 35 dias de experimento (Figura 26).

O animal 626 também não apresentou nenhum sinal da doença até ser infectado com 2 μg do vírus no 21º dia, utilizando a mesma rota descrita

Figura 26: Sinais da doença no grupo de suínos inoculados com vLLARM8



Dos 5 animais mantidos no mesmo ambiente, 3 foram inoculados com o vLLARM8 nos dias indicados (ver Métodos; neste experimento, o título de vLLARM8 utilizado revelou uma infectividade específica de 830.000 ufp/ μ g). As barras representam o número de sítios anatômicos (cada pata e cada área do nariz/boca; um número total de 5), nos quais as vesículas foram detectadas. As linhas representam as temperaturas retais.

anteriormente. Ele apresentou sinais no 3º d.p.i. e até o final do experimento foram detectadas lesões de 1 a 4 cm em todas as solas das patas (Figura 26).

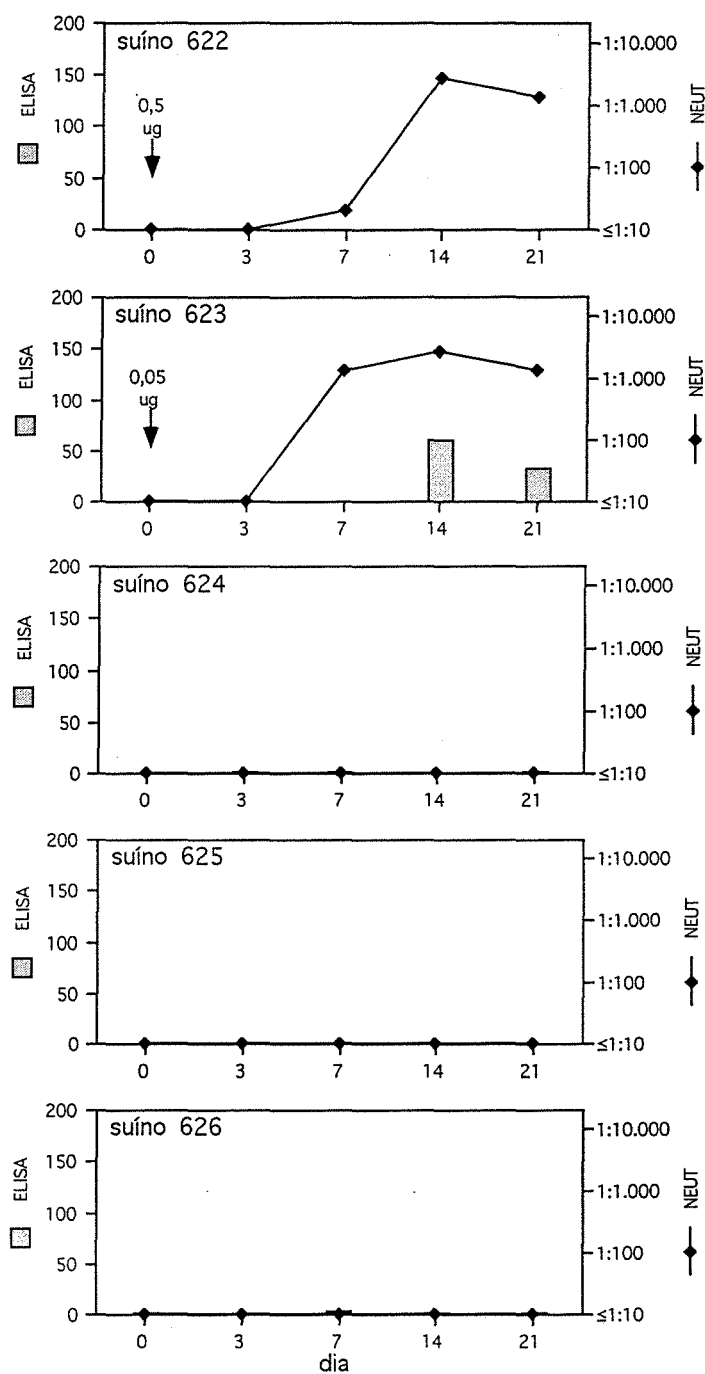
Nenhum dos animais apresentaram temperatura elevada durante todo o experimento (Figura 26).

A severidade da doença com o vLLARM8 foi muito menor do que nos animais inoculados com o vírus selvagem, vARM8 (Figuras 14 e 22). Além do mais, os animais inoculados com vLLARM8 não mostraram fraqueza, consistentes com o menor tamanho das vesículas. Embora os dados da Figura 26 não mostraram recuperação (uma vez positivo em um sítio, foi considerado positivo até o final do experimento), os animais 622 e 623 apresentaram uma completa recuperação no 35º dia.

O sangue dos animais coletado nos 3º e 7º d.p.i. foram titulados para detecção de ufp em BHK. Nas 10 amostras testadas, vírus foi apenas detectado no 3º d.p.i. na amostra 623 (550 ufp/ml). A ausência de viremia nos outros animais no 3º d.p.i. e de todos os animais no 7º d.p.i. pode ser devido à permanência transitória do vírus na circulação como mencionado anteriormente.

O soro dos animais foram testados para a presença de anticorpos neutralizantes e anticorpos dirigidos contra 3 ABCΔ detectados por ELISA. Os animais deste grupo apresentaram títulos baixos de NEUT quando comparados ao grupo de suínos inoculados com o vírus contendo a região L (vARM8) (Figuras 15 e 27). Os suínos inoculados 622 e 623, apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes a partir do 7º d.p.i., variando de 1:20 a 1:2560 (Figura 27). Nenhum dos animais não inoculados apresentaram uma resposta imune (Figura 27). As leituras de ELISA contra 3ABCΔ mostraram que apenas o suíno inoculado 623 apresentou uma resposta positiva, sendo esta

Figura 27: Títulos de NEUT e ensaios de ELISA de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vLLARM8



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada no dia 0. As barras representam os resultados de ELISA para a proteína 3ABC Δ determinados no soro pré-imune (mostrado no dia 0) e soros coletados nos dias 3, 7, 14 e 21 (ver Métodos), expressados em % do controle positivo. As linhas representam os títulos de NEUT nos soros coletados nos dias citados acima. Os valores mostram a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 50 % (ver Métodos).

baixa e tardia se comparada com os resultados encontrados para o vírus selvagem (Figuras 15 e 27).

3.2.2.3.1 Recuperação e avaliação do vírus

Amostra de epitélio vesicular de 0,5 cm de diâmetro foi coletado no 9º d.p.i. da pata esquerda dianteira do animal 623. Esta amostra foi cultivada por 3 vezes em células BHK na tentativa de se recuperar o vírus, mas nenhum efeito citopático foi detectado.

A amostra de epitélio vesicular coletada do animal 623 e uma amostra de fluido vesicular coletado no 9º d.p.i. da pata direita dianteira do animal 626 foram também testados por RT-PCR. Produtos de PCR de ambas as amostras foram produzidos, utilizando-se os oligonucleotídeos senso P2 (CCA AGC TTG AAA GGG GGC GCT AGG G) e antisenso P3 (CCG AAT TCG GGT GAA AGG CGG GTT TCG G), capazes de reconhecer o fragmento S presente no genoma do vírus da aftosa. Foi confirmado a presença do vírus da aftosa em ambas as amostras.

3.3 DESENVOLVIMENTO DO VÍRUS LÍDER MENOS E DA VACINA ATENUADA COM MUTAÇÃO NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR DA CEPA O1 CAMPOS

3.3.1 Vírus O1 Campos deletado da região codificadora da proteinase líder (vLLCRM8)

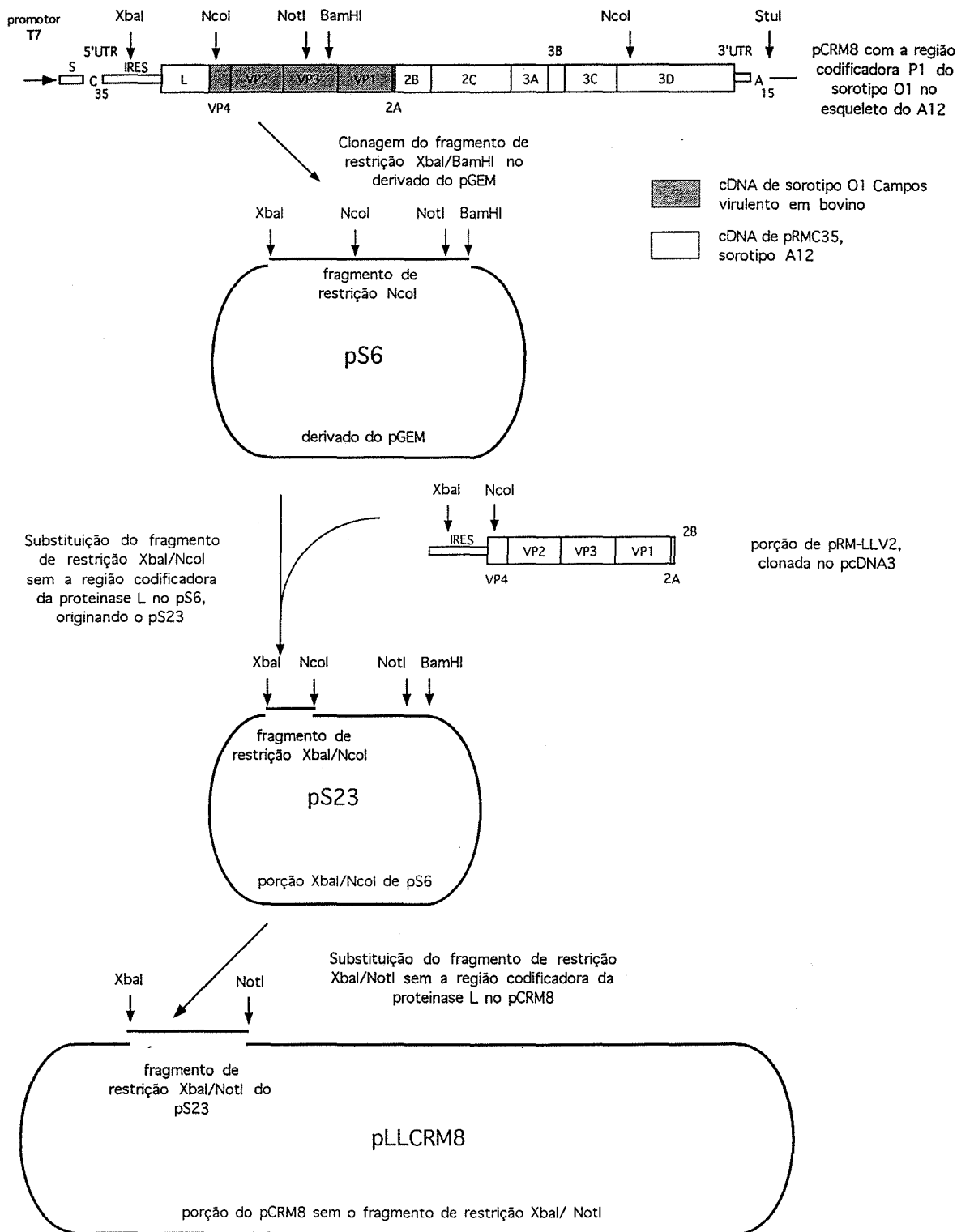
3.3.1.1 Construção do pLLCRM8

O pLLCRM8 foi construído pela inserção do fragmento *XbaI/BamHI* (IRES a VP3) originário do pCRM8 (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997) no derivado do pGEM, formando o pS6 (Figura 28). A porção do pRM-LLV2 (PICCONE *et al.*, 1995) clonada no pcDNA3 foi digerida com *Xba I/Nco I*, produzindo um fragmento de 585 pb, correspondente a porção IRES a VP4 sem a região codificadora da proteinase L (Figura 28). Este fragmento substituiu o fragmento correspondente no pS6, formando o pS23 (Figura 28). O pS23 foi digerido com as enzimas de restrição *Xba I/Not I* e o fragmento de 1,8 kb foi inserido no fragmento *Xba I/Not I* de 8,8 kb do pCRM8, originando o pLLCRM8 (Figura 28). O plasmídeo resultante, pLLCRM8 (Figura 28), não apresentou a região codificadora da proteinase líder e continha a região inteira do capsídeo O1, exceto que apresentou no início da região VP4, 97 nucleotídeos provenientes do A12, os quais codificaram para os mesmos aminoácidos correspondentes a mesma região do O1 Campos.

3.3.1.2 Caracterização *in vitro* do vCRM8 e do vLLCRM8

RNAs de pCRM8 e pLLCRM8 foram preparados e transfectados em células BHK por eletroporação. Células transfectadas com transcritos de pCRM8 mostraram um efeito citopático maior a 16 horas pós-eletroporação, enquanto as células transfectadas com o RNA de pLLCRM8 mostraram efeito citopático menor, consistente com o que foi descrito para o vLLARM8 A24.

Figura 28: Representação esquemática da construção do pLLCRM8



Ver legenda da Figura 1.

Vírus recuperado das células eletroporadas com RNA de pLLCRM8 foi cultivado por 2 vezes mais em células BHK. Análises da seqüência do genoma da 2ª passagem em células BHK confirmaram a ausência do gene líder (L) e não mostraram nenhuma mudança na seqüência na área ao redor do sítio de iniciação da tradução.

Foi feita uma comparação do fenótipo de placas expressados pelos vCRM8 e vLLCRM8 em células BHK. Foi observado que os vírus derivados do pLLCRM8 (vLLCRM8) formaram placas levemente menores do que aquelas formadas pelo vCRM8, reforçando os resultados descritos anteriormente para o vLLARM8 A24. Ao contrário do tipo selvagem (vCRM8), os vírus derivados do pLLCRM8 (vLLCRM8) não foram capazes de formar placas em células LK, consistente com a prévia descrição para o vLLARM8 A24.

Assim como o pLLARM8 A24 Cruzeiro, o pLLCRM8 O1 Campos, também apresentou as características necessárias para se tornar um bom candidato à vacina atenuada. Uma grande quantidade de RNA foi transfectada nas células BHK por eletroporação, e foram produzidos estoques de vírus não marcado e marcado radioativamente. O estoque de vírus não marcado foi crescido por 3 vezes em células BHK e expandido para uma grande preparação que foi utilizada como fonte de purificação do vLLCRM8.

Ensaio de radioimunoprecipitação dos extratos de células eletroporadas marcadas radioativamente, revelaram que as células BHK transformadas produziram as proteínas esperadas para o vírus O1 e a deleção da proteinase líder foi confirmada

3.3.1.3 Caracterização do vLLCRM8 no bovino 67

Um bovino de 10 meses de idade foi inoculado com o vLLCRM8 pela rota intradermolíngual, um método extremamente sensível para detectar o VFA (HENDERSON, 1952). A dose total administrada correspondeu a 6,8 μg do vírus ($6,3 \times 10^6$ ufp), dividido em 10 inoculações de 645 ng e 5 inoculações de cada uma das seguintes quantidades: 64,5 ng, 6,45 ng e 0,65 ng.

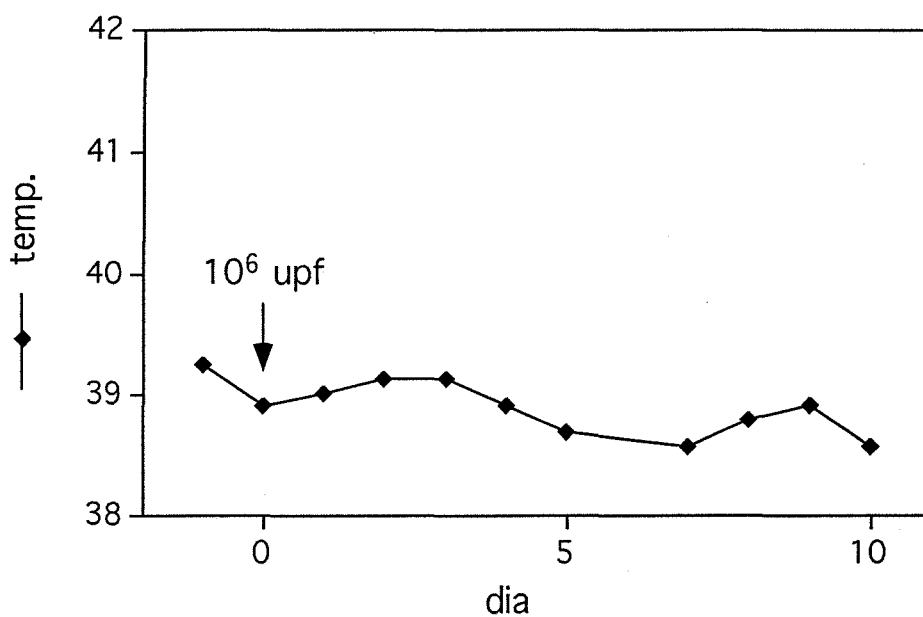
Durante o decorrer do experimento, o bovino não mostrou nenhum sinal da doença aftosa e não formou nenhuma vesícula no sítio de inoculação, indicando que a dose IDL de 50 % (IDL50) foi maior que $6,0 \times 10^5$ ufp. Além disso, o animal não mostrou temperatura elevada em nenhum dia de experimento (Figura 29). Este experimento mostrou que o vLLCRM8 foi marcadamente atenuado em relação ao mesmo vírus contendo a região codificadora da proteinase líder (vCRM8), o qual causou uma doença debilitante em bovino e mostrou uma ID50 de menos que 50 ufp (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997).

O bovino desenvolveu uma resposta de anticorpos (NEUT) em 5 d.p.i. (PRN70 de 1:64) e produziu anticorpos contra a proteína não-estrutural 3D revelada por RIP (dados não mostrados). O título de neutralização permaneceu constante até que o animal foi desafiado aos 47 d.p.i. pela rota intradermolíngual com 2×10^5 ufp de uma cepa O1 Campos virulenta em bovino (WT-O1).

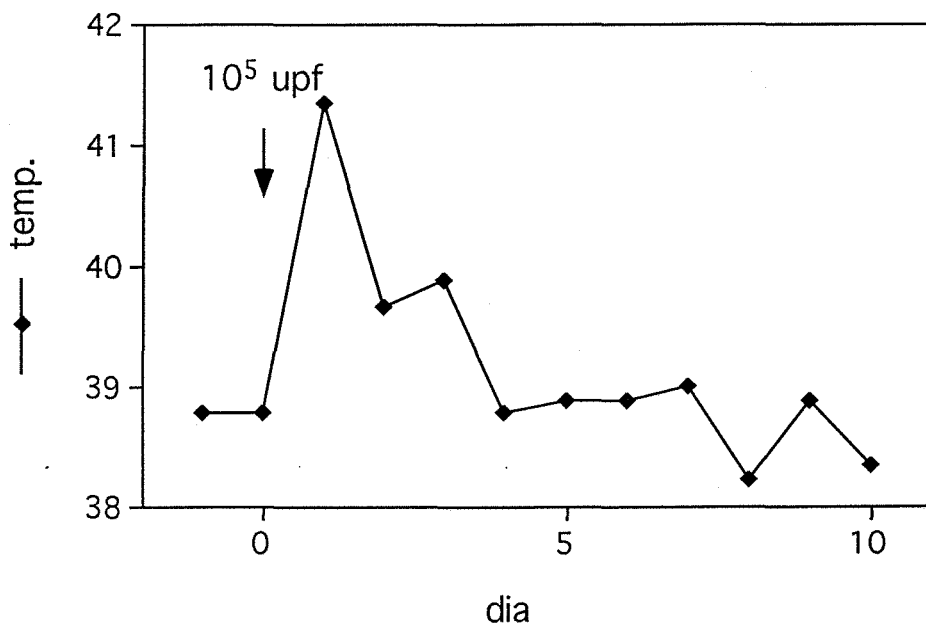
Vinte e quatro horas após o animal ter sido desafiado, ele apresentou uma temperatura de 41,3 °C (Figura 29). No dia seguinte, a temperatura caiu para 40 °C (Figura 29) e embora houvesse formação de vesículas na superfície

Figura 29: Temperatura de um bovino após inoculação com o vLLCRM8 e após desafio com o WT-O1 Campos

A. Pós-inoculação com o vLLCRM8



B. Pós-desafio com o WT-O1 Campos



Painel A: O animal foi inoculado com a quantidade de vírus mostrada no dia 0. Painel B: O animal foi desafiado a 47 dias pós-inoculação (mostrado aqui como dia 0) com a quantidade de vírus O1 Campos derivado de bovino (WT-O1) indicada.

da língua nos dias subsequentes, nenhum sinal de fraqueza ou aparecimento de vesículas nas patas foram detectados durante os 10 dias seguintes, demonstrando proteção, de acordo com o conceito descrito por DONALDSON & DOEL (1992).

3.3.1.4 Caracterização dos vCRM8 e vLLCRM8 em suínos

3.3.1.4.1 Infecção de suínos com o vCRM8

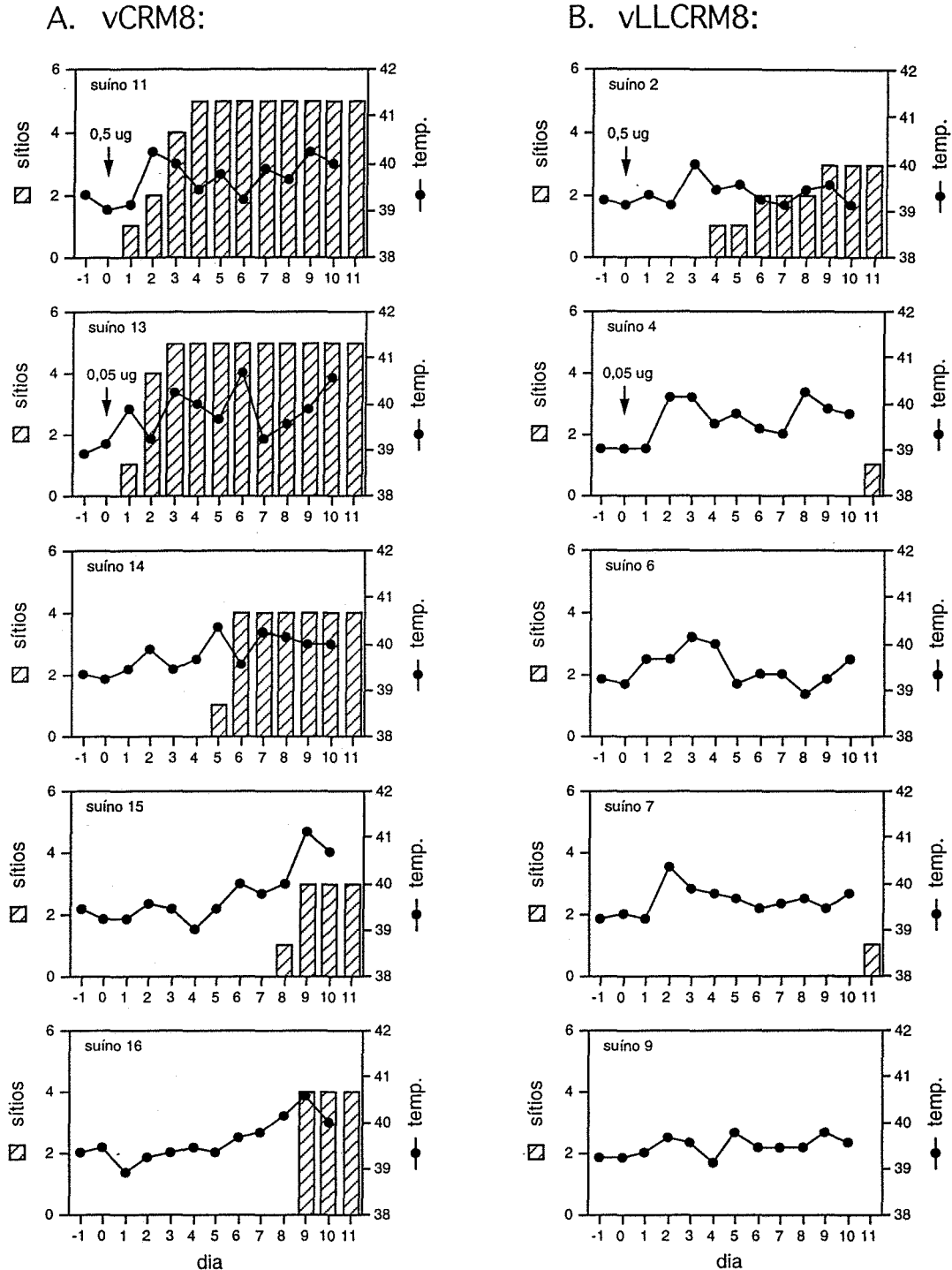
Cinco suínos foram mantidos em um mesmo ambiente para testar o potencial patogênico do vCRM8. Dois suínos, 11 e 13, foram inoculados com 2 diferentes doses, 0,5 e 0,05 μg , respectivamente de vCRM8 e outros 3 (suínos 14, 15 e 16) foram mantidos como controles.

Os suínos 11 e 13 desenvolveram vesículas dentro de 24 horas (Figura 30). O animal não inoculado 14, apresentou vesículas no 5º d.p.i. (Figura 30) e vesículas foram detectadas nos outros 2 animais restantes, 15 e 16, nos dias 8 e 9, respectivamente (Figura 30). Vesículas rompidas de 2 cm^2 ou mais foram encontradas na banda coronária de todas as quatro patas dos animais 11 (Figura 31), 13, 14 e 16 e vesículas levemente menores foram encontradas no animal 15.

Todos os 5 animais deste grupo apresentaram temperaturas elevadas (Figura 30) e no final do experimento todos os animais estavam fracos e deprimidos.

Os suínos 11 e 13 mostraram significantes títulos de anticorpos neutralizantes no dia 6 (Figura 32). Todos os 5 animais desenvolveram um

Figura 30: Sinais da doença nos grupos de suínos inoculados com o vCRM8 ou com o vLLCRM8



As barras representam o número de sítios anatômicos (cada pata e cada área do nariz/boca; um número total de 5), nos quais as vesículas foram detectadas. As linhas representam as temperaturas retais. Coluna A: Resultados de 5 suínos mantidos em um mesmo ambiente, 2 dos quais foram inoculados com o vCRM8 (ver Métodos; neste experimento, o título de vCRM8 utilizado revelou uma infectividade específica de 1.300.000 ufp/ μ g). Coluna B: Resultados de 5 suínos mantidos em um mesmo ambiente, 2 dos quais foram inoculados com o vLLCRM8 (ver Métodos; neste experimento, o título de vLLCRM8 utilizado revelou uma infectividade específica de 270.000 ufp/ μ g).

Figura 31: Fotografias das patas dos suínos infectados com o vCRM8 (Painel A) ou com vLLCRM8 (Painel B)

Painel A: Suíno 11

PED PDD PET PDT



Painel B: Suíno 2

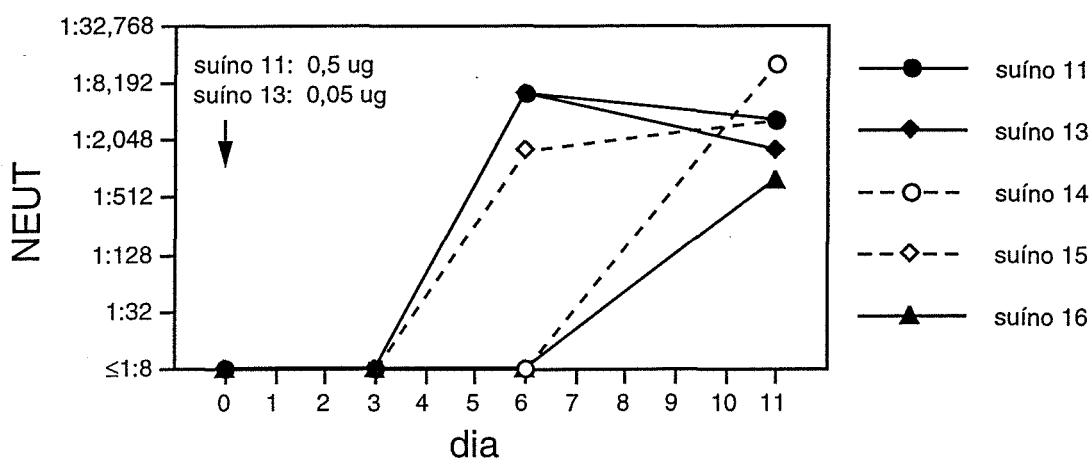
PED PDD PET PDT



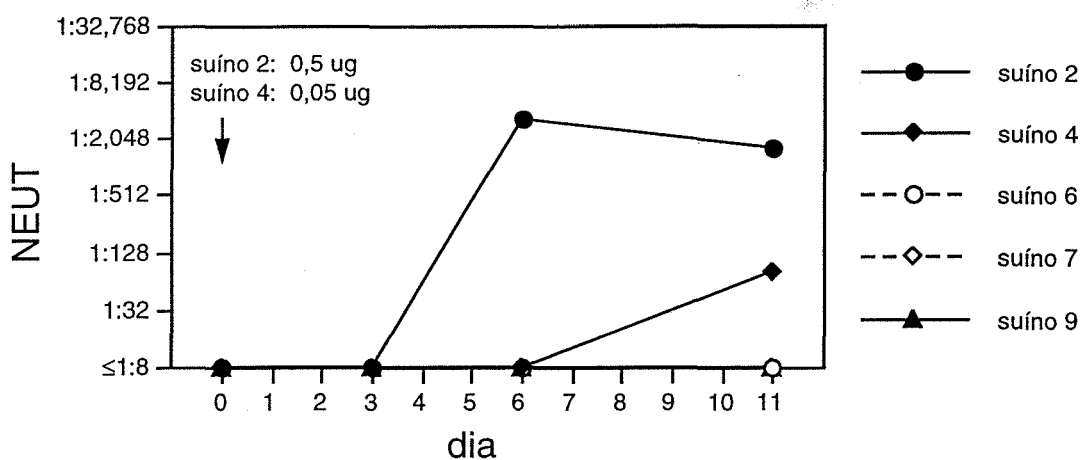
Painel A: fotografia das patas do suíno 11 aos 11 dias, após ter sido inoculado com $0,05 \mu\text{g}$ de vCRM8. Painel B: fotografia das patas do suíno 2 aos 11 dias, após ter sido inoculado com $0,05 \mu\text{g}$ de vLLCRM8. Abreviaturas: PED, pata esquerda dianteira; PDD, pata direita dianteira; PET, pata esquerda traseira; PDT, pata direita traseira.

Figura 32: Títulos de NEUT de grupos de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com o vCRM8 ou com o vLLCRM8

A. vCRM8:



B. vLLCRM8:



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada no dia 0. O sangue foi coletado dos animais antes da inoculação (mostrado como dia 0) e nos dias 3, 6 e 11. A diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 70% foi determinada para cada amostra (ver Métodos).

título de anticorpos neutralizantes no 11º dia (Figura 32). Ensaio de RIP realizados com soro do 11º dia, mostraram anticorpos contra proteínas estruturais e não-estrutural 3D, nos suínos 11, 13 e 14 e anticorpos contra as proteínas estruturais nos suínos 15 e 16 (dados não mostrados).

3.3.1.4.2 Infecção de suínos com o vLLCRM8

Também com o objetivo de se testar o potencial patogênico do vLLCRM8, 5 animais foram mantidos em um mesmo ambiente. Dois animais (suínos 2 e 4), foram inoculados com 0,5 e 0,05 µg de vLLCRM8, respectivamente. Os 3 restantes (suínos 6, 7 e 9) foram os animais controles.

O animal 2 apresentou vesículas durante o decorrer do experimento (Figura 30). Este animal apresentou 5 pequenas vesículas, sendo que 3 delas apareceram no 4º dia na pata esquerda dianteira, uma vesícula apareceu na pata esquerda traseira no 6º dia, e uma outra apareceu na pata direita traseira no 9º dia. Estas vesículas continham menos fluido do que as vesículas produzidas pelo vCRM8 e todas elas foram menores que 0,5 cm², embora todas as 5 haviam se rompido até o final do experimento. Todos os outros animais não mostraram nenhum sinal da doença até o dia da necrópsia no 11º dia. Neste dia, foram observadas vesículas no animal inoculado 4 e no animal não inoculado 7 (Figura 30). As vesículas no suíno 4 foram limitadas a 2 sítios na pata esquerda traseira, não a pata inoculada, e as vesículas no suíno 7 foram limitadas a um único sítio em uma única pata. Todas as vesículas detectadas nos animais inoculados com vLLCRM8 foram marcadamente diferentes daquelas detectadas nos suínos inoculados com o vCRM8 com

relação ao seu tamanho e distribuição (Figura 31). Além do mais, os animais inoculados com vLLCRM8 não mostraram fraqueza, consistentes com o menor tamanho das vesículas. Os animais 6 e 9 não apresentaram nenhuma vesícula durante os primeiros 11 dias de experimento (Figura 30), mas devido ao aparecimento lento das pequenas e atípicas vesículas detectadas nos outros animais, não se pode excluir, a possibilidade de ter ocorrido um rápido desenvolvimento e recuperação das vesículas nestes 2 animais, durante o decorrer do experimento.

O vírus LLCRM8 foi detectado no fluido vesicular coletado do animal 2 pela técnica de RT-PCR. Entretanto, não foi possível detectar vírus nos fluidos vesiculares dos animais 4 e 7, possivelmente devido à degradação das amostras durante o procedimento de necrópsia.

Evidências da reduzida capacidade de disseminação do vírus líder menos, foi deduzida a partir dos dados onde, anticorpos específicos do VFA só puderam ser detectados nos animais realmente inoculados com vLLCRM8 (Figura 32), uma vez que ambos os animais, inoculados e não inoculados, no grupo vCRM8, produziram anticorpos no 11º dia (Figura 32).

3.3.2 Adição do sítio de ligação do receptor mutado e conversão à forma de DNA

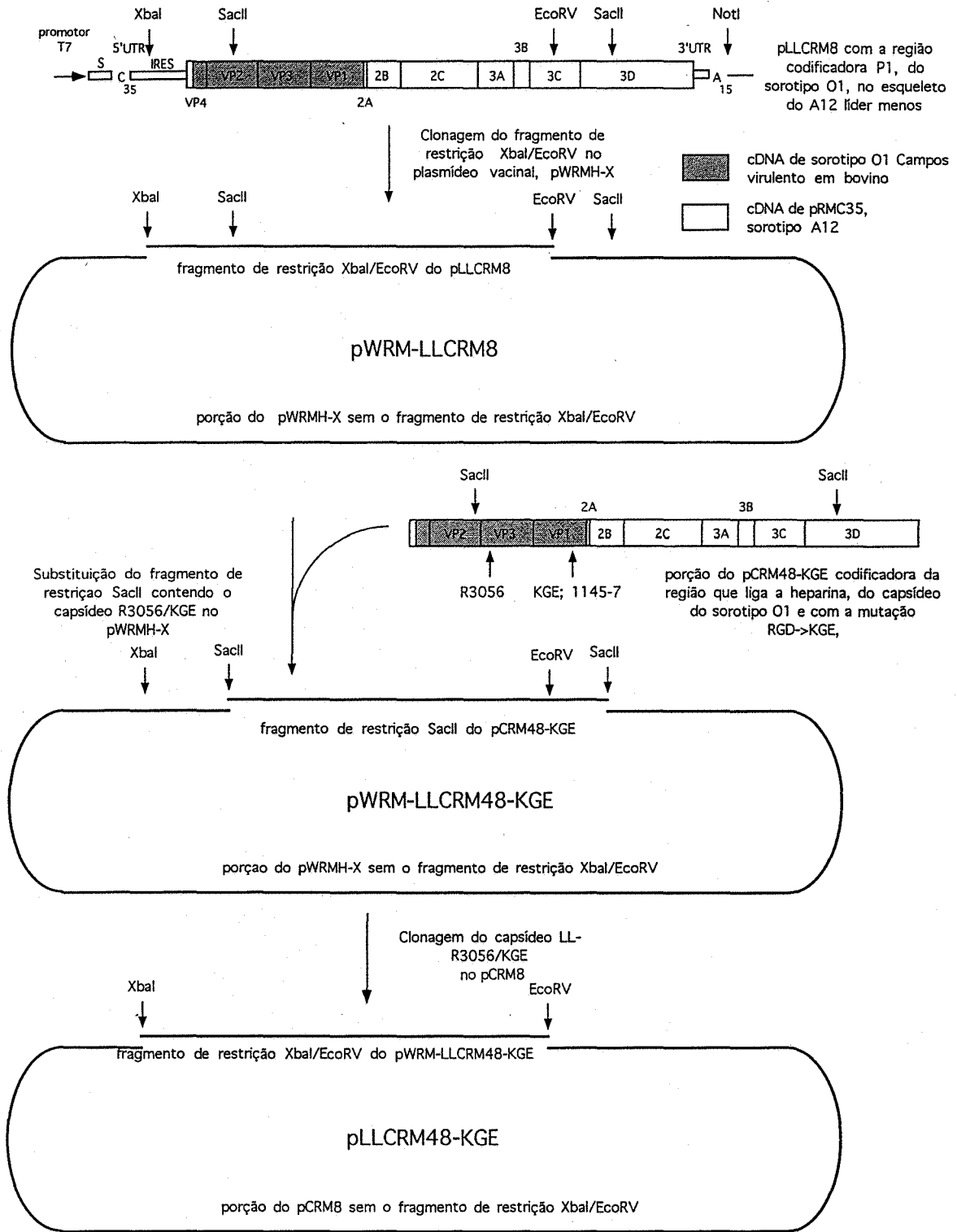
Os plasmídeos LLCRM48-KGE e pWRM-LLCRM48-KGE foram construídos em diferentes etapas. Primeiramente, foi feita uma digestão do pLLCRM8 com as enzimas de restrição *Xba* I/*Eco* RV (IRES → 3C) e este fragmento foi inserido no fragmento equivalente do plasmídeo vacinal

pWRMH-X (WARD *et al.*, 1997), originando o pWRM-LLCRM8 (Figura 33). A porção do pCRM48-KGE (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998) contendo a região que liga à heparina (resíduo R na posição 56 em VP3) e a substituição do RGD por KGE na alça G-H em VP1, correspondente ao fragmento *Sac* II (Figura 33), foi inserido no fragmento correspondente do pWRM-LLCRM8, originando o pWRM-LLCRM48-KGE (Figura 33). O fragmento *Xba* I/*Eco* RV do pWRM-LLCRM48-KGE foi clonado no pCRM8, originando o pLLCRM48-KGE (Figura 33).

O vírus resultante, designado vLLCRM48-KGE, apresentou colônias pequenas, claras, típicas das apresentadas pelos vírus O1 que se ligam à heparina em células BHK, consistentes com a alteração da especificidade do receptor (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998).

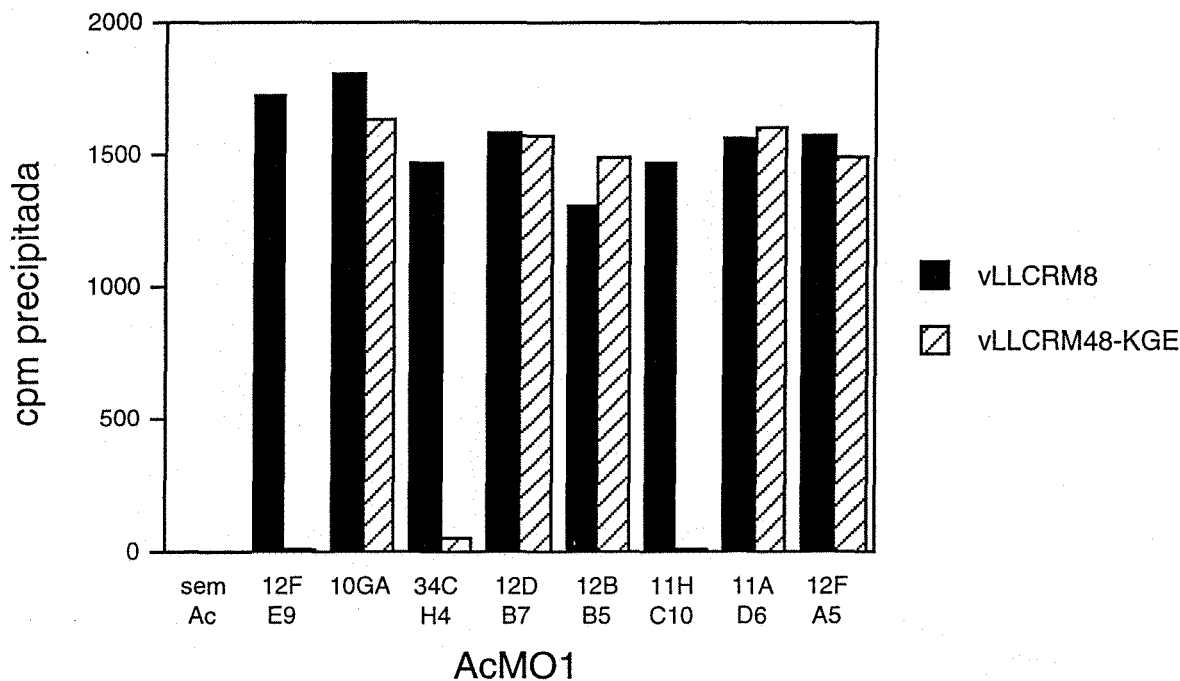
Uma comparação imunológica do vLLCRM8 e vLLCRM48-KGE foi realizada utilizando-se RIP de partículas virais purificadas, e um painel de anticorpos monoclonais (Figura 34). Estas análises revelaram a perda do epitopo 34CH4, a qual provavelmente resultou da aquisição do resíduo R que liga à heparina na posição 56 de VP3, sugerindo que o determinante de fenótipo de placa se sobrepõe com este epitopo (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997), mas a análise também mostrou a perda de 2 sítios de ligação adicionais dos anticorpos monoclonais (Figura 34). Um destes, AcM 12FE9, reconhece um epitopo o qual contém um resíduo L que aparece imediatamente após a seqüência RGD em VP1 do vírus O1 Brugge (STAVE *et al.*, 1988) e o outro AcM, 11HC10, reconhece um sítio sensível à tripsina em VP1 do vírus O1 Campos (ALONSO *et al.*, 1994). A perda da reatividade dos 2 últimos AcM resultou supostamente da substituição dos aminoácidos RGD pelos aminoácidos

Figura 33: Representação esquemática da construção do pLLCRM48-KGE e da vacina de DNA, pLLCRM48-KGE



Ver legenda da Figura 1.

Figura 34: Reatividade do vLLCRM8 ou do vLLCRM48-KGE com diferentes AcM



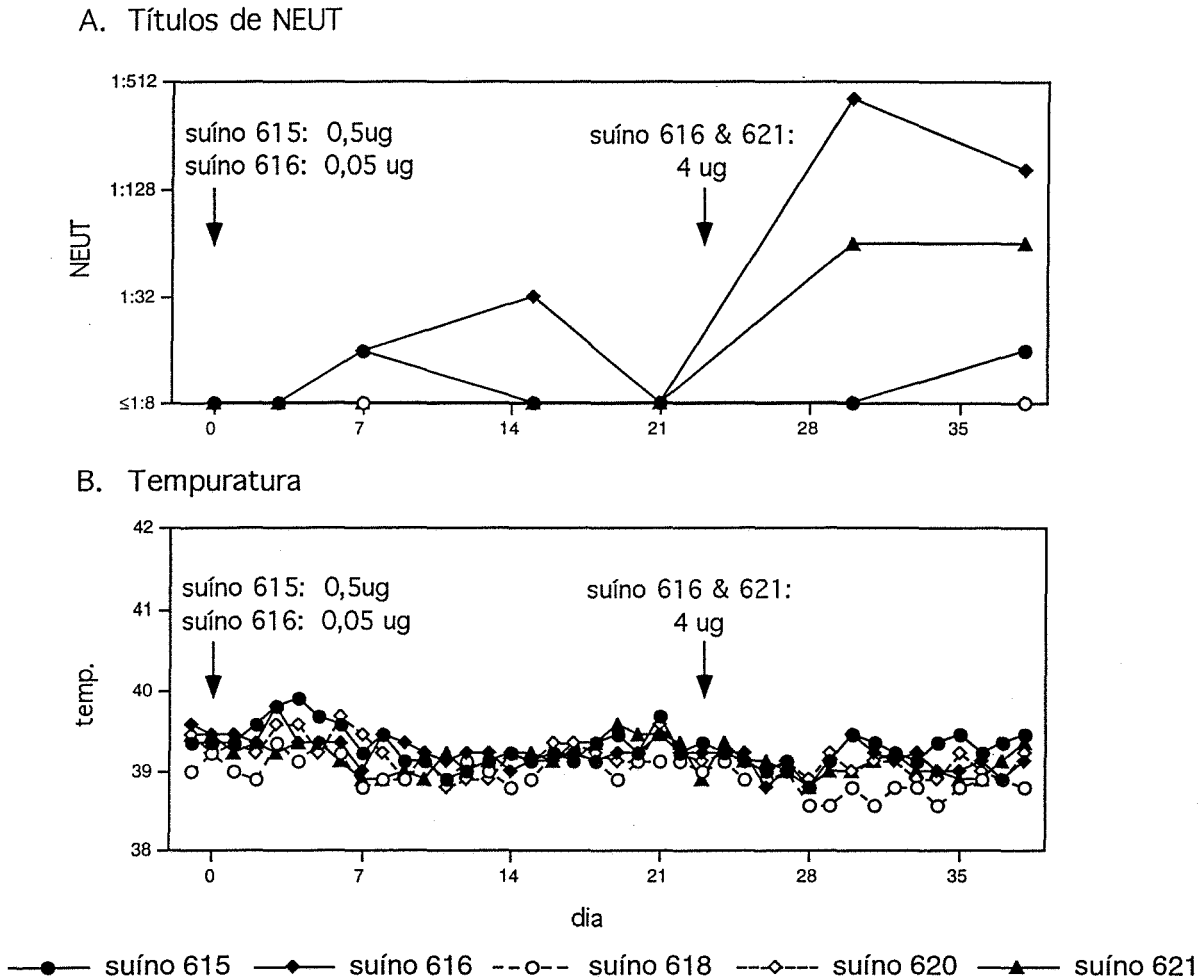
Quantidades iguais de vírus purificados no gradiente de sacarose, radioativamente marcados, foram reagidos com AcM e a quantidade de radioatividade precipitada por *S. aureus* foi determinada como descrito (ver Métodos). Sem Ac indica nenhuma adição de anticorpos na reação; 12FE9, AcM específico no reconhecimento de um epítipo em VP1 no vírus O1 Brugge (STAVE *et al.*, 1988); 10GA, AcM específico no reconhecimento de um epítipo fora de VP1 no vírus O1 Brugge (STAVE *et al.*, 1988); 34CH4, AcM que reconhece um epítipo não determinado no vírus O1 Campos (ALONSO *et al.*, 1994); 12DB7, 12BB5, 11AD6 e 12FA5, AcM conformacionais específicos do vírus O1 Campos (ALONSO *et al.*, 1994); 11HC10, AcM específico no reconhecimento de um epítipo em VP1 no vírus O1 Campos (ALONSO *et al.*, 1994).

KGE no vLLCRM48-KGE, e ambos os AcM, provavelmente, reconhecem o mesmo epitopo.

O vLLCRM48-KGE foi testado para demonstrar a sua inocuidade em 5 suínos utilizando-se de um protocolo similar ao utilizado para o vCRM8 e vLLCRM8. Entretanto, este grupo de animais foi mantido por um tempo maior para assegurar a não ocorrência de virulência e inabilidade do vírus de se transmitir para os animais não inoculados. Os animais foram monitorados diariamente durante os primeiros 11 dias, e a partir daí, apenas 3 vezes por semana, durante os 27 dias restantes do experimento. Os dois animais inoculados no dia 0 com 0,5 e 0,05 μg de vírus, suínos 615 e 616, não mostraram nenhum sinal da doença e nenhum dos 5 animais apresentaram temperatura elevada (Figura 35), nenhuma formação de vesículas e nenhum sinal de fraqueza, o que demonstrou que o vLLCRM48-KGE foi atenuado em suínos.

Os suínos 615 e 616 começaram a desenvolver títulos de anticorpos neutralizantes por volta do 7º dia (PRN70 de 1:16) (Figura 35). No 23º dia de experimento, cada um dos suínos, 616 e 621, foram inoculados com 4 μg de vLLCRM48-KGE. O soro destes suínos foi coletado 15 dias depois, e mostrou títulos de NEUT de 1:160 e 1:64 (Figura 35) para os suínos 616 e 621, respectivamente. Durante todo o experimento, nenhum dos animais não inoculados produziram uma resposta imune específica para o VFA (Figura 35). Por ensaios de RIP, apenas os suínos 616 e 621 desenvolveram anticorpos específicos contra o vírus da aftosa e estes anticorpos não reconheceram a proteína viral não-estrutural, 3D (dados não mostrados).

Figura 35: Títulos de NEUT (Painel A) e temperatura (Painel B) de um grupo de suínos mantidos no mesmo ambiente, inoculados com vLLCRM48-KGE



Os animais indicados foram inoculados com a quantidade de vírus mostrada nos dias 0 e 23. Painel A: Os títulos de NEUT foram determinados para os soros pré-imune (mostrado no dia 0) e soros coletados nos dias 3, 7, 15, 21, 30 e 38. Os valores mostram a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 70%. (ver Métodos). Painel B: Mostra a temperatura retal dos animais durante o curso do experimento. A infectividade específica do vírus utilizado neste experimento variou de 7.000.000 a 20.000.000 ufp/ μ g.

3.3.3 Teste de segunda geração de candidatos a vacinas

Um experimento para testar a habilidade do vLLCRM48-KGE para funcionar como vacina quando administrado pelas rotas intradermal (id) e subcutânea (sc) foi realizado. Além disso, um plasmídeo candidato a vacina de DNA, o pWRM-LLCRM48-KGE, que codifica o genoma do vLLCRM48-KGE foi também testado pelas rotas intradermal e via "gene gun". Neste experimento, foram utilizados 20 suínos separados em 3 ambientes. No primeiro ambiente, 2 animais foram inoculados via intramuscular (im) com o vCRM8 inativado com BEI em emulsão de óleo mineral (ver métodos e Tabela 8); no 2º ambiente, 2 suínos não foram inoculados, 6 foram inoculados com 6 injeções de pWRM-LLCRM48-KGE (ver métodos e Tabela 8) via "gene gun" e 2 foram inoculados com o pWRM-LLCRM48-KGE via id (ver métodos e Tabela 8). No 3º ambiente, 2 suínos não foram inoculados, 3 foram inoculados com o vLLCRM48-KGE via id e 3 foram inoculados com o vLLCRM48-KGE via sc (ver métodos e Tabela 8). Duas semanas depois, uma metade (3) dos animais vacinados via "gene gun" e ambos os animais vacinados com o DNA via id receberam uma segunda dose utilizando-se a rota empregada na primeira imunização (Tabela 8).

Nenhum dos 20 animais deste experimento, apresentaram temperatura elevada ou qualquer sinal da doença aftosa. O suíno 975, no grupo inoculado via id com o pWRM-LLCRM48-KGE mostrou um título de neutralização no 28º d.p.i. de 1:64, mas nenhum dos suínos no grupo inoculado com o pWRM-LLCRM48-KGE via "gene gun" (3 animais foram vacinados uma vez e 3 foram vacinados 2 vezes), apresentou resposta imune específica contra o vírus da febre aftosa. Apenas 2 dos 6 suínos, 989 e 997, inoculados com o vírus

Tabela 8: Resposta imune de suínos ao vírus inativado com BEI, à vacina de DNA (pWRM-LLCRM48-KGE) ou ao vírus vivo (vLLCRM48-KGE)..

animal	vacina	rota ^a	doses ^b	título de NEUT ^c
900	vírus BEI	im (óleo)	1 x 4 µg	>1:12.800
915	vírus BEI	im (óleo)	1 x 4 µg	>1:12.800
920	nenhuma		-	<1:8
921	nenhuma		-	<1:8
932	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	1 x 3 µg	<1:8
934	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	1 x 3 µg	<1:8
938	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	1 x 3 µg	<1:8
952	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	2 x 3 µg	<1:8
956	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	2 x 3 µg	<1:8
958	pWRM-LLCRM48-KGE	"gene gun"	2 x 3 µg	<1:8
975	pWRM-LLCRM48-KGE	id	2 x 200 µg	1:64
976	pWRM-LLCRM48-KGE	id	2 x 200 µg	<1:8
982	nenhuma		-	<1:8
983	nenhuma		-	<1:8
985	vLLCRM48-KGE	id	1 x 4 µg	<1:8
989	vLLCRM48-KGE	id	1 x 4 µg	1:16
994	vLLCRM48-KGE	id	1 x 4 µg	<1:8
996	vLLCRM48-KGE	sc	1 x 4 µg	<1:8
997	vLLCRM48-KGE	sc	1 x 4 µg	1:16
999	vLLCRM48-KGE	sc	1 x 4 µg	<1:8

Legenda da Tabela 8:

- a Inoculações via im foram feitas no músculo quadríceps; inoculações via "gene gun" foram feitas na região inguinal, com 6 injeções de 0,5 µg de DNA acoplado a 0,5 mg de ouro, por imunização; inoculações via id foram feitas na orelha com 200 µl of DNA diluído a uma concentração de 1 mg/ml em PBS, e com 200 µl de vírus vivo purificado no gradiente contínuo de sacarose diluído a uma concentração de 20 µg/ml em BME; inoculações via sc foram feitas na área posterior da escápula com 3 ml de vírus diluído a uma concentração de 1,3 µg/ml em BME.
- b Imunizações foram administradas na semana 0 para uma dose ou nas semanas 0 e 2 para 2 doses, utilizando a quantidade de vacina indicada.
- c Título de anticorpos NEUT (diluição do soro capaz de reduzir o número de placas por 70%) no soro obtido na semana 4 (ver Métodos).

vivo vLLCRM48-KGE apresentaram uma resposta imune no 28º d.p.i., com título de NEUT de 1:16 (Tabela 8). Entretanto, no experimento de inocuidade listado na Figura 34 A, título de 1:64 foi detectado em um único animal, 621, o qual foi inoculado com 4 µg de vírus pela combinação da rota id e da esfoliação da pele na banda coronária na pata direita do animal e no lado direito do nariz, sugerindo que esta combinação da rota de inoculação foi mais efetiva que a inoculação sc ou inoculação via id na orelha. Os títulos de NEUT dos animais inoculados intramuscularmente com o vCRM8 inativado com BEI foram consideravelmente maiores do que aqueles obtidos ou com o vLLCRM48-KGE vivo, ou na forma de DNA (Tabela 8).

DISCUSSÃO

Vacinas contra doenças infecciosas tem sido dos acontecimentos mais sucedidos na história da medicina humana e veterinária. Não apenas tem contribuído em larga escala para a erradicação da varíola, da poliomelite, mas também sido instrumento no controle de outras doenças humanas. Igualmente importante, tem sido o desenvolvimento na medicina veterinária de vacinas para controlar a leptospirose, febre aftosa, toxoplasmose, doença de Newcastle, etc (CONNELL *et al.*, 1992; PLOTKIN, 1993).

O desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da febre aftosa inativada quimicamente tem levado à erradicação da doença no oeste da Europa (BROWN, 1992) e a sua gradual eliminação em outros países. Embora estas vacinas mortas tem sido efetivas, problemas periódicos, incluindo falhas na produção de vacinas (KING *et al.*, 1981; BECK & STROHMAIER, 1987), desenvolvimento do estado carreador em alguns animais vacinados após o contato com o VFA (BACHRACH, 1968, 1978; SALT, 1993), e uma imunidade de vida curta nos animais vacinados, tem sido identificados (BACHRACH, 1968). Várias tentativas tem sido feitas para desenvolver vacinas de vírus vivos atenuados, derivados por passagens em hospedeiros alternados e/ou em culturas de tecidos, mas tem sido difícil obter vírus que são ao mesmo tempo, atenuados e imunogênicos (BACHRACH, 1968; BROOKSBY, 1982). Um adicional problema com os vírus vivos atenuados é a possibilidade da reversão da virulência.

Nos últimos 15 anos, nós temos adquirido uma informação compreensiva do genoma do VFA, incluindo a identificação e caracterização parcial de todas as proteínas estruturais e não estruturais virais e o conhecimento do seu papel na replicação do vírus, bem como o entendimento da função das regiões não codificadoras do genoma viral. Mais recentemente, a seqüência completa de nucleotídeos de um número de subtipos e sorotipos do

VFA tem sido determinado e clones de cDNA contendo o genoma total do tipo O1 (ZIBERT *et al.*, 1990) e A12 (RIEDER *et al.*, 1993) tem sido construídos. O extensivo conhecimento do vírus a nível molecular e a facilidade de manipulação do DNA recombinante, permitem o desenvolvimento racional da vacina viral viva atenuada a partir de clones de cDNA contendo o genoma total (FLC) (ver Introdução).

O reconhecimento do vírus pelos receptores específicos de superfície celular representa uma chave determinante no tropismo nas células e nos tecidos do hospedeiro. Apesar do acúmulo de informações sobre a ligação dos vírus às células e as etapas subsequentes, incluindo captação e desencapsidação, não são bem entendidas (WIMMER, 1994; HAYWOOD, 1994). Além disso, existe pouca informação sobre a participação de diferentes moléculas de superfície celular na internalização.

Baseado no mapeamento dos sítios de ligação a AcM e na alta conservação da seqüência da proteína VP1 no VFA, PFAFF *et al.* (1988) propuseram que a seqüência dos aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico (RGD) do VFA poderia funcionar na ligação celular. A importância desta seqüência na interação do vírus com as células tem sido demonstrada, por métodos genéticos moleculares e por estudos bioquímicos mostrando que peptídeos e anticorpos anti-integrina podem inibir a ligação do vírus às células (ver Introdução). Recentemente foi produzido em nosso laboratório um VFA sorotipo A12, alterado geneticamente, no qual estes três aminoácidos foram deletados, produzindo uma partícula viral incapaz de se ligar às células (McKENNA *et al.*, 1995) (ver Introdução).

Estudos tem mostrado, que além da ligação das células infectantes via receptor natural, o VFA pode também infectar as células através do receptor Fc de imunoglobina na presença de Ac específicos (MASON *et al.*, 1993).

Esta observação sugere que, no caso do VFA, o receptor natural pode apenas servir como local de ancoragem do vírus às células e que a captação pelas células susceptíveis poderia ser dissociada da ligação. Baseado nesta suposição, RIEDER *et al.* (1996) produziram um receptor funcional a partir da junção do domínio de um Ac específico contra o VFA sorotipo A12 (2PD11), que se liga ao antígeno, a uma molécula de superfície celular (ICAM1), originalmente expressada nas células CHO, produzindo a linhagem CHO11.1.

Nós temos mostrado aqui, que o vírus A24, cepa vacinal, se propaga facilmente em cultura de células BHK e demonstra uma alta capacidade de se ligar e crescer nas células CHO11.1 (ver acima). A fácil adaptação deste vírus nas células CHO11.1, sugere que ele pode penetrar nas células utilizando o receptor sintético (ver acima), que facilitaria a sua produção em larga escala, em condições de completa segurança biológica (ver Introdução). Nós também temos demonstrado através de um painel de AcM, que os vírus adaptados nesta linhagem de células, podem ser distinguidos daqueles propagados em células BHK, pelo AcM 2PD11 (ver Introdução), indicando que estes vírus poderiam ser selecionados para manipulação do genoma, na tentativa de se produzir um vírus atenuado com deleção na região codificadora dos aminoácidos RGD, importantes na interação celular (ver Introdução).

A integrina $\alpha v\beta 3$ tem mostrado atuar nas células de primatas como um receptor para internalização do VFA tipo A12 (BERINSTEIN *et al.*, 1995). Recentemente, tem sido sugerido que a ligação celular via a seqüência RGD no vírus sorotipo O1 poderia ser facilitada pela interação inicial do vírus com o heparan sulfato (HS) (JACKSON *et al.*, 1996; SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998), uma molécula de superfície celular que tem sido implicada como receptor celular para outros vírus, incluindo alguns herpesvírus

(SPEAR, 1993; WUDUNN & SPEAR, 1989) e o vírus da imunodeficiência humana (PATEL *et al.*, 1993).

Os picornavírus, ecovírus 1, 8, 9 e 22 (BERGELSON *et al.*, 1992, 1993; PULLI *et al.*, 1997; ZIMMERMANN *et al.*, 1997) e o vírus coxsackie A9 (ROIVAINEN *et al.*, 1994) utilizam integrinas de superfície celular como receptores, embora tem sido sugerido que o coxsackie A9 e o ecovírus 9/Barty (ROIVAINEN *et al.*, 1996, ZIMMERMANN *et al.*, 1997) podem também utilizar receptores não relacionados às integrinas, para infectar as células. As integrinas também tem sido descritas como receptores para os rotavírus (COULSON *et al.*, 1997) e para os papilomavírus (EVANDER *et al.*, 1997).

4.1 DESENVOLVIMENTO DO cDNA CONTENDO O GENOMA COMPLETO (FLC) DO VÍRUS A24

Nós temos construído cDNAs contendo o fragmento L do genoma do vírus A24, inserido no esqueleto do vírus A12, o qual tem servido como cepa protótipo para estudos de biologia molecular em P.I.A.D.C. A inserção do fragmento L A24 no genoma do vírus A12, contendo o fragmento S e o poli(C) tem facilitado a organização do FLC A24, pois desde que estas seqüências são altamente conservadas (BUNCH *et al.*, 1994), é muito pouco provável que a utilização das seqüências do A12 poderiam influenciar nas propriedades do genoma resultante. A partir desta construção, nós temos produzido 2 FLC A24, os pAM12 e pAM46. Ao contrário do pAM12, que tem mostrado uma infectividade específica alta, o pAM46 tem mostrado ser pobremente viável, embora correções futuras, poderiam torná-lo viável.

A existência de outros vetores baseados no A12, a disponibilidade da seqüência completa do vírus A12 e os dados de literatura que mostram a importância da região P1 na codificação de importantes porções antigênicas dos diferentes tipos de VFA, nos levaram a utilizar uma outra estratégia de clonagem, onde apenas a região P1/2A do A24 seria inserida no pRMC35 A12 (RIEDER *et al.*, 1993). Assim, tem sido produzido 2 vírus quiméricos, vARM8 (originários a partir dos vírus propagados em células BHK) e vARM10 (originários a partir dos vírus adaptados em células CHO11.1) (Figura 7), os quais crescem bem em cultura de tecidos BHK e/ou CHO11.1 e mostram fenótipo de placas indistinguíveis entre eles e indistinguíveis do estoque de vírus preparado da cepa vacinal proveniente do C.P.F.A. A fácil adaptação do vARM10 nas células que expressam o receptor sintético para o VFA sorotipo A12 (CHO11.1), nos levou a manipular o seu genoma, através da produção de deleções ou mutações no seu sítio de ligação ao receptor celular, com vistas à produção de vacinas atenuadas. A viabilidade destes vírus quiméricos (vARM8 e vARM10) indica que o gene do capsídeo viral pode ser complementado por outros genes (Figura 1; SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997).

A verificação da autenticidade dos vírus quiméricos através de um painel de AcM, tem mostrado, como esperado, que estes vírus são capazes de reagirem com os AcM A24, incluindo os anticorpos monoclonais utilizados no controle de qualidade de vacinas. Um AcM A12, 2PD11, tem sido capaz de diferenciar os 2 vírus quiméricos, desde que ele reage com o vARM10, mas não reage com o vARM8. Isto demonstra que o crescimento do vARM10 nas células CHO11.1, tem sido capaz de selecionar os vírus com a capacidade de expressarem o epitopo conformacional necessário no reconhecimento do AcM

2PD11, confirmando a natureza *quasispecies* do genoma do VFA (DOMINGO *et al.*, 1992, 1993), que permite a sua rápida adaptação a um novo ambiente.

Uma comparação da seqüência da região codificadora P1/2A entre os plasmídeos, pARM8 e pARM10 e destes com a seqüência P1/2A proveniente do laboratório de Pirbright (Pir), revela um alto grau de homologia de nucleotídeos e aminoácidos. Não está claro se as 2 substituições de aminoácidos observadas em VP1 entre os pARM8 e pARM10, são necessárias para o reconhecimento do vARM10 pelo AcM 2PD11. Nem o resíduo 56, nem o resíduo 99 estão localizados próximo ao resíduo 178 em VP3 (Figura 12), previamente associado com o epítipo 2PD11 no VFA sorotipo A12 (RIEDER *et al.*, 1996). Entretanto, o "footprint" do anticorpo poderia cobrir VP3 e um ou ambos os sítios em VP1.

A adaptação dos nossos vírus quiméricos às células CHO, as quais parecem faltar a integrina, que é capaz de se ligar à seqüência RGD em VP1 no VFA sorotipo A12 (MASON *et al.*, 1993, 1994) e no sorotipo O1 virulento em bovino (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998), não resultaram na produção de vírus contendo adição de cargas e não demonstraram a habilidade para crescerem de uma maneira independente de integrina, como foi descrito para o vírus O1 Campos adaptado em cultura de tecidos (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997).

Uma associação de mudanças nos resíduos do capsídeo do VFA sorotipo A12 durante as passagens em cultura de células (RIEDER *et al.*, 1994b) tem sido descrita. Um trabalho recente com o sorotipo O1 Campos, mostrou que os vírus com capsídeos adaptados em cultura de tecidos não foram virulentos em bovinos (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997). Entretanto, nós necessitamos demonstrar se os nossos vírus quiméricos, vARM8 e vARM10, irão manter a virulência, após passagens em cultura de células. Nós temos mostrado que

estes vírus são altamente patogênicos em suínos e que eles tem espalhado rapidamente entre os animais. Como esperado, os suínos inoculados com os vírus vARM8 e vARM10 e os animais colocados em contato com estes suínos, tem desenvolvido um alto título de anticorpos neutralizantes e anticorpos contra a proteína não estrutural 3ABCΔ. A alta virulência destas cepas quiméricas tem sido um marco em nosso trabalho, desde que nos forneceu uma cepa altamente virulenta para ser utilizada em teste de mutações atenuantes, tais como a deleção da região codificadora da proteinase líder.

4.2 PRODUÇÃO DO VÍRUS QUIMÉRICO A24 CRUZEIRO DELETADO DA REGIÃO CODIFICADORA DOS AMINOÁCIDOS RGD

Baseado no sistema A12 (ver Introdução), nós temos descrito a deleção da região codificadora dos aminoácidos RGD no genoma do vARM10, designado para crescer independentemente do RGD. O vírus resultante, vARM10-RGD⁻, tem mostrado ser viável e tem sido demonstrado através de um painel de AcM, que ele mantém as mesmas características imunogênicas do vírus contendo a seqüência RGD (vARM10), exceto que ele não tem sido reconhecido pelo AcM 16EC11, o qual sabe-se que reconhece um epitopo em VP1 (ALONSO *et al.*, 1994), sugerindo que provavelmente este epitopo inclui a região deletada. Este vírus, diferentemente do vARM10, tem sido capaz de crescer e formar placas, apenas nas células que expressam o receptor sintético (CHO11.1).

Em um trabalho prévio descrito por McKENNA *et al.* (1995), bovinos inoculados intramuscularmente (im) com o vírus A12 deletado da região

codificadora dos aminoácidos RGD emulsificado em óleo mineral, mostraram títulos de anticorpos neutralizantes semelhantes aos animais inoculados com o vírus inativado com BEI emulsificado em óleo mineral, e nenhum deles desenvolveu os sinais clínicos da doença aftosa. Por outro lado, suínos inoculados com o vírus A24 deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD, pela combinação da rota intradermal com a esfoliação da pele, tem demonstrado ser dramaticamente atenuado, com o aparecimento de uma doença bastante leve. Uma reatividade contra a proteína não estrutural 3ABCΔ tem sido detectada no soro do suíno inoculado 628. Desde que a preparação do vírus utilizada na infecção dos animais, tem sido obtida através da purificação no gradiente contínuo de sacarose, apenas as proteínas estruturais do capsídeo estariam presentes, sugerindo que a alta resposta a 3ABCΔ detectada no suíno 628 (ver ítem 3.2.1.3.1 e Figura 23), provavelmente estaria relacionada com a replicação do vírus. O vírus também tem sido recuperado a partir de amostras coletadas dos animais 628 e 630, confirmando replicação nestes animais. Estes vírus recuperados mostram a mesma seqüência na alça G-H e o mesmo padrão de crescimento em cultura de tecidos, ou seja, não tem sido capazes de crescer em células BHK, como demonstrado para o vírus utilizado na inoculação.

Recentemente, mutações nos resíduos do capsídeo, tem sido produzidas por engenharia genética, levando o vírus a adquirir a habilidade de se ligar às células por outros caminhos. MARTINEZ *et al.* (1997), mostraram que clones individuais do VFA sorotipo C contendo substituições de aminoácidos em diferentes locais no capsídeo, dispensam o uso do RGD no reconhecimento celular. A dispensabilidade do RGD poderia refletir ou no relaxamento das características estruturais necessárias para reconhecer a integrina celular ou na aquisição pelo VFA da habilidade para reconhecer completamente uma nova

molécula receptora (MARTINEZ *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado que as substituições encontradas no capsídeo do vírus C1, incluem um grupo de resíduos carregados positivamente, os quais permitem o crescimento destes vírus na ausência dos aminoácidos RGD (MASON, dados não publicados). Parece que estes vírus tem sido capazes de crescer ligando-se à superfície celular via glicosaminoglicanos (GAG), tais como heparan sulfato. Tanto o vARM10-RGD⁻ A24 proveniente do crescimento em cultura de células como o recuperado dos animais, não parece ser capaz de crescer de uma maneira independente de RGD. Entretanto, algum crescimento limitado mediado pela baixa afinidade de ligação, pode ser possível, quando uma alta concentração de vírus é inoculada diretamente no tecido compactado. Por outro lado, este vírus não tem sido capaz de ser transmitido para os outros animais não inoculados mantidos no mesmo ambiente.

O fato destes vírus mostrarem uma capacidade de adaptação às células CHO11.1 e deles não espalharem para outros animais, nos leva a sugerir que eles poderiam ser utilizados como fontes seguras de antígeno. Assim o VFA sorotipo A24 Cruzeiro deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD (vARM10-RGD⁻), poderia ser utilizado na produção das vacinas tradicionais de uma forma mais segura do que a utilizada hoje em dia, onde o antígeno é preparado a partir do VFA altamente virulento.

4.3 PRODUÇÃO DOS VÍRUS QUIMÉRICOS A24 CRUZEIRO E O1 CAMPOS DELETADOS DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEINASE LÍDER (L)

Nós temos descrito previamente a construção e caracterização de um vírus, derivado de uma cepa protótipo do VFA do nosso laboratório, pela deleção da região do genoma que codifica a proteinase L (ver Introdução). Este vírus, designado A12-LLV2, mostrou muitas das propriedades desejadas de uma cepa vacinal atenuada em bovinos e suínos (ver Introdução).

Neste trabalho, nós temos descrito a produção e caracterização dos sorotipos A24 Cruzeiro e O1 Campos líder menos (LL), baseados nas cepas vacinais em uso corrente na América do Sul.

Para explorar o papel da proteinase L na replicação viral, nós temos produzido genomas virais sintéticos faltando o gene L, os quais expressam os capsídeos virais do sorotipo A24 Cruzeiro, pLLARM8, e os capsídeos virais do sorotipo O1 Campos, pLLCRM8, no esqueleto do A12 e testado suas viabilidades nas células e animais. Como descrito para o A12-LLV2 (ver Introdução), nossos estudos demonstram que os vLLARM8 A24 e vLLCRM8 O1, também replicam mais vagarosamente em cultura de tecidos e que eles mostram fenótipo de placa em células BHK diferente do fenótipo de placa apresentados pelos tipos contendo a proteinase L (vARM8 e vCRM8). Nós temos encontrado que os vírus líder menos (LL) (independente do sorotipo do seu capsídeo) são incapazes de formar placas nas células LK. Portanto, a ausência da proteinase líder, a qual causa o bloqueio da síntese proteica no hospedeiro, poderia fazer com que as células infectadas pelos vírus LL, se tornassem altamente susceptíveis às respostas anti-virais primárias, incluindo a indução de um estado anti-viral causado pelo interferon e outras citocinas.

A inocuidade do vLLCRM8 O1 Campos em bovino foi demonstrada pela direta inoculação dentro da língua de um único bovino, o qual após ter recebido uma grande dose de vírus no sítio mais sensível de inoculação, não tem mostrado nenhum sinal da doença aftosa. Entretanto, em um experimento

preliminar, suínos inoculados com 6 µg do vLLCRM8 pela rota sc mostraram vesículas pequenas e o vírus também causou doença nos animais não-inoculados mantidos no mesmo ambiente (dados não mostrados).

Para se fazer uma possível caracterização da doença causada pelo vLLARM8 A24 Cruzeiro e pelo vLLCRM8 O1 Campos em suínos, estudos de transmissão por contato e virulência tem sido realizados, com o objetivo de compará-los aos seus pares contendo a proteinase líder, vARM8 e vCRM8. Suínos inoculados com vARM8 ou vCRM8 e animais colocados em contato com estes suínos, tem mostrado sinais severos, típicos da doença aftosa (Figura 14 e 31). Suínos inoculados com vLLARM8 tem apresentado uma doença bastante leve, consistindo de vesículas pequenas nos animais inoculados e com altos títulos de anticorpos neutralizantes. Um dos animais inoculado com o vLLARM8, o animal 623, tem mostrado uma resposta positiva contra a proteína não-estrutural 3ABCΔ, indicando que o vírus estava replicando, embora numa proporção menor, se comparado com o seu equivalente contendo a região líder (Figuras 15 e 27). Nós não temos sido capazes de detectar uma transmissão para os animais não inoculados neste grupo de suínos.

No experimento onde os suínos tem sido inoculados com o vLLCRM8, apenas um dos animais inoculados, suíno 2, tem desenvolvido uma doença bastante amena, e o vírus tem sido transmitido para um dos 3 animais não inoculados (Figura 30). Embora estes estudos mostram que os vírus LLA24 e LLO1 tem sido dramaticamente atenuados, se comparados aos vírus equivalentes contendo a região líder, a habilidade destes vírus para causar a doença, dificulta o uso deles no desenvolvimento de candidatos a vacinas.

Desde que a virulência limitada mostrada pelo vLLARM8 A24 Cruzeiro e vLLCRM8 O1 Campos, não foi observada para o A12-LLV2

(CHINSANGARAM *et al.*, 1998), uma explicação provável para a virulência do vLLCRM8 O1 Campos, é que ele contém o capsídeo vCRM8, altamente virulento em bovino (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997). O mesmo foi observado para o vLLARM8 A24 Cruzeiro, o qual contém o capsídeo de vARM8, que também tem mostrado ser altamente virulento em suíno. Por outro lado, embora o A12-LLV2 tenha sido derivado de um isolado de VFA proveniente de um grande número de passagens, o vírus A12 contendo a região L não foi bastante virulento em bovino (MASON *et al.*, 1997).

4.4 ADIÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR MUTADO AO VIRUS O1 CAMPOS DELETADO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEINASE LÍDER (L) E A SUA CONVERSÃO À FORMA DE VACINA DE DNA

Um caminho para obter uma cepa mais atenuada seria alterar as características de ligação celular do capsídeo. Em um trabalho recente, foi mostrado que os vírus contendo o capsídeo do tipo O1, contendo seqüências adaptadas em culturas de células responsáveis pela ligação à heparina, são atenuados em bovinos (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997). Uma caracterização posterior do vírus que liga à heparina, tem demonstrado que eles não necessitam da seqüência RGD para ligar às células em cultura. Assim, derivados viáveis do capsídeo tipo O1 mutados da região codificadora dos aminoácidos RGD, tem sido recentemente produzidos e suas propriedades em cultura de tecidos tem sido caracterizadas (NEFF *et al.*, 1998). A introdução da seqüência do capsídeo do vírus deletado da região codificadora dos aminoácidos RGD dentro do genoma do vLLCRM8 O1 Campos levou a

produção de um vírus, o vLLCRM48-KGE, que tem mostrado uma estrutura antigênica e fenótipo de placa viral esperados, além de serem atenuados em suínos.

Os dados de imunoreatividade mostram que o vLLCRM8 e o vLLCRM48-KGE podem ser distinguidos por um AcM 34CH4, que parece reconhecer como epitopo, o sítio determinante do fenótipo de placa do vírus, o qual é capaz de reconhecer o HS como receptor de superfície celular (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997, NEFF *et al.*, 1998). O teste de habilidade do vLLCRM48-KGE para induzir a resposta de NEUT em suínos, tem demonstrado que este candidato a vacina, mostra um desempenho pobre, quando administrado pelas rotas id ou sc. Isto tem sido de alguma maneira surpreso, desde que o A12-LLV2, produziu consideravelmente uma melhor resposta, quando 2 µg do vírus foram administrados em suínos pela rota sc (Títulos de NEUT de 1:80 a 1:320; CHINSANGARAM *et al.*, 1998). O pobre desempenho do candidato a vacina do sorotipo O1, provavelmente, resulta da restrição do acesso aos mais susceptíveis tipos celulares pela ligação ao receptor não natural HS (SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997; NEFF *et al.*, 1998), e a inabilidade do vírus para se multiplicar de uma maneira eficiente, desde que ele não é capaz de causar o bloqueio da síntese proteica no hospedeiro (DEVANEY *et al.*, 1988; PICCONE *et al.*, 1995). Embora o A12-LLV2 também apresenta o capsídeo adaptado à cultura de tecidos, ele mantém a seqüência RGD. Além disso, as diferenças entre os fenótipos dos vírus A12, derivados de passagem em bovino e adaptados em cultura de tecidos, não envolvem diferenças na ligação da heparina (resultados não publicados) e não são tão profundas como aquelas observadas entre os derivados virulentos em bovinos e derivados de cultura de tecidos do vírus O1 (RIEDER *et al.*, 1994b; SÁ-CARVALHO *et al.*, 1997).

Um dos pontos chaves das vacinas atenuadas é a sua habilidade de estabelecer uma infecção subclínica, resultando na produção de quantidades suficientes de antígeno, capazes de induzir uma resposta imune protetora (MURPHY & CHANOCK, 1996). Consequentemente, a eficácia das cepas vacinais vivas atenuadas, depende da habilidade destas cepas de fugirem da vigilância do hospedeiro durante a fase de produção de antígeno. No caso do VFA, um importante método que o vírus utiliza para vencer a resposta imune inata do hospedeiro, é a inibição da tradução do mRNA do hospedeiro.

As vacinas existentes dos VFA inativadas quimicamente contêm grandes quantidades de vírions inativados, que são altamente imunogênicos quando administrados com um adjuvante. Neste estudo, nós temos mostrado que a administração de uma quantidade similar do vLLCRM48-KGE vivo, o qual tem demonstrado ser restrito na sua habilidade para se espalhar e replicar, tem produzido uma resposta imune bastante pobre. Os problemas que nós temos encontrado na produção por engenharia genética de uma vacina atenuada tem sido previamente descritos para a atenuação clássica do VFA (BROOKSBY, 1966).

A vacina de DNA carreando o genoma do vLLCRM48-KGE, tem produzido uma resposta individual mais alta neste experimento. Entretanto, este candidato à vacina de DNA, tem mostrado um desempenho mais pobre do que a vacina tipo A12, que codificou o genoma contendo a região codificadora da proteinase líder e o capsídeo desprovido do sítio de ligação celular (WARD *et al.*, 1997). Ambas as vacinas de DNA produziram partículas virais que não poderiam entrar na maioria das células susceptíveis, devido à mutação ou deleção da seqüência RGD. Diferenças na imunogenicidade destes plasmídeos, sugerem que a deleção da região codificadora da região líder, poderia comprometer severamente a replicação do vírus nas células transfectadas no

hospedeiro, impedindo uma produção significativa de antígeno (ver acima). Isto sugere que métodos alternativos de atenuação, como mudanças em outras regiões do genoma e mesmo combinação de diferentes mudanças, poderiam ser melhores para produzir genomas atenuados para a expressão de vacinas de DNA.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, R.; FRY, E.; STUART, D.; FOX, G.; ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989) The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 resolution. *Nature* **337**: 709-716.
- AKIYAMA, S.K. & YAMADA, K.M. (1985) Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* **260**: 10402-10405.
- ALMEIDA, M.R.; RIEDER, E.; CHINSANGARAM, J.; WARD, G.; BEARD, C.; GRUBMAN, M.J. & MASON, P.W. (1998) Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease; difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. *Virus Res.*, in press.
- ALMOND, J. (1987) The attenuation of poliovirus neurovirulence. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 153-180.
- ALONSO, A.; DARSIE, G.C.; TEIXEIRA, A.C.; REIS, J.L. & MESQUITA, J.A. (1994) Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **12**: 682-686.
- ARLINGHAUS, R. & POLATNICK, J. (1969) The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**: 821-829.
- ARNOLD, E.; LUO, M.; VRIEND, G.; ROSSMAN, M.; PALMENBERG, A.; PARKS, G.; NICKLIN, M. & WIMMER, E. (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 21-25.

- BACHRACH, H.L. (1978) Foot-and-mouth disease : World-wide impact and control measures. In "Viruses and Environment" (KURSTAK, E. & MARAMOROSCH, K., Eds.), pp. 299-310. Academic Press, New York.
- BACHRACH, H.L. (1977) Foot-and-mouth disease virus. Properties, molecular biology and immunogenicity. In: ROMBERGER, J.A. (ed.). Beltsville Symposium in Agricultural Research. I. *Virology in Agriculture*. Allanheld, Osmun, Montclair. pp.3-32.
- BACHRACH, H.L.; MOORE, D.N. ; MCKERCHER, R.D. & POLATNICK, J. (1975) Immune and antibody response to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol.* **115**: 1636-1641.
- BACHRACH, H.L. (1968) Foot-and-mouth disease virus. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**: 201-244.
- BAHNEMANN, H.G. (1990) Inactivation of virus antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine* **8**: 75-88.
- BARTELING, S.J. & VREESWIJK, J. (1991) Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**: 75-88.
- BAXT, B. & MASON, P.M. (1995) Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell culture following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology* **207**: 503-509.
- BAXT, B. & BECKER, Y. (1990) The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot- and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes.* **4**:73- 83.
- BAXT, B.; VAKHARIA, V.; MOORE, D.; FRANKE, A.J. & MORGAN, D.O. (1989) Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **63**: 2143-2151.

- BAXT, B. (1987). Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res.* **7**: 257-271.
- BAXT, B.; MORGAN D.O.; ROBERTSON, B.H. & TIMPONE, C.H. (1984) Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.* **51**:298-305.
- BAXT, B. & BACHRACH, H.L. (1980). Early interaction of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology.* **104**:42-55.
- BECK, E. & STROHMAIER, K. (1987) Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* **61**: 1621-1629.
- BELSHAM, G.J. (1993) Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family: aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **69**: 241-260.
- BELSHAM, G.J. (1990) Intracellular expression and processing of foot-and-mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors: influence of the L protease. *Virology* **176**: 524-530.
- BERGELSON, J.M.; JOHN, N. ST.; KAWAGUCHI, S.; CHAN, B.M.C.; STUBDAL, H.; MODLIN, J. & FINBERG, R.W. (1993). Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the $\alpha 2$ subunit of human VLA-2. *J. Virol.* **67**: 6847-6852.
- BERGELSON, J.M.; SHEPLEY, M.P.; CHAN, B.M.C.; HEMLER, M.E. & FINBERG, R.W. (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* **255**: 1718-1720.
- BERINSTEIN, A.; ROIVAINEN, M.; HOVI, T.; MASON, P.W. & BAXT, B. (1995) Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha V\beta 3$) inhibit

- binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* **69**: 2664-2666.
- BITTLE, J.L.; HOUGHTEN, R.A.; ALEXANDER, H.; SHINNICK, T.M.; SUTCLIFFE, J.G.; LERNER, R.A.; ROWLAND, D.J. & BROWN, F. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**: 30-33.
- BLACK, D. (1975) Proteins induced in BHK cells by infection with foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **26**: 109-120.
- BLACK, D.N.; STEPHENSON, P.; ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1979) Sequence and location of the poly C tract in aphtho-and cardiovirus RNA. *Nucleic Acids Res.* **6**: 2381-2390.
- BOLWELL, C.; BROWN, A.L.; BARNETT, P.V.; CAMPBELL, R.O.; CLARKE, B.E.; PARRY, E.J.; OULDRIDGE, E.J.; BROWN, F. & ROWLAND, D.J. (1989) Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **69**: 2664-2666.
- BOOTHROYD, J.; HARRIS, T.; ROWLANDS, D. & LOWE, P. (1982) The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of FMDV. *Gene* **17**: 153-161.
- BROOKSBY, J.B (1982) Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* **18**: 1-23.
- BROOKSBY, J.B (1966) Standards for modified strain vaccines in foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int.Epiz.* **65**: 1941-1947
- BROWN, C.C.; PICCONE, M.E.; MASON, P.W.; McKENNA, T.S.-C. AND GRUBMAN, M.J. (1996) Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J. Virol.* **70**: 5638-5641.

- BROWN, F. (1995) Antibody recognition and neutralization of foot- and-mouth disease virus. *Sem. Virol.* **6**:243-248.
- BROWN, F. (1992) New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **10**: 1022-1026.
- BROWN, F.; NEWMAN, J.; STOTT, J.; PORTER, A.; FRISBY, D.; NEWTON, C.; CAREY, N. & FELLNER, P. (1974) Poly(C) in animal viral RNAs. *Nature* (London) **251**: 342-344.
- BROWN, F.; CARTWRIGHT, B. & STEWART, D. (1962) Further studies on the infection of pig kidney cells by foot-and-mouth disease virus. *Biochem. Biophys. Acta* **55**: 768-774.
- CALLIS, J. (1984) Foot-and-mouth disease. In: "Foreign animal diseases. Their prevention, diagnosis and control". Committee on foreign animal diseases of the US Animal Health Association pp. 167-177.
- CARRILLO, E.; GIACHETTI, C. & CAMPOS, R. (1984) Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virol.* **135**: 542-545.
- CARRILLO, E. (1985) Replicacion del virus de la fiebre aftosa. Estudio del mecanismo de penetracion. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquimica. Universidad de Buenos Aires.
- CARROLL, A.R.; ROWLANDS, D.J. & CLARKE, B.E. (1984) The complete nucleotide sequence of RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucl. Acids Res.* **12**: 2461-2479.
- CHINSANGARAM, J.; MASON, P.W. & GRUBMAN, M.J. (1998) Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, in press.

- CHOW, M.; NEWMAN, J.F.E.; FILMAN, D.; HOGLE, J.M.; ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**: 482-486.
- CLARK, B.E.; NEWTON, S.E.; CARROLL, A.R.; FRANCIS, M.J.; APPLE-YARD, G.; SYRED, A.D.; HIGHFIELD, P.E.; ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1985) Two initiation sites for FMDV polyprotein *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **66**: 2615-2626.
- CLARK, B.E. & SANGAR, D.V. (1988) Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J. Gen. Virol.* **69**: 2313-2325.
- CONNELL, N.; STOVER, C.K. & JACOBS, W.J. (1992) Old microbes with new faces: Molecular biology and the design of new vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 442-448.
- COOPER, P.; AGOL, V.; BACHRACH, H.; BROWN, F.; GHENDON, Y.; GIBBS, A.; GUILLESPIE, J.; LONBERG-HOLM, K.; HANDEL, B.; MELNICK, J.; MOHANTY, S.; POVERY, R.; RUECKERT, R.; SHAFFER, F. & TYRREL, D. (1978) Picornaviridae: second report. *Intervirol.* **10**: 165-180.
- COSTA GIOMI, M.P.; GOMES, I.; TIRABOSCHI, B.; AUGÉ DE MELLO, P.; BERGMANN, I.E.; SCODELLER, E.A.; AUGÉ DE MELLO, P.; & LA TORRE, J.L. (1988) Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: changes in the size of poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology* **162**: 58-64.
- COULSON, B.S.; LONDRIGAN, S.L. & LEE, D.J. (1997) Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5389-5394.

- COWAN, K. (1973) Antibody response to viral antigens. *Adv. Immunol.* **17**: 195-254.
- CRAWFORD, W. & BALTIMORE, D. (1983) Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus infected cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 7452-7455.
- CROWTHER, J.R.; FARIAS, S.; CARPENTER, W.C. & SAMUEL, A.R. (1993) Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. Gen. Virol.* **74**: 1547.
- CURRY, S.; FRY, E.; BLAKEMORE, W.; ABU-GHAZALEH, R.; JACKSON, T.; KING, A.; LEA, S.; NEWMAN, J.; ROWLANDS, D. & STUART, D. (1996) Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**: 135-145.
- DAWE, P.S.; SORENSON, K.; FERRIS, N.P.; BARNETT, I.T.R.; ARMSTRONG, R.M. & KNOWLES, N.J. (1994) Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Vet. Rec.* **134**: 211-215.
- DELLA-PORTA, A.J. (1983) Current status of foot-and-mouth disease vaccines including the use of genetic engineering. *Aust. Vet. J.* **60**: 129-135.
- DEVANEY, M.A.; VAKHARIA, V.N.; YOYD, R.E.; EHRENFELD, E. & GRUBMAN, M. (1988) Leader protein of FMDV is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* **62**: 4407-4409.

- DiMARCHI, R.; BROOKE, G.; GALE, C.; CRACKNELL, V.; DOEL, T. & MOWAT, N. (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**: 639-641.
- DOEL, T.R.; GALE, C.; Do AMARAL, C.M.C.F.; MULCAHY, G. & DiMARCHI, R. (1990) Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **64**: 2260-2264.
- DOEL, T.R.; GALE, C.; BROOKE, G. & DiMARCHI, R. (1988) Immunization against foot-and-mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *J. Gen. Virol.* **69**: 2403-2406.
- DOMINGO, E.; DIEZ, J.; MARTÍNEZ, M.A.; HERNANDEZ, J.H.; HOLGUIN, A.; BORREGO, B. & MATEU, M.G. (1993) New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J. Gen. Virol.* **74**: 2039-2045.
- DOMINGO, E.; ESCARMÍS, C.; MARTÍNEZ, M.A.; MARTÍNEZ-SALAS, E. & MATEU, M.G. (1992) Foot-and-mouth disease virus populations are *quasispecies*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**: 33-47.
- DONALDSON, A.I. & DOEL, T.R. (1992) Foot and mouth disease. In: Standards Commission (Eds), Office International des Epizooties Manuel of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2nd ed., pp. 1-12. Office International des Epizooties, Paris.
- EGGER, D.; PASAMONTES, L.; BOLTEN, R.; BOYKO, V. & BIENZ, K. (1996) Reversible dissociation of the poliovirus replication complex: functions and interactions of its components in viral RNA synthesis. *J. Virol.* **70**: 8675-8683.

- ESCARMIS, C.; TOJA, M.; MEDINA, M. & DOMINGO, E. (1992) Modification of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res.* **26**: 113-125.
- ETCHISON, D.; MILBURN, S.C.; EDERY, I.; SONENBERG, N.; & HERSHEY, J.W.B. (1982) Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* **257**: 14806-14810.
- EVANDER, M.; FRAZER, I.H.; PAYNE, E.; QI, Y.M.; HENGST, K. & McMILLAN, N.A. (1997). Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
- EVANS, D.M.A.; DUNN, G.; MINOR, P.D.; SCHILD, G.C.; CANN A.J.; STANWAY, G.; ALMOND, J.W.; CURREY, K. & MAIZEL, J.V. (1985) Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* **314**: 548-550.
- FELLNER, P. (1979) General organization and structure of the picornavirus genome. In: The molecular biology of picornaviruses. R. Perez-Bercoff (ed.) pp. 25-48. Nato Advanced Study Institutes Series.
- FERNÁNDEZ TOMAS, C. & BALTIMORE, D. (1973) Morphogenesis of picornavirus. Demonstration of a new intermediate the provirion. *J. Virol.* **12**: 1122-1130.
- FLANEGAN, J.B. & BALTIMORE, D. (1977) Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2677-2680.

- FORSS, S.; STREBEL, K.; BECK, E. & SCHALLER, H. (1984) Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* **12**: 6587-6601.
- FOX, G.; STUART, D.; ACHARYA, R.K.; FRY, E.; ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1987) Crystalization and preliminary x-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J. Mol. Biol.* **196**: 591-597.
- FOX, G.; PARRY, N.R.; BARNETT, P.V.; MCGINN, B.; ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1989) The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence R-G-D (Arginine-Glycine-Aspartic acid). *J. Gen. Virol.* **70**: 625-637.
- GEBAUER, F.; DE LA TORRE, J.C.; GOMES, I.; MATUE, M.G.; BARAHONA, H.; TIRABOSCHI, E.; BERGMANN, I.; AUGÉ DE MELLO, P. & DOMINGO, E. (1988) Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.* **62**: 2041-2049.
- GIACHETTI, C.; CARRILLO, E. & CAMPOS, R. (1986) Further characterization of morphogenetic mutant of the FMDV. *Virus Res.* **6**: 1-13.
- GRIGERA, P. & SAGEDHAL, A. (1986) Cytoskeletal association of an aphthovirus-induced polypeptide derived from the P 3ABC region of the viral polyprotein. *Viol.* **154**: 369-380.
- GRUBMAN, M.J. (1980) The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch. Virol.* **63**: 311-315.
- GRUBMAN, M.J. & BAXT, B. (1982) Translation of foot-and-mouth disease virion RNA and processing of the primary cleavage products in a rabbit reticulocyte lysate. *Virology* **116**: 19-30.

- GRUBMAN, M.J.; ROBERTSON, B.H.; MORGAN, D.O.; MOORE, M.D. & DOWBENKO, D. (1984a) A biochemical map of the polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **50**: 579-586.
- GRUBMAN, M.J. (1984b) *In vitro* morphogenesis of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **49**: 760-765.
- HARGREAVES, S.K. (1994) The control of foot-and-mouth disease in Zimbabwe. O.I.E Scientific Conference on the Control of Foot and Mouth Disease, African Horse Sickness and Contagious Bovine Pleuropneumonia; Gabarone, Botswana, 20-23 April, 1994.
- HARRIS, T.R.J. & BROWN, F. (1977) Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **34**: 75-105.
- HARRIS, T.R.J. & BROWN, F. (1976) The location of the poly(C) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **33**: 493-501.
- HARRIS, T.J.R.; BROWN, F. & SANGAR, D.V. (1981) Differential precipitation of FMDV proteins made *in vivo* and *in vitro* by hyperimmune and virus particle guinea pig antisera. *Virology* **112**: 91-98.
- HAYWOOD, A.M. (1994) Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**: 1-5
- HEDGER, R.S. (1968) The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.* **66**: 27-36.
- HENDERSON, W.M. (1952) A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease. *J. Hyg. Camb.* **50**: 182-194.

- HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B. & SAIKI, R.K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutation of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367.
- HOGLE, J.M.; CHOW, M. & FILMAN, D.J. (1985) The three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**: 1358-1365.
- HOUSE, C. & HOUSE, J.A. (1989) Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cells cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet. Microbiol.* **20**: 99-109.
- HYNES, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- JACKOBSON, M.; ASSO, J. & BALTIMORE, D. (1970) Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *J. Mol. Biol.* **49**: 657-699.
- JACKSON, T.; ELLARD, F.M.; ABU GHAZALEH, R.; BROOKES, S.M.; BLAKEMORE, W.E.; CORTEYN, A.H.; STUART, D.I.; NEWMAN, J.W.I. & KING, A.M.Q. (1996) Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**: 5282-5287.
- JORE, J.; DE GEUS, B.; JACKSON, R.A.; POUWELS, P.H. & ENGERVALK, B.E. (1988) Polio virus protein 3CD is deactive protease for processing of the precursor protein P1 *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **69**: 1627-1636.
- KITSON, J.D.A.; McCAHON, D. & BELSHAM (1990) Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* **179**: 26-34.

- KLEID, D.G.; YANSURA, D.; SMALL, B.; DOWBENKO, D.; MOORE, D.M.; GRUBMAN, M.J.; McKERCHER, P.D.; MORGAN, D.O.; ROBERTSON, B.H. & BACHRACH, H.L. (1981) Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**: 1125-1129.
- KNIPE, T.; RIEDER, E.; BAXT, B.; WARD, G. & MASON, P.W. (1997) Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J. Virol.* **71**: 2851-2856.
- KNUDSEN, R.; GROOCOCK, C. & ANDERSEN, A. (1983) Protective role of foot-and-mouth disease virus antibody *in vitro* in guinea pigs. *J. Gen. Virol.* **64**: 341-348.
- LAPORTE, J.; GROSCHAUDE, J.; WANTYGHM, J.; BERNARD, S. & ROUZE, P. (1973) Neutralization en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la feivre aphteuse par des serums provenant de parcs immunises a l'aide d'une proteine virale purifiee. *C.R. Hebd. Sean. Acad. Sci. Paris* **276**: 3399-3401.
- LEA, S.; HERNÁNDEZ, J.; BLAKEMORE, W.; BROCCHI, E.; CURRY, S.; DOMINGO, E.; FRY, E.; ABU-GHAZALEH, R.; KING, A.; NEWMAN, J.; STUART, D. & MATEU, M.G. (1994) The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**: 123-139.
- LEIPPERT, M.; BECK, E.; WEILAND, F. & PFAFF, E. (1997) Point mutations within the betaG-betaH loop of foot-and-mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *J. Virol.* **71**: 1046-1051.
- LOGAN, D.; ABU-GHAZALEH, R.; BLAKEMORE, W.; CURRY, S.; JACKSON, T.; KING, A.; LEA, S.; LEWIS, R.; NEWMAN, J.;

- PARRY, N.; ROWLANDS, D.; STUART, D. & FRY, E. (1993) Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* **362**: 566-568.
- MARTINEZ, M.; VERDAGUER, N.; MATEU, M.G. & DOMINGO, E. (1997). Evolution subverting essentiality: Dispensability of the cell attachment arg-gly-asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**: 6798-6802.
- MASON, P.W.; PICCONE, M.E.; McKENNA, T. ST. C; CHINSANGARAM, J. & GRUBMAN, M.J. (1997). Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **227**: 96-102.
- MASON, P.W.; RIEDER, E. & BAXT, B. (1994) RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**: 1932-1936.
- MASON, P.W.; BAXT, B.; BROWN, F.; HARBER, J.; MURDIN, A. & WIMMER, E. (1993) Antibody complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology*. **192**: 568-577.
- MATEU, M. G.; CAMARERO, J.A.; GIRALT, E.; ANDREU, D. & DOMINGO, E. (1995) Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology*. **206**: 298-306.
- MATEU, M.G.; MARTÍNEZ, M.A.; ROCHA, E.; ANDREU, D.; PAREJO, J.; GIRALT, E.; SOBRINO, F. & DOMINGO, E. (1989) Implications of a *quasispecies* genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**: 5883-5887.

- MATTHEWS, R. (1982) Classification and nomenclature of viruses. *Interviol.* **17**: 1-199.
- McCULLOUGH, K.; CROWTHER, J.; CARPENTER, W.; BROCCI, E.; CAPUCCI, L.; DeSIMONE, F.; XIE, Q. & McCAHON, D. (1987) Epitopes on foot-and-mouth disease virus particles. *I. Topography Virol.* **157**: 516-525.
- McKENNA, T. ST.C.; LUBROTH, J.; RIEDER, E.; BAXT, B. & MASON, P.W. (1995) Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virol.* **69**:5787-5790.
- MELOEN, R.; PUYK, R.; MEIJER, D.; LANKHOF, H.; POSTHUMUS, W. & SCAAPER, W. (1986) The use of peptides to locate epitopes on the surface of foot-and-mouth disease virus. *Immunological Topics A.* **4**: 103-106.
- MEYER, R.F.; BABCOCK, G.D.; NEWMAN, J.F.E.; BURRAGE, T.G.; TOOHEY, K.; LUBROTH, J. & BROWN, F. (1997) Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. *J. Virol. Meth.* **65**: 33-43.
- MEYER, R.F.; PACCIARINI, M.; HILYARD, E.J.; FERRARI, S.; VAKHARIA, V.N.; DONINI, G.; BROCCHI, E. & MOLITOR, T.W. (1994) Genetic variation of foot-and-mouth disease virus from field outbreaks to laboratory isolation. *Virus Res.* **32**: 299-312.
- MORGAN, D.O. & MOORE, D.M. (1990) Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 40-45.

- MURPHY, B.M. & CHANOCK, R.M. (1996) Immunization against disease. In: B.N Fields, D.M. Knipe and P.H. Howley (Eds). *Virology*, pp 467-497. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia & New York.
- NEFF, S.; SÁ-CARVALHO, D.; RIEDER, E.; MASON, P.W.; BLYSTONE, S.D.; BROWN, E.J. and BAXT, B. (1998) Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin, $\alpha_5\beta_3$, as its receptor. *J. Virol.*, in press.
- NEWMAN, J.; CARTRIGHT, B.; DOEL, T & BROWN, F. (1979) Purification and identification of the RNA dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **45**: 497-507.
- NEWMAN, J.F.E.; ROWLAND, D.J. & BROWN, F. (1973) A physicochemical subgrouping of the mammalian picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **18**: 171-180.
- NICKLIN, M.; KRAUSSLICH, H.; TOYODA, H.; DUNN, J. & WIMMER, E. (1987) Poliovirus polypeptide precursors: expression *in vitro* and processing by exogenous 3C and 2A proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4002-4006.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (1996) Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Situación de los programas de control de la fiebre aftosa en América del Sur. Rio de Janeiro, BR.
- PALMENBERG, A.C & OSORIO, J.E. (1994) Cardioviral poly(C) tracts and viral pathogenesis. *Arch. Virol. Suppl.* **9**: 67-77.
- PARKS, G.; DUKE, G. & PALMENBERG, A. (1986) Encephalomyocarditis virus 3C protease: efficient cell-free expression from clones which link viral 5' noncoding sequences to the P3 region. *J. Virol.* **60**: 376-384.

- PARKS, G.; BAKER, J. & PALMENBERG, A. (1989) Proteolytic cleavage of encephalomyocarditis viral capsid region substrates by precursors to the 3C enzyme. *J. Virol.* **63**: 1054-1058.
- PARRY, N.R.; FOX, G.; ROWLANDS, D.; BROWN, F.; FRY, E.; ACHARYA, R.; LOGAN, D. & STUART, D. (1990) Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* **347**: 569-572.
- PARRY, N.R.; OULDRIDGE, E.J.; BARNETT, P.V.; ROWLANDS, D.J.; BROWN, F.; BITTLE, J.L.; HOUGHTEN, R.A. & LERNER, R.A. (1985) Identification of neutralizing epitopes of foot-and-mouth disease virus. In: *Vaccines 85*: Molecular and chemical basis of resistance to parasitic, bacterial and viral diseases, pp. 211-216. Eds: LERNER, R.A.; CHANOCK, R.M. & BROWN, F. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- PÉREZ BERCOFF, R. (1979) Replication of the viral RNA. In Perez Bercoff (ed.) *The Molecular Biology of Picornaviruses*. Plenum, NY, pp. 239-318.
- PFAFF, E.; THIEL, H.J.; BECK, E.; STROHMAIER, K. & SCHALLER, H. (1988) Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **62**: 2033-2040.
- PICCONE, M.E.; RIEDER, E.; MASON, P.W. & GRUBMAN, M.J. (1995) The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.* **69**: 5376-5382.
- PLOTKIN, S.A. (1993) Vaccination in the 21st century. *J. Infect. Dis.* **168**: 29-37.

- POLATNIK, J. & WOOL, S. (1981) Characterization of a 70S polyuridilic acid polymerase isolated from foot-and-mouth disease virus infected cells. *J. Virol.* **40**: 881-889.
- PUTNAK, J. & PHILLIPS, B. (1981) Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Rev.* **45**: 287-315.
- RAHMAN, H.; DUTTA, P.K. & DEWAN, J.N. (1988) Foot and mouth disease in elephant (*Elephas maximus*). *Zentralbl. Veterinar. Med.* **35**: 70-71.
- RIEDER, E.; BERINSTEIN, A.; BAXT, B.; KANG, A. & MASON, P.W. (1996) Propagation of an attenuated virus by design: Engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 10428-10433.
- RIEDER, E.; BAXT, B.; LUBROTH, J. & MASON, P.W. (1994a) Vaccines prepared from chimeras of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies and protective immunity to multiple serotypes of FMDV. *J. Virol.* **68**: 7092-7098.
- RIEDER, E.; BAXT, B. & MASON, P.W. (1994b) Animal derived antigenic variants of foot-and-mouth disease virus type A12 have low affinity for cells in culture. *J. Virol.* **68**: 5296-5299.
- RIEDER, E.; BUNCH, T.; BROWN, R. & MASON, P.W. (1993) Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J. Virol.* **67**: 5139-5145.
- ROBERTSON, B.H.; GRUBMAN, M.J.; WEDDELL, G.N.; MOORE, D.M.; WELSH, J.D.; FISCHER, T.; DOWBENKO, D.; YANSURA, D.; SMALL, B & KLEID, D.G. (1985) Nucleotide and aminoacid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J. Virol.* **54**: 651-660.

- ROBERTSON, B.H.; MORGAN, D.O.; MOORE, D.M.; GRUBMAN, M.J.;
 CARD, J. FISCHER, T.; WEDDELL, G.; DOWBENKO, D. &
 YANSURA, D. (1983) Identification of aminoacid and nucleotide
 sequence of the foot-and-mouth disease virus RNA polymerase.
Virology **126**: 614-623.
- ROIVAINEN, M.; PIIRAINEN, L.; HOVI, T. (1996). Efficient RGD-
 independent entry process of Coxsackievirus A9. *Arch. Virol.* **141**:
 1909-1919.
- ROIVAINEN, M.; PIIRAINEN, L.; HOVI, T.; VIRTANEN, I.; RIIKONEN,
 T.; HEINO, J. & HYYPI, T.. (1994). Entry of Coxsackievirus A9 into
 host cells: Specific interaction with $\alpha V\beta 3$ integrin, the vitronectin
 receptor. *Virology* **203**: 357-365.
- ROSSMAN, M.G; ARNOLD, E.; ERIKSON, J.; FRANKENBERG, J.
 GRIFFITH, H.; JOHNSON, J.; KAMER, G.; LUO, A.; MUSSER, R.;
 RUECKERT, R.; SHERRY, B. & VRIEND, G. (1985) Structure of a
 human common cold virus and functional relationsh to other
 picornaviruses. *Nature (Lon)* **317**: 145-153.
- ROSSMAN, M.G. (1989) Hiding the host cell receptor attachment site on a
 viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* **264**: 14.587-
 14.590.
- RUECKERT, R.R. (1996) *Picornaviridae: The viruses and their replication*
 In: *Virology* (Eds: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *et*
al.), pp. 609-654. Raven Press, New York.
- RUECKERT, R.R. & WIMMER, E. (1984) Systematic nomenclature of
 picornavirus proteins. *J. Virol.* **50**: 957-959.
- RUOSLAHTI, E. & PIERSCHBACHER, M. (1987) New perspectives in cell
 adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497.

- RYAN, M.; BELSHAM, G. & KING, A. (1989) Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Viol.* **173**: 33-45.
- SÁ-CARVALHO, D.; RIEDER, E.; BAXT, B.; RODARTE, R.; TANURI, A. & MASON, P.W. (1997) Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**: 5115-5123.
- SADIR, A.; LOPEZ, O.; MARCOVECCHIO, F.; TIRABOSCHI, B.; BERGMANN, I.; LA TORRE, J. & SCHUDEL, A. (1988) The duration of immunity in cattle after experimental infection with foot-and-mouth disease virus. Impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de latioamerica y de la region del Caribe. 2° conferencia Internacional. Mar del Plata, Argentina.
- SALT, J.S.; SAMUEL, A.R. & KITCHING, R.P. (1996) Antigenic analysis of type O foot-and-mouth disease virus in the persistently infected bovine. *Arch. Virol.* **141**: 1407-1421.
- SALT, J.S. (1993) The carrier state in foot-and-mouth disease an immunological review. *Brit. Vet. J.* **149**: 207-223.
- SAMARA, S.I. & PINTO, A.A. (1983) Detection of foot-and-mouth disease carriers among water buffalo (*Bubalus bubalis*) after an outbreak of the disease in cattle. *Vet. Rec.* **113**: 472-473.
- SANGAR, D.V. (1979) The replication of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **45**: 1-11.
- SANGAR, D.V.; NEWTON, S.E.; ROWLANDS, D.J. & CLARKE, B.E. (1987) All foot-and-mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUG. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3305-3315.

- SARNOW, P. (1989) Role of the 3' end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made *in vitro*. *J. Virol.* **63**: 467-470.
- SAUNDERS, K. & KING, A. (1982) Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induced synthesis of an altered nonstructural polypeptide P34. *J. Virol.* **42**: 389-394.
- SEMLER, B.L.; ANDERSON, C.W.; KITAMURA, N.; ROTHKERG, P.G.; WISHART, W.L. & WIMMER, E. (1981) Poliovirus replication protein: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolytic processing. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **78**: 3464-3468.
- SMITH, T.J. (1985) MolView: a program for analyzing and displaying atomic structures on the Macintosh personal computer. *J. Mol. Graphics* **13**: 122-125.
- SPEAR, P.G. (1993) Entry of alphaherpesviruses into cells. *Virology* **4**: 167-180.
- STAVE, J.W.; CARD, J.L.; MORGAN, D.O. & VAKHARIA, V.N. (1988) Neutralization sites of type O1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibodies and neutralization-escape virus variants. *Virol.* **162**: 21-29.
- STREBEL, K. & BECK, E. (1986) A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **58**: 893-899.
- SUTMOLLER, P. & GAGGERO, A. (1965) Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.* **77**: 968-969.
- SVITKIN, Y.V.; PESTOVA, T.V.; MASLOVA, S.V. & AGOL, V.I. (1988) Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of neurovirulent and attenuated strains. *Virology* **166**: 394-404.

- SVITKIN, Y.V.; MASLOVA, S.V. & AGOL, V.I. (1985) The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their *in vitro* translation efficiencies. *Virology* **147**: 243-252.
- TABOGA, O.; TAMI, C.; CARRILLO, E.; NUÑEZ, J.I.; RODRIGUEZ, A.; SAIZ, J.C.; BLANCO, E.; VALERO, M-L.; ROIG, X.; J.A.; CAMARERO, J.A.; ANDREU, D.; MATEU, M.G.; GIRALT, E.; DOMINGO, E.; SOBRINO, F. & PALMA, E.L. (1997) A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* **71**: 2606-2614.
- TALBOT, P. & BROWN, F. (1972) A model for foot-and-mouth disease. *J. Gen. Virol.* **15**: 163-170.
- TALBOT, P.; ROWLANDS, D.J.; BURROUGHS, J.N.; SANGAR, D.V. & BROWN, F. (1973) Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease particles. *J. Gen. Virol.* **19**: 369-380.
- TAMKUN, J.; DeSIMONE, D.; FONDA, D.; PATEL, R.; BUCK, C.; HORWITZ, A. & HYNES, R. (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**: 271-282.
- TELLIER, R.; BUKH, J.; EMERSON, S.U. & PURCELL, R.H. (1996) Amplification of the full-length hepatitis A virus genome by long reverse transcription-PCR and transcription of infectious RNA directly from the amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4370-4373.
- TESAR, M. & MARQUARDT, O. (1990) Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virol.* **174**: 364-374.

- THOMAS, A.A.; WOORTMEIJER, R.J.; PUIJK, W. & BARTELING, S.J. (1988) Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.* **62**: 2782-2789.
- VAKHARIA, V.; DEVANEY, M.; MOORE, D.; DUNN, J & GRUBMAN, M. (1987) Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* **61**: 3199-3207.
- VAN BEKKUM, J.G.; FRENKEL, H.S.; FREDERIKS, H.H.J. & FRENKEL, S. (1959) Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk* **84**: 1159-1164.
- XIE, Q.C.; McCAHON, D.; CROWTHER, J.R.; BELSHAM, G.J. & McCULLOUGH, K.C. (1987) Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.* **68**: 1637-1647.
- WARD, G.; RIEDER, E. & MASON, P.W. (1997) Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J. Virol.* **71**: 7442-7447.
- WIMMER, E. (ed.) (1994) Cell receptors for animal viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- WIMMER, E. (1982) Genome-linked proteins of viruses. *Cell* **28**: 199-201.
- WuDUNN, D. & SPEAR, P.G. (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**: 52-58.
- YOGO, Y. & WIMMER, E. (1975) Sequence studies of poliovirus RNA III. Polyuridilic acid and polyadenylic acid as components of purified poliovirus replicative intermediate. *J. Mol. Biol.* **92**: 467-477.

- ZIBERT, A.; MAASS, G.; STREBEL, K.; FALK, M.M. & BECK, E. (1990)
Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J. Virol.* **64**: 2467-2473.
- ZIMMERMANN, H.; EGGERS, H.J. & NELSEN-SALZ, B. (1997) Cell attachment and mouse virulence of Echovirus 9 correlate with an RGD motif in the capsid protein VP1. *Virology* **233**: 149-156.