

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE cDNA QUE
CODIFICA AS PROTEÍNAS VP1 E PARTE DE VP3 DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA,
SUBTIPO C₃INDAIAL

Cláudia Maria Dornelles da Silva

Dissertação apresentada ao curso
de Bacharelado em Ciências
biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas,
ênfase genética.

Orientador: Prof. Arnaldo Zaha

Porto Alegre

1990

Dedico este trabalho aos meus
pais Antônio e Maria Helena e a
minha irmã Ana Paula.

Agradecimentos

Ao professor Arnaldo Zaha pela competente orientação e amizade.

A Rochele e Lúcia pelo auxílio e sugestões de grande importância na realização deste trabalho, bem como pela amizade.

Ao Henrique, Sandra, Jaqueline, Liane, Jenifer e Etel pela colaboração nas diversas etapas.

A Irene, ao Augusto e aos demais colegas dos laboratórios 204, 205 e 210 pela ajuda e amizade.

Ao Adriano Cunha pelo apoio, estímulo e carinho.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse possível, o meu reconhecimento.

Este trabalho foi realizado nas dependências do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

SUMÁRIO

	página
1. Introdução.....	1
1.1 Febre Aftosa.....	1
1.2 Vírus da Febre Aftosa.....	5
1.2.1 Estrutura.....	5
1.2.2 Síntese de proteínas virais e montagem da partícula viral.....	8
1.2.3 Vacina.....	11
1.2.4 Variabilidade.....	14
1.3 Aplicação de novas técnicas.....	15
1.4 Objetivos.....	22
2. Materiais e Métodos.....	23
2.1 Bactérias.....	23
2.2 Plasmídeos.....	23
2.3 M13mp18/19.....	24
2.4 Enzimas.....	24
2.5 "Screening" do banco de cDNA λ gt10-C ₃ I.....	24
— 2.6 Extração de DNA de fago λ gt10 em pequena escala.....	24
— 2.7 Extração de DNA de fago λ gt10 em grande escala.....	25
2.8 Isolamento de DNA plasmidial em pequena escala.....	26
2.9 Isolamento de DNA plasmidial em grande escala.....	27
— 2.10 Análise do DNA.....	28
— 2.11 Recuperação de fragmentos de DNA em géis de agarose	29
— 2.12 Recuperação de fragmentos de DNA em géis de poliacrilamida.....	29
— 2.13 Transferência de DNA de géis de agarose para membrana de náilon.....	30
2.14 Marcação de DNA com α - ³² P-dATP.....	30
2.15 Hibridização de colônias.....	31
2.16 Subclonagem dos fragmentos de cDNA de λ gt10 em pUC18.....	31
2.17 Subclonagem dos fragmentos do pUC18 recombinantes em fagos M13mp18/19.....	32

2.18	Multiplicação dos fagos M13mp18/19.....	33
2.19	Análise dos DNAs recombianes em M13mp18/19.....	33
2.20	Seqüenciamento.....	34
2.21	Análise da seqüência de nucleotídeos.....	36
3.	Resultados e discussão.....	37
4.	Resumo.....	43
5.	Bibliografia.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre Aftosa

A febre aftosa é uma enfermidade vesicular que afeta animais biungulados, especialmente bovinos, ovinos e suínos (Rosemberg, 1975). O agente causador da febre aftosa é um vírus altamente contagioso e infeccioso dotado de um poder de rápida difusão e persistência nas populações animais atingidas.

A febre aftosa, por pelo menos quatro séculos, foi uma das maiores pragas animais no mundo (Bittle et alii, 1982). Suas implicações sócio-econômicas em relação aos mercados de exportação com prejuízos diretos nos sistemas de produção pecuária faz da doença motivo de muitos estudos (Martinió, 1984).

Nos bovinos a enfermidade se caracteriza pela depressão, febre e formação de vesículas no epitélio da boca, língua, gengiva, nariz e às vezes, na faringe, traquéia, esôfago e rúmex. Ainda, na pele do espaço interdigital, nos mamilos e raramente na superfície do úbere e na base dos chifres (Martinió, 1984).

O vírus penetra geralmente por via respiratória (Sellers et alii, 1971). A replicação do vírus na parte superior da via respiratória pode realizar-se por muitos dias antes que se espalhe para outras partes do corpo, resultando na doença clínica (Graves et alii, 1971). Nos músculos, sobretudo no coração, produz lesões degenerativas observadas em animais jovens (Martinió, 1984).

O vírus é transmitido através das excreções dos animais pela respiração, saliva e leite (Burrows, 1968; Cottral, 1969; Sellers et alii, 1971).

Os enfermos com lesões nas patas mancam e preferem permanecer quietos. As vesículas bucais interferem na alimentação; quando as vesículas se apresentam nas tetas das vacas, tornam

difícil a ordenha. Tudo isto se reflete em um enfraquecimento rápido dos animais e na diminuição acentuada da produção de leite (Martinió, 1984).

A gravidade da enfermidade se manifesta numa relação inversa entre a idade e a susceptibilidade. Os danos mais severos são observados em animais muito jovens como bezerros, cordeiros e leitões recém-nascidos (Rosemberg, 1975).

No porco, o sintoma mais notável é a manqueira e a tendência a permanecer deitado ou andar de joelhos. As lesões são similares às dos bovinos. Nos ovinos, a enfermidade, por ser comumente benigna, pode passar despercebida (Martinió, 1984).

A introdução da doença em alguns países tem levado a significativos massacres dos rebanhos, principalmente naqueles até então livres da doença. Em outros países onde a doença é endêmica, a vacinação é amplamente praticada (Bittle et al., 1982; Della-Porta, 1983).

A baixa produtividade do rebanho bovino ocasiona perdas estimadas em 25% da produção (Brown, 1985a), interferindo na comercialização de animais e seus subprodutos, tanto a nível de mercado interno, como externo (Della-Porta, 1983).

Os países com febre aftosa sofrem restrições comerciais por parte dos países livres da doença. Tudo começou a evidenciar-se em fins do século passado, quando países como a Grã-Bretanha e os Estados Unidos da América, proibiram as importações de animais biungulados de países atacados por febre aftosa. Posteriormente, as restrições foram se estendendo a produtos de origem animal, conforme se reuniam provas do papel transmissor do vírus. A medida afetou especialmente a Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (Martinió, 1984).

Nesse sentido, faz-se necessário um plano de combate que controle a doença, evitando aumentar os riscos envolvidos nos projetos de desenvolvimento pecuário. A eliminação da enfermidade no território nacional contribuiria para melhorar o abastecimento interno e possibilitaria o acesso a mercados de carne livres de

febre aftosa, nos quais o preço apresenta valores em torno de 40% superiores ao que é pago aos países afetados (De Faria, 1984).

A Federação Rural do Uruguai calcula que seu país, juntamente com a Argentina e o Brasil, pelo fato de terem aftosa, perdem, atualmente, na comercialização de produtos pecuários, um mínimo de 170 milhões de dólares ao ano, considerando somente os mercados dos Estados Unidos e Canadá. Se estivessem livres da doença poderiam exportar 460 mil toneladas de carne bovina. Além disso, poderiam concorrer no mercado da América Central que importa em média 450 milhões de dólares anuais de produtos lácteos (Martinió, 1984).

Na década de 1960, com a assessoria e coordenação do Centro Pan-Americano de febre aftosa os países afetados da América do Sul começaram a executar programas de ataque à enfermidade. A situação atual da febre aftosa nas Américas resume-se na inexistência na América do Norte, México, América Central, Panamá, região do Caribe, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Chile, e em sua presença endêmica nos demais países da América do Sul com alguns setores livres, como a Patagônia argentina e o extremo norte ocidental da Colômbia (Martinió, 1984). Com relação as outras partes do mundo a doença só está ausente no Japão, Austrália e Nova Zelândia (Brown, 1985a).

Para que a doença se desencadeie torna-se necessária a ocorrência de desequilíbrio entre os fatores fundamentais que compõem a cadeia epidemiológica como o hospedeiro, o ambiente e o agente etiológico. É importante para a elaboração de programas de controle da febre aftosa que se conheça a forma de comportamento da doença (Rosemberg, 1975).

Os diferentes níveis de endemicidade que são possíveis de identificar em cada país estão relacionados, principalmente, com as formas de exploração do hospede animal. Características tais como seleção de espécies e raças, densidade da população, estado fisiológico e sua utilização dependem em grande parte dos interesses humanos (Rosemberg, 1975). A forma de organização da

produção bovina, utilizando procedimentos de pastoreio em pastos naturais (criação extensiva), sem haver estabulação, exceto em áreas muito especializadas como da produção leiteira, influem na dispersão da doença para áreas vizinhas (Astudillo, 1984). A comercialização do gado e seus subprodutos também podem determinar a difusão da enfermidade à distância. Como toda a enfermidade transmissível, os riscos de infecção também estão relacionados com a densidade da população. A distribuição geográfica da febre aftosa na América do Sul coincide com a distribuição geográfica de regiões de alta densidade populacional, especialmente de bovinos, que acarreta, obviamente, um aumento da quantidade de partículas virais no ambiente, determinando com isso, a existência de ecossistemas regionais endêmicos de febre aftosa (Astudillo, 1984).

Dentro do equilíbrio ecológico da enfermidade, o ambiente se constitui num outro elemento importante e cujo conhecimento é mais deficitário. É preciso estabelecer quais as variáveis ambientais que podem influir na dispersão da doença, procurando agrupá-las em ecossistemas homogêneos (Rosemberg, 1975). Vários autores têm designado uma influência decisiva dos fatores climáticos para a viabilidade do vírus no meio externo, para sua evolução e gravidade de infecção. Até o momento o que se conclui desses estudos é que em certas condições ambientais tais como tempo nublado e úmido, o vírus pode sobreviver e ser espalhado pelo vento, atingindo animais sadios (Burrows, 1968; Cottral, 1969). E ainda que trocas climáticas repentinas contribuem para evitar uma maior difusão da epidemia (Davis et al. 1968).

Dos três fatores que compõem a cadeia epidemiológica, o vírus da febre aftosa é o que está sendo melhor estudado, em particular no que se refere as suas características morfológicas e bioquímicas (Rosemberg, 1975). Como se sabe o vírus possui uma alta variação antigênica, é altamente contagioso e infeccioso e com poder de rápida difusão e persistência nas populações

animais atingidas (Martinió, 1984).

Estudos mais detalhados das relações hópede-ambiente-agente, juntamente com políticas de ação específica como vacinação, controle de trânsito de animais e vigilância zoossanitária são passos importantes para o combate e total erradicação do vírus da febre aftosa (Astudillo, 1984).

1.2. Vírus da Febre Aftosa

1.2.1 Estrutura

O vírus da febre aftosa é um membro da família *Picornaviridae*. Essa família possui uma variedade de espécies altamente virulentas em humanos e patogênicas em animais que são tradicionalmente subdivididas em 4 gêneros com base nas propriedades físicas dos virions tais como densidade, estabilidade a pH e coeficiente de sedimentação (Rossmann et alii, 1985; Arnold et alii, 1987). Os 4 gêneros são: Rhinovirus (rhinovirus humano - HRV), Cardiovirus (vírus Mengo e vírus da encefalomiocardite - EMCV), Enterovirus (poliomielite, hepatite A e vírus de coxsackie) e finalmente, Aftovirus (vírus da febre aftosa). (Rossmann et alii, 1985). Todos os picornavírus apresentam similaridade na organização genômica e estrutural (Sangar, 1979).

As partículas virais do vírus da febre aftosa medem 28 nm em diâmetro, apresentam um coeficiente de sedimentação de 140S e densidade de $1,425 \text{ g/cm}^3$ em gradiente de cloreto de césio (ClCs). Não possuem envoltura lipo-protéica, são resistentes aos solventes orgânicos e extremamente lábeis a pH abaixo de 7 (Vasquez et alii, 1979).

Os virions têm uma configuração geométrica icosaédrica. A falta do RNA na cavidade central da partícula resulta na formação de uma orientação ao acaso das proteínas do capsídeo (Rossmann et alii, 1985).

O genoma viral é constituído por uma cadeia única de RNA

de aproximadamente 8000 nucleotídeos e com um peso molecular de 2.6×10^6 (Brown, 1985a). Esse RNA é de polaridade positiva e pode atuar diretamente como RNA mensageiro (Forss et alli, 1984).

No extremo 3' da molécula do RNA existe uma seqüência contínua de nucleotídeos de adenosina, denominada de Poli A, de aproximadamente 20 a 150 resíduos que é comum a toda família *Picornaviridae*, mas cuja função ainda não é conhecida. Na extremidade 5', entretanto, não é encontrada a característica estrutura "cap", mas sim uma proteína covalentemente ligada, denominada de VPg ("viral polypeptide genome"), cuja função estaria relacionada com a regulação da síntese do RNA viral (Kitamura, 1980).

Os genomas virais dos gêneros Cárdio e Aftovírus possuem um segmento com resíduos de citosina Poli (C) de aproximadamente 80 a 200 bases no extremo 5' do genoma (Sangar, 1979). Sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas parece ter papel importante na infectividade do vírus. Recentemente, Duke et al. (1990), trabalhando com o vírus Mengo identificaram uma possível relação entre a diminuição das seqüências Poli (C) com atenuação da virulência. Vírus contendo a seqüência diminuída de Poli (C) foram inoculados em ratos; verificou-se que em doses subletais, a replicação do vírus era lenta, os animais não apresentaram sintomas da doença críticos e produziram altos níveis de anticorpos neutralizantes que os protegeram mais tarde contra o desafio com o vírus selvagem. Trabalhos como esse são também de especial relevância para os estudos com o vírus da febre aftosa pela similaridade da organização genômica.

O Poli (C) divide o RNA genômico em dois fragmentos: um com aproximadamente 400 nucleotídeos, situado no final 5' e não é codificante, e outro de aproximadamente 7000 nucleotídeos responsável pela informação genética para a síntese das proteínas estruturais e não estruturais (Sangar, 1979). Se o segmento poli (C) do vírus da febre aftosa e todos os nucleotídeos do extremo 5' forem removidos, não haverá alteração na tradução da proteína "in

vitro" (Carroll et alii, 1984).

O capsídeo viral é formado por 4 polipeptídeos estruturais principais denominados VP1, VP2, VP3 e VP4 ("viral polypeptide"). VP0 é o precursor não clivado de VP2 e VP4 (Brown, 1985a). De cada um dos polipeptídeos existem 60 cópias, sendo que VP1-3 estão parcialmente expostos na superfície, enquanto VP4 está localizado internamente (Sangar, 1979). O precursor das proteínas estruturais VP1-VP4 está arranjado na seguinte ordem $\text{NH}_2\text{-VP4-VP2-VP3-VP1-COOH}$. Os pesos moleculares dos polipeptídeos VP1, VP2 e VP3 oscilam próximo de 24×10^3 e VP4 aproximadamente $8,5 \times 10^3$ (Boothroyd et alii, 1982).

VP1 é a proteína capsídica mais externa e imunodominante e de fundamental importância na indução de anticorpos neutralizantes (Laporte et alii, 1973). Seu gene estrutural compreende mais ou menos 639 nucleotídeos, os quais codificam para 213 aminoácidos (Kurz et alii, 1981). Pela análise da seqüência de aminoácidos foi identificada uma região entre os resíduos 141-160 altamente hidrofílica. Essa região é rica em aminoácidos do tipo lisina, arginina e ácido aspártico, usualmente encontradas nas superfícies e capazes de atrair moléculas de água. O aminoácido prolina é freqüentemente encontrado onde a proteína faz dobras distintas (especificidade imunológica) e nesta região encontram-se duas (Lerner, 1983). Nessa mesma região, as seqüências de aminoácido sofrem consideráveis variações de linhagem para linhagem viral.

VP2, VP3 e VP4 apresentam respectivamente, 218, 220 e 85 resíduos. VP3 é o polipeptídeo mais conservado no capsídeo protéico dos picornavírus. VP4 varia consideravelmente entre os membros da família *Picornaviridae*, sendo a cadeia do vírus da febre aftosa a mais longa (Acharya et alii, 1989).

Acharya et alii (1989) determinaram a estrutura tri-dimensional do vírus, utilizando cristalografia e análise de difração de raio-X, as análises mostram a disposição das proteínas estruturais (VP1-VP4) com respeito a simetria

icosaédrica. A região do principal determinante antigênico (133-158) de VP1 não pode ser detectada neste estudo. Ela apresenta-se como uma região desordenada.

1.2.2. Síntese de proteínas virais e montagem da partícula viral

O início da síntese protéica começa em dois sítios de iniciação localizados no extremo 5', à direita do fragmento poli (C) (Kitamura et alii, 1980 ; Beck et alii, 1983), e corresponde a um único e longo "open reading frame". O produto da tradução resultante é uma poliproteína precursora gigante de peso molecular de 250 kdal e de difícil isolamento por causa das clivagens proteolíticas que ocorrem de forma simultânea com o processo de síntese (Arnold et alii, 1987). A estratégia de replicação via uma poliproteína é única para picornavírus (Toyoda et alii, 1986). A replicação dos picornavírus é inteiramente dependente de proteólise, sendo que tais exigências não são incomuns em processos biológicos virais. Sabe-se inclusive que algumas ou talvez todas as enzimas proteolíticas envolvidas na replicação dos picornavírus são codificadas dentro do genoma viral (Nicklin et alii, 1986).

Os genes do vírus da febre aftosa são expressados como uma poliproteína que é rapidamente processada originando 4 produtos de clivagens: L, P1, P2 e P3. A proteína L está localizada na região N-terminal da poliproteína e é o primeiro produto gênico liberado. A região P1 é composta por 4 peptídeos estruturais: 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) e 1D (VP1). A região P2 é composta por três peptídeos não estruturais: 2A, 2B e 2C. E finalmente, a região P3 é composta por 4 peptídeos não estruturais: 3A de função desconhecida, 3B relacionado com a proteína VPg, 3C que é uma protease e 3D que é a RNA polimerase (Argos et alii, 1984; Nicklin et alii, 1986; Toyoda et alii, 1986; Vakharina et alii, 1987).

A primeira clivagem ocorre enquanto o polipeptídeo é ainda nascente no ribossoma. Experimentos recentes com vários membros da família revelaram importantes diferenças nas estratégias de processamento. Para poliovírus essa clivagem ocorre entre as regiões P1 e P2, isto é, entre os peptídeos 1D (VP1) e 2A (Toyoda et alii, 1986; Nicklin et alii, 1986). Em Cardiovírus e Aftovírus, a primeira clivagem ocorre entre os peptídeos 2A e 2B e o agente proteolítico responsável ainda não foi identificado (Jackson, 1986). O peptídeo 2A no vírus da febre aftosa é muito pequeno, codifica para somente 16 aminoácidos e tem sido considerado como uma seqüência vestigial (Clarke & Sangar, 1988). Este peptídeo permanece associado com a região P1 depois do processamento inicial em P1-2A/2B. A protease responsável por essa clivagem pode ser uma enzima hospedeira, entretanto não é possível excluir a possibilidade de que o sítio P1-2A/2B seja clivado por atividades proteolíticas não identificadas de P1-2A ou do peptídeo 2B (Vakharia et alii, 1987).

A maior parte das clivagens dentro da poliproteína picornaviral são realizadas pela protease 3C que é uma enzima do tipo cisteína (Argos et alii, 1984; Nicklin et alii, 1986). Embora todas as poliproteínas picornavirais contenham a protease 3C com aparente similaridade de função (Argos et alii, 1984), as clivagens em enterovírus e rhinovírus podem ocorrer por mecanismos diferentes daqueles ocorridos em cardiovírus e aftovírus. As clivagens feitas pela protease 3C em poliovírus ocorrem entre pares específicos Gli-Gli ou entre pares relacionados como Gln-Ser, Glu-Ser ou Glu-Gli (Hanecak et alii, 1984, citado por Arnold et alii, 1987). Todos os processamentos da proteína do vírus da febre aftosa nas regiões não estruturais P2 e P3 e entre essas regiões são atribuídas a protease 3C, predominantemente entre pares Glu-Gli (Argos et alii, 1984; Vakharia et alii, 1987).

Recentemente, Strebel & Beck (1986) comprovaram a existência de uma segunda protease no vírus da febre aftosa, representada pelo produto do gene L. A liberação da proteína L

ocorre ainda em estado nascente e não é catalisada pela protease 3C, nem por proteases celulares, mas sim por atividade auto-catalítica entre a junção L/P1. Tanto o vírus da febre aftosa como o vírus da encefalomiocardite possuem esta proteína líder em frente a região P1. No caso do aftovírus, a região L está separada de P1 pela clivagem dos aminoácidos Gly-Glu. A protease L parece também clivar a região entre P1-P2 que ocorre de forma rápida e provavelmente, entre os aminoácidos Leu-Ala (Nicklin et alii, 1986).

O processamento de VP0 para gerar VP2 e VP4 é o último evento na maturação viral. Em rhinovírus humano, essa clivagem ocorre através de autocatálise, envolvendo uma serina conservada presente em VP2. Esse mesmo mecanismo de clivagem foi proposto por Arnold et alii (1987) para vírus da febre aftosa, entretanto, Acharya et alii (1989) ao analisar a estrutura tri-dimensional do vírus não encontrou a serina que seria responsável pelo desencadeamento da clivagem entre VP2 e VP4, ficando, por essa razão, uma dúvida a respeito.

Seja qual for esse último tipo de atividade proteolítica, a montagem vai sendo realizada de forma progressiva, determinando mudanças de conformação e reassociação dos produtos (VP0, VP1, VP3) que finalizam com a formação de 12 subunidades pentaméricas 12S. Cada subunidade contém 5 cópias das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, culminando com a inserção do RNA dentro do capsídeo e com a concomitante clivagem de VP0 (De Mello & La Torre, 1984; Rossmann et alii, 1985; Arnold et alii, 1987).

No interior do capsídeo viral encontramos o RNA genômico altamente compactado em uma configuração esférica, formando o nucleóide ou "core" do virion (Dubra et alii, 1982). A presença do RNA intacto dentro da partícula viral estabiliza o capsídeo contra degradação (Denoya et alii, 1978). Esta propriedade sugere que o RNA está envolvido em interações com os componentes protéicos do capsídeo. Além disso, a produção de um RNA "livre" da partícula madura do vírus da febre aftosa resulta em mudanças na

antigenicidade. Assim, a manutenção de uma conformação correta dos determinantes antigênicos parece ser RNA-dependente (Rowlands et alii, 1975; Cartwright et alii, 1982).

1.2.3. Vacina

Na luta contra o vírus da febre aftosa, o uso de vacinas tem sido uma das armas mais importantes. A extensão do problema é tal que aproximadamente 2×10^9 doses da vacina são usadas a cada ano em todas as partes do mundo (Bolwell et alii, 1989).

Atualmente, existem dois tipos de vacinas disponíveis: uma de uso generalizado que é produzida a partir da destruição da infectividade dos virions (partícula 140S) por meio de substâncias chamadas de inativantes que alteram de forma irreversível o ácido ribonucleico viral; e outro tipo, já de uso bastante restrito, que consiste na utilização de vírus vivo modificado ou atenuado por meio de passagens em hospedes não naturais (ovos embrionários, pintos de um dia, coelhos, camundongos adultos, etc..) (La Torre & de Mello, 1984). Neste caso produzem uma infecção sem relevância clínica, porém induzem a formação de anticorpos neutralizantes (La Torre & de Mello, 1984). Um vírus atenuado é, entretanto, um organismo vivo e, por essa razão, capaz de mudanças. Ele pode mutar viabilizando um aumento na virulência (Lerner, 1983).

Na produção de vacina inativada contra a febre aftosa deve-se considerar 4 fases essenciais para a obtenção de um produto final eficiente: a) produção de um antígeno imunogênico, b) inativação correta, c) uso de bons adjuvantes, e d) controle sobre todas as etapas do processo de produção. Para que uma amostra possa ser usada na fabricação da vacina, deve ser além de epidemiologicamente importante, imunogênica e estável durante o processo de produção e posterior conservação (Abaracón & Olascoaga, 1984).

A primeira vacina produzida para combater o vírus da

febre aftosa consistiu de vírus extraído das lesões causadas pela doença em gado, onde era inativado com formaldeído. Esse processo foi substituído pelo método de Frenkel, no qual o vírus passou a ser cultivado em epitélio lingual de bovino em cultura e, novamente, inativado com formaldeído (Rowlands, 1985). A partir daí, duas vantagens propiciaram um avanço na produção em grandes quantidades da vacina, a primeira foi a demonstração do crescimento do vírus em linhagem celular BHK ("baby hamster kidney") com possibilidade de multiplicação contínua, e a segunda foi a mudança para aziridinas como inativantes. O uso de formaldeído foi substituído na maior parte da produção mundial por inativantes de primeira ordem que oferecem maior garantia de inativação (Rowlands, 1985). Um inativante de primeira ordem é aquele que apresenta uma cinética de inativação constante durante todo o processo, sem ser afetado pelo tempo, nem pelos componentes do meio, garantindo que o vírus seja completamente inativado (Abaracón & Olascoaga, 1984).

Mas apesar dos grandes benefícios que traz a vacina convencional no controle da febre aftosa existem considerações que devem ser feitas.

O fator complicante de maior importância no controle da doença por vacinação é a variação antigênica que ocorre com o vírus. Essa variação se deve a uma rápida evolução do vírus da febre aftosa em campo (Domingo et alii, 1980 ; Sobrino et alii, 1986, Mateu et alii, 1987; Martinez et alii, 1988). Existem 7 sorotipos diferentes: O, A, C (tipos europeus que ocorrem na América do Sul), SAT1, SAT2, SAT3 (tipos sul-africanos) e Asia 1 (território asiático) e mais de 60 subtipos, freqüentemente demonstrados por diferenças em teste de neutralização ou fracasso em proteger animais contra o sorotipo do vírus da febre aftosa relacionado. Essa grande variabilidade pode ser bem evidenciada dentro do grupo A que tem aproximadamente 29 subtipos. Alguns subtipos emergidos dos últimos anos e outros que desapareceram ou foram erradicados (Della-Porta, 1983). A imunidade conferida por

infecção com um vírus de um sorotipo não protege contra membros de outros sorotipos e nem mesmo contra subtipos diferentes dentro do mesmo sorotipo (Brown, 1985b). Desta forma, as vacinas necessitam ser feitas com o subtipo viral que prevalece no campo (Bachrach, 1975; La Torre & de Mello, 1984; Brown, 1988).

Outro grande problema se deve a baixa imunidade induzida por uma única aplicação da vacina. Os níveis altos de anticorpos no soro só são mantidos através de uma regular vacinação duas ou três vezes por ano (Bolwell et alii, 1989).

Um terceiro problema está relacionado com as propriedades físicas do próprio antígeno imunizante. Está bem demonstrado que, para o bom funcionamento imunogênico, a partícula viral deve estar intacta. Sua estrutura é relativamente frágil e suscetível a danos como temperaturas elevadas, condições ácidas e até mesmo a inativação com acetiletileneimina (AEI) poderia degradar algumas linhagens virais. Com respeito a temperatura, a vacina deve ser mantida em condições refrigeradas desde o momento que é preparada até a inoculação, situação esta problemática em países tropicais onde a proporção anual de vacinas usadas é alta e nem sempre se consegue garantir a sua potência (Rowlands, 1985).

Um outro ponto a ser considerado é o risco, embora pequeno, de ocorrerem surtos da doença devido a uma inativação não apropriada, reversão da virulência no caso de vacinas atenuadas, ou o escape de vírus da planta de produção (Doel, 1985; Rowlands, 1985; Amadori et alii, 1987).

Atualmente, nas áreas de bioquímica e biotecnologia estão sendo estudadas novas técnicas, nas quais o imunógeno, em lugar de ser o vírus da febre aftosa completo, é somente uma fração imunizante do mesmo. Com os avanços da biologia molecular, principalmente clonagem, seqüenciamento e expressão dos ácidos nucleicos será possível conceber a utilização de novas formas de vacinas mais seguras que as convencionalmente usadas, evitando com isso os possíveis riscos de infecção causadas tanto pela vacina atenuada, como inativada (Abaracón & Olascoaga, 1984).

1.2.4 Variabilidade

O sistema de variabilidade genética do vírus da febre aftosa é de particular interesse pelas suas implicações biológicas. O seqüenciamento do genoma tem mostrado que o polimorfismo genético é a base da diversidade antigênica do vírus na natureza. Esta heterogeneidade genética existe não somente entre linhagens de diferentes sorotipos (Makoff et alii, 1982, Cheung et alii, 1983, Beck et alii, 1983), mas também entre isolados serologicamente próximos (Domingo et alii, 1980; Rowlands et alii, 1983; Beck e Strohmaier, 1987).

Os mecanismos que geram essa variabilidade viral são principalmente as altas taxas de mutações que ocorrem durante a replicação do RNA genômico (Steinhauer & Holland, 1986; Parvin et alii, 1986). As mutações produzem alterações na seqüência de nucleotídeos que resultam no aparecimento de novas partículas virais diferentes daquelas que iniciaram a infecção, com algumas modificações de diversos graus nos determinantes antigênicos e, portanto, não são neutralizados pelos anticorpos específicos do hospede (La Torre e De Mello, 1984).

Estudando a evolução do vírus da febre aftosa, subtipo C1, Sobrino et alii (1986) observaram uma taxa de fixação mutacional para as proteínas dos genes estruturais 6 vezes maior do que para as proteínas dos genes não estruturais. Valores que ultrapassam 10^{-2} s/nt/a (substituições de nucleotídeos por ano) foram medidos para a região que codifica VP1-VP3. O seqüenciamento do gene revelou alterações de pelo menos dois aminoácidos distintos na posição 138-149, sugerindo a emergência do vírus com diferentes comportamentos imunogênicos. Parry et alii (1987) (citado por Martinez et alii, 1988) de fato sugerem que substituições de aminoácidos nos resíduos 41-60 de VP1 do vírus da febre aftosa provocam significantes mudanças no epitopo que inclui

os resíduos 140-160, afetando conseqüentemente as propriedades imunológicas.

Além disso, essa situação é ainda mais favorecida pela pressão seletiva exercida sobre a população viral heterogênea. Níveis sub-ótimos de anticorpos neutralizantes, induzidos por vacinas de baixa imunogenicidade ou em final de período de imunidade provocam alterações antigênicas. Desta forma, quando um animal possui um nível ótimo de anticorpos terá a oportunidade de neutralizar não só os vírus homólogos, como também variantes antigênicas do mesmo tipo (La Torre & de Mello, 1984). Ao contrário, quando o nível de anticorpos é baixo só serão neutralizados os vírus homólogos e, deste modo, as variantes antigênicas sobrevivem e estabelecem uma nova amostra com atividade no campo. Caso esta amostra venha a sofrer mudanças adicionais em seus determinantes antigênicos, a possibilidade de ser neutralizado pelas defesas do hospede serão ainda menores, resultando, como conseqüência, em uma amostra ou até mesmo em um subtipo diferente que poderá vir a causar sério impacto epidemiológico (La Torre e De Mello, 1984).

O conhecimento dessas mudanças de antigenicidade e imunogenicidade dos vírus no campo são de grande importância para os programas de controle da doença, uma vez que o grau de proteção da população vacinada depende da qualidade da vacina aplicada e da homologia entre a linhagem da vacina e a linhagem do campo (La Torre & De Mello, 1984).

1.3. Aplicação de novas técnicas

Wild et alii (1969) observaram que a clivagem da partícula viral com tripsina reduzia drasticamente a infectividade e imunogenicidade do vírus. Este estudo teve uma grande importância no estabelecimento, mais tarde, da localização do sítio antigênico do vírus da febre aftosa.

Laporte et alii (1973) e Bachrach et alii (1975) clivaram a partícula viral com tripsina e identificaram a fração mais imunogênica. Esta fração está localizada no polipeptídeo VP1 encontrado no cápside viral; e nenhuma das demais proteínas são afetadas pela enzima. VP1 é, portanto, a única proteína estrutural capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes, embora em níveis mais baixos do que aquele induzido pela partícula viral inteira.

Estas observações encorajaram muitos grupos de pesquisadores no sentido de tentar produzir VP1. As possibilidades de produção da mesma, com a finalidade de se obter uma vacina alternativa que estimule uma resposta de anticorpos adequada, tem sido intensamente estudadas através de técnicas de engenharia genética, onde se faz a síntese de VP1 ou a expressão da proteína em bactérias como produto de fusão com outra proteína.

Strohmaier et alii (1982) localizaram os sítios antigênicos de VP1, analisando a imunogenicidade de uma variedade de fragmentos definidos do vírus O1 Kaufbeuren, derivados por hidrólise proteolítica e química. Os sítios situaram-se nas regiões correspondentes aos aminoácidos 146-154 e entre 200-213. Este trabalho foi de vital importância para o avanço dos estudos de antigenicidade do vírus da febre aftosa.

A partir daí, as seqüências de VP1 de diferentes sorotipos e subtipos foram determinadas, revelando a existência de regiões altamente conservadas e outras três posições, com determinantes antigênicos descontínuos, consideravelmente variáveis. Comparações dos vírus dos subtipos O, A e C mostraram que as maiores variações ocorriam nos resíduos 42-61, 131-160 e 193-204, sendo os dois últimos mais importantes (Brown, 1985b).

Esses resultados foram testados medindo-se a capacidade de muitos peptídeos sintéticos de provocar a formação de anticorpos neutralizantes e, em alguns casos, em proteger os animais contra o vírus. Os testes foram primeiramente realizados por Bittle et alii (1982) com o vírus do sorotipo O. Os peptídeos

sintéticos acoplados ao carreador KLH ("keyhole limpet hemocyanin") foram injetados em cobaias. O resultado mostrou uma ótima atividade do peptídeo contendo os resíduos 141-160. Pfaff et alii (1982) também demonstraram que peptídeos correspondentes a essa mesma região induziam a formação de anticorpos neutralizantes em coelhos. Esta região parece, portanto, estar ligada ao sítio imunodominante do vírus da febre aftosa, embora evidências mais recentes indiquem que a região 138-156 possa ser mais ativa (Mateu et alii, 1987).

Um peptídeo quimicamente sintetizado contendo duas regiões imunogênicas separadas (resíduos 141-158 e 200-213) da proteína VP1 do vírus tipo O1 Kaufbeuren foi preparado livre de qualquer proteína carreadora. Estas regiões foram conectadas a uma diprolina espaçadora e em suas extremidades foram adicionados resíduos de cisteína, ambas com a finalidade de aumentar o tamanho da molécula. A diprolina foi inserida para aumentar a vizinhança de interação entre os dois sítios, induzindo, presumivelmente, a formação de uma estrutura secundária. E os resíduos de cisteína foram adicionados nas regiões terminais com o propósito de polimerização, eliminando assim a necessidade de um carreador molecular. Essa organização gerou altos níveis de anticorpos neutralizantes e protegeu o gado, quando inoculado com o vírus infeccioso. Esses resultados foram o primeiro exemplo de proteção em gado contra o vírus da febre aftosa, depois de uma única imunização com peptídeo sintético sob condições similares aquelas usadas em teste de potência das vacinas convencionais, e além disso, sugerem a importância do terminal carboxílico de VP1 no aumento da resposta de proteção (DiMarchi et alii, 1986).

Está claro que os resultados obtidos com peptídeos sintéticos são realmente encorajadores, mas existe muita coisa a ser aprendida sobre a estrutura do determinante imunogênico do vírus da febre aftosa. Os resultados tem produzido êxitos parciais. Um importante ponto desses experimentos é que a proteína VP1 isolada é fracamente imunogênica e a resposta chave está na

sua configuração alterada. Outro aspecto desapontador reside na fraca performance da vacina peptídica em gado, comparado com os altos níveis promissores mostrados em cobaias. Torna-se aparente que para a produção de uma vacina potencial, os peptídeos devem conter domínios que reajam adequadamente com os receptores dos anticorpos (Brown, 1988). Quando tais problemas forem resolvidos a vacina peptídica terá enormes vantagens sobre a atualmente utilizada, tais como, produto quimicamente definido, indefinidamente estável, sem a presença do agente infeccioso, não necessitando de uma planta de produção em larga escala e, além disso, a vacina poderá ser produzida com amplo espectro antigênico pelas alterações feitas nas seqüências de aminoácidos (Brown, 1988).

Uma outra alternativa no estudo de vacinas contra o vírus da febre aftosa está na produção das seqüências imunogênicas como parte de proteínas carreadoras em sistemas de expressão bacterianas que são chamadas de proteínas de fusão. As proteínas de fusão são codificadas por genes estruturais e são obtidas a partir da ligação de uma parte do gene da bactéria hospedeira com o gene da proteína antigênica desejada no mesmo "codon reading frame". Através de uma escolha cuidadosa das seqüências codificadas pela célula hospedeira e o gene em questão, o produto protéico pode ser expressado em altos níveis, de maneira estável e retendo alta potencialidade imunogênica (Kleid, 1983).

Kleid (1983) utilizou o sistema do operon triptofânio em *Escherichia coli* na expressão de VP1. A proteína de fusão purificada foi injetada em bovinos e testado quanto ao nível de anticorpos produzidos. Os animais que receberam doses altas da proteína obtiveram um significativo nível de anticorpos que se mantiveram por 7 meses. Os animais que receberam uma dose menor da proteína responderam com a produção de baixos níveis de anticorpos, necessitando uma revacinação após três meses e meio. Somente após a segunda vacinação, em ambos os grupos, é que foi constatado um aumento no nível de anticorpos. Em 1985, Kleid et

alii provaram que duas cópias do determinante antigênico expressados no mesmo sistema citado acima, provocou o resultado esperado em gado, protegendo-os contra infecção.

Broekhuijsen et alii (1986 e 1987) construíram uma série de plasmídeos de expressão que codificavam 1, 2 ou 4 cópias da seqüência de aminoácidos 137-162 do maior sítio imunogênico de VP1 do subtipo 01 BFS. Estas seqüências foram clonadas na região correspondente a parte N-terminal de β -galactosidase. A imunização em cobaias dessas proteínas resultou na produção de anticorpos neutralizantes em níveis dependentes ao número de repetições de cada plasmídeo. Proteínas com 2 ou 4 cópias do determinante antigênico são significativamente mais eficientes do que a proteína com uma cópia.

A seqüência de cDNA que codifica parte de VP1 do vírus C3 Indaial foi clonada e expressa em *Escherichia coli* como produto de fusão com o gene da β -galactosidase. Essa seqüência correspondente aos aminoácidos 117-210, contém os determinantes antigênicos importantes para induzir a produção de anticorpos neutralizantes. Porém, quando injetada em cobaias e camundongos não foi capaz de induzir a formação de anticorpos que reconhecessem VP1 viral, indicando que a parte imunogênica não se encontrava exposta nesta proteína (Zaha, 1986).

Desses experimentos, conclui-se que múltiplas cópias da região antigênica podem "mimetizar" a estrutura conformacional da molécula, ficando expostas na superfície; já a proteína VP1 sozinha deve sofrer algum tipo de alteração que a impede de organizar-se de forma similar à arquitetura original da partícula viral inteira.

Proteínas de fusão também foram de grande utilidade nos estudos realizados por Strebel et alii (1986). Todas as partes codificantes do genoma do vírus da febre aftosa foram clonadas e expressadas em *Escherichia coli* como produto de fusão da região N-terminal do gene da polimerase do fago MS2. As construções geradas produziram grandes quantidades de proteínas estáveis que

foram usadas para identificar e estabelecer relações entre os produtos gênicos precursores do vírus da febre aftosa, bem como detectar muitos outros produtos ainda não identificados "in vivo" ou "in vitro".

No caso de picornavírus a introdução da tecnologia de anticorpos monoclonais também tem ajudado muito a elucidar os mecanismos de neutralização viral através de caracterizações dos epitopos, localizando-os na estrutura morfogênica (Baxt et alii, 1984).

Estudos recentes com anticorpos monoclonais têm tentado identificar outros sítios antigênicos fora de VP1 que supostamente estariam envolvidos na correta organização viral.

Xie et alii (1987), usando 7 anticorpos monoclonais neutralizantes para o subtipo O1 Kaufbeuren, demonstraram a existência de três sítios antigênicos separados no vírus da febre aftosa que estão envolvidos na neutralização viral. Uma região situa-se nos resíduos 144-154, outra vai do resíduo 208 até a região C-terminal de VP1 e a terceira região não foi identificada, mas de acordo com os autores, provavelmente, se encontra em VP2 e/ou VP3. Os autores concluem que o aumento da imunogenicidade talvez só será conseguida quando o terceiro sítio for identificado.

Baxt et alii (1989), usando anticorpos monoclonais contra o subtipo A12 do vírus da febre aftosa, geraram variantes do vírus resistentes a neutralização. O seqüenciamento dessas variantes permitiu a localização de epitopos neutralizantes em VP1 e outro em VP3. Pfaff et alii (1988) e Thomas et alii (1988) identificaram sítios antigênicos em VP2 e VP3 dos subtipos O1 e A10 respectivamente.

Morrel et alii (1987), estudando modificações nos resíduos de lisina, mostraram que VP2 e VP3 possuem resíduos expostos na superfície do virion, embora em menor número do que VP1. Isso é compatível com o papel de VP1 na união à célula (Harrison, 1989) e na estimulação de resposta imune (Laporte et

alii, 1973).

Estas foram as primeiras evidências diretas da participação de outros epitopos neutralizantes fora de VP1 que também contribuem na formação de partes mais complexas do sítio antigênico do vírus da febre aftosa.

As células, através de seus receptores de superfície, são também um fator determinante no mecanismo de neutralização (Dimock, 1987). Três linhas de evidências sugerem que o sítio de união à célula no vírus da febre aftosa está situado nas regiões 133-158 de VP1 e na região C-terminal, fazendo parte do "loop" antigênico. Todos os anticorpos conhecidos que se ligam na região do "loop" previnem a união do vírus à célula (Baxt et alii, 1984). Clivagens proteolíticas nesse "loop" ou na região C-terminal de VP1 anula a interação célula e vírus. O tratamento com tripsina de vírus purificado do tipo O e A, resulta na perda da infectividade e na habilidade do vírus de interagir com seus sítios receptores celulares (Barteling et alii, 1979, Baxt & Bachrach, 1982). Estes dados indicam que VP1 atua tanto como carreador do principal determinante antigênico do vírus da febre aftosa, como também é a proteína que reage com o sítio receptor celular. Além disso, foi identificada uma seqüência em VP1, próxima do determinante antigênico, constituída pelos aminoácidos Arg-Gli-Asp. Essa seqüência tem sido identificada em sistemas celulares como tendo propriedades de adesão, inclusive à células BHK (Ruloslahti, 1988, citado por Acharya et alii, 1989).

A interação do vírus da febre aftosa com a célula é dependente de íons Ca^{2+} e sabe-se que receptores Arg-Gli-Asp tem necessidades de cálcio. De acordo com Ruoslahti, 1988 (citado por Acharya et alii, 1989) o resíduo Asp da seqüência Arg-Gli-Asp poderia contribuir para a interação entre o cálcio e o receptor celular. Mas, para desempenhar tal papel, o aminoácido Asp necessitaria de alguma flexibilidade no "loop" do vírus da febre aftosa que lhe permitisse contribuir para essa interação. Por esse motivo, conclui-se que o sítio de união à célula está exposto na

superfície viral e localizado no "loop" antigênico (Acharya et alii, 1989).

Os receptores celulares de poliovírus e rinovírus também foram identificados. Ambos são membros da família *Picornaviridae* e diferentemente do vírus da febre aftosa possuem receptores em forma de "canyons" inacessíveis aos anticorpos. Os sítios de ligação a receptores não expostos são, por essa razão, mais resistentes as pressões seletivas geradas pelo sistema imune do hospedeiro. (Mendelsohn et alii, 1989; Greve et alii, 1989).

Os resíduos expostos Arg-Gli-Asp projetados no "loop" do vírus da febre aftosa estão cercados por seqüências que variam de linhagem para linhagem. Em mapas de densidade eletrônica aparecem desordenados (Harrison, 1989).

Anticorpos monoclonais que foram mapeados por se ligarem a seqüência Arg-Gli-Asp do vírus da febre aftosa não foram inibidos de se ligarem ao vírus por peptídeos que continham seqüências heterólogas flanqueando essa seqüência conservada, ao passo que peptídeos homólogos inibiram a ligação. Essa flexibilidade de "loop", indica que existe uma estrutura mínima de seqüências de aminoácidos que podem ser reconhecidas por anticorpos para impedir a união do vírus à célula. E parece ser evidente que é essa estrutura mínima que permite a ocorrência da variabilidade do vírus da febre aftosa (Acharya et alii, 1989).

Outra descoberta de grande importância foi a identificação, em diferentes tipos de células, de proteínas de adesão chamadas coletivamente de integrinas. As integrinas reconhecem seqüências Arg-Gli-Asp em proteínas da matriz celular. A inibição da união do vírus à célula por peptídeos contendo receptores Arg-Gli-Asp sugerem que uma ou mais integrinas são os receptores do vírus da febre aftosa (Harrison, 1989).

1.4. Objetivos

O estudo dos genes estruturais que formam o capsídeo do vírus da febre aftosa, mais especificamente VP1 e VP3, é de extrema relevância na elucidação de aspectos básicos como a estrutura e organização gênica do vírus. As evidências apontam para a importância conformacional dessas duas proteínas na formação dos sítios antigênicos que são reconhecidos pela molécula do anticorpo.

Tendo em vista estes aspectos apontados, o presente trabalho foi iniciado e desenvolvido com os seguintes objetivos:

- a) isolar um clone do banco de cDNA em λ gt10 do subtipo viral C₃Indaial, contendo não só a seqüência de VP1 como de VP3.
- b) caracterizar o cDNA, através de seqüenciamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bactérias

Todas as cepas bacterianas utilizadas foram derivadas de *Escherichia coli* K12. *E.coli* hf1 (Young & Davis, 1983) foi utilizada para a seleção de recombinantes do banco de cDNA construído em λ gt10. *E.coli* JM103 (Messing et alii, 1981) foi utilizada para transformação com plasmídeo pUC18. *E.coli* TG2 (Sambrook, 1989) foi hospedeira para transfecção com bacteriófago M13mp18 e M13mp19.

2.2 Plasmídeos

O plasmídeo pUR 292-3 (Schrank et alii, 1988), contendo cDNA que codifica os aminoácidos 117-210 de VP1 do subtipo C₃I foi utilizado como sonda para selecionar recombinantes no banco de cDNA λ gt10.

O plasmídeo pUC18 (Norrander et alii, 1983) foi utilizado como vetor de sub-clonagem do fragmento recombinante selecionado do banco de cDNA. Este plasmídeo confere resistência a

ampicilina e possui um "polylinker" que permite a inserção de fragmentos em diferentes sítios de clivagem.

Utilizou-se como marcadores de peso molecular os fragmentos do DNA do bacteriófago λ clivado com a endonuclease de restrição HindIII e do bacteriófago fd clivado com HaeIII.

2.3 M13mp18 e M13mp19

Os vetores M13mp18 e M13mp19 (Carter et alii, 1985) foram utilizados como vetores de clonagem para a determinação da seqüência de nucleotídeos.

2.4 Enzimas

As enzimas utilizadas foram procedentes da BRL (Bethesda Research Laboratories, Inc.), Biolabs (New England Biolabs, Inc.), Boehringer (Boehringer Mannheim, GmbH), Pharmacia (Pharmacia, Inc.) e Sigma (Sigma Chemical Company). As enzimas foram: nuclease S1, polimerase I, DNA ligase T4, DNase, RNase, Proteinase K, lisozima, transcriptase reversa e enzimas de restrição (EcoRI, Ball, HincII).

2.5 "Screening" do banco de cDNA λ gt10-C3I

O "screening" do banco foi feito segundo a técnica de Benton & Davis (1977) utilizando como sonda a seqüência de cDNA que codifica os aminoácidos 117-210 de VP1 do subtipo C₃Indaial, marcado com α -³²P-dATP pela técnica de "random primer".

2.6 Extração de DNA de fago λ gt10 em pequena escala

Fago λ gt10 foi preparado em pequena escala por infecção de *E.Coli* C600 hfl em meio líquido conforme Blattner et alii (1977) modificado. Uma colônia isolada de C600 foi inoculada em 20

ml de LB (composição por litro de água: 17g de bactotripton, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl pH 7.5) a 37°C, por 12-14 horas com agitação. Esta cultura foi centrifugada a 10 krpm por 10 minutos a 4 °C e as bactérias foram ressuspensas em 5 ml de 10mM de MgSO₄. A infecção procedeu misturando-se fago com 0.2 ml de células e que foram incubadas a 37 °C, por 15 minutos. À mistura foi adicionada 10 ml de LB contendo 10mM de MgSO₄ e que foi incubada por 12-14 horas com agitação (200 rpm). Adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio e as células foram incubadas por mais 10 minutos a 37°C com agitação vigorosa (300 rpm). A cultura, passada para outro frasco evitando-se o clorofórmio, foi centrifugada 15 minutos a 10 krpm a 4 °C. Ao sobrenadante adicionou-se 10 ml de 20% de PEG 6000, mais 2.5M de NaCl e incubou-se por 1 hora em banho de gelo. O material foi centrifugado a 3 krpm por 20 minutos. O "pellet" foi seco e ressuspenso em 200 µl de SM (100mM DE NaCl; 8.1 mM de MgSO₄; 50 mM de Tris-HCl pH 7.5; 2% de gelatina tipo III - Baker). Após, foi adicionado DNase e RNase ambas para concentração final de 1 µg/ml, incubando-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se proteinase K e SDS 10% para a concentração final de 1 mg/ml, incubando-se 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi então extraído com 1 volume de fenol. Adicionou-se 1/10 de volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto, incubando-se por 30 minutos a -20°C. Depois foi centrifugado por 20 minutos a 10 krpm. O DNA foi então lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 20µl de TE (10mM de Tris-HCl pH 8.0; 0.1 mM de EDTA).

2.7 Extração de fago λgt10 em grande escala

O procedimento utilizado para a extração de grandes quantidades de DNA de λ foi essencialmente o mesmo da preparação em pequena escala, mudando apenas o método de purificação que passa a ser em gradiente de CsCl, segundo Thomas & Davis (1975). O gradiente foi preparado com soluções de CsCl em 10mM de Tris-HCl

pH 7.5 e 10mM de MgSO₄ com $\rho = 1.6$, $\rho = 1.5$, $\rho = 1.4$ e $\rho = 1.3$. O gradiente foi então ultracentrifugado a 30 krpm por 2 hora a 16°C. A banda de fagos (entre $\rho = 1.4$ e $\rho = 1.3$) foi recolhida por aspiração, onde foi misturado igual volume de solução saturada de CsCl. Um novo gradiente descontínuo foi então preparado em condições idênticas ao primeiro. Ao final a banda recolhida foi dialisada contra 1 litro de 50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de MgSO₄, durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguiu-se extração de DNA, adicionando-se EDTA, proteinase K e SDS para concentrações finais de 20 mM, 50µg/ml e 0.5% respectivamente, e foi incubada a 65 °C, por 1 hora. Seguiu-se extrações consecutivas com 1 volume de fenol tamponado com 50mM de Tris-HCl e 1 volume de fenol-clorofórmio. O DNA foi precipitado pela adição de NaCl para concentração final de 0.1M e 2 volumes de etanol absoluto; incubando-se a -20°C por no mínimo 1 hora. A preparação foi centrifugada a 10 krpm por 30 minutos a 4 °C. O DNA recolhido foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 1 ml de TE. A concentração do DNA foi medida pela absorbância à 260 nm.

2.8 Isolamento de DNA plasmidial em pequena escala

a. Extração alcalina (Birnboim & Doly, 1979)

Uma colônia da cepa portadora do plasmídeo foi inoculada em meio contendo o antibiótico apropriado e incubada por 12-14 horas, a 37°C com agitação (150 rpm). Transferiu-se 1 ml do cultivo para um tubo eppendorf e centrifugou-se a 10 krpm por 5 minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 100µl da solução contendo 50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM de EDTA e foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, adicionou-se 200µl de 0.2N de NaOH e SDS 1% que foi agitado energicamente para provocar a lise das bactérias. Adicionou-se 150µl da solução de 5M de acetato de sódio pH 4.8 (2M de ácido acético, 3M de acetato de sódio) e incubou-se por 5

minutos em gelo. O material foi então centrifugado a 10 krpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a extração com 1 volume de fenol. O DNA foi precipitado adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto e imediatamente centrifugado a 10 krpm por 10 minutos, a temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi lavado com etanol 70%, seco ressuspenso em 50µl de TE.

2.9 Isolamento de DNA plasmidial em grande escala

b. Método Triton (Clewel & Helinski, 1969)

A partir de uma colônia isolada de *E.coli* contendo o plasmídeo a ser extraído fez-se um pré-inóculo em 3 ml de LB com 50µg/ml de ampicilina e incubou-se por 12-14 horas a 37°C com agitação. Toda a pré-cultura foi inoculada em 300 ml de LB com o antibiótico ampicilina e incubado por 12-14 horas a 37°C com agitação. A cultura foi centrifugada a 6 krpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspenso em 10 ml da solução (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 25% de sacarose). Após, adicionou-se ao material 200µl de lisozima (50 mg/ml) que foi deixado por 10 minutos em gelo. Adicionou-se então 100µl de RNase (10 mg/ml) e 1 ml de 0.5M de EDTA que foi incubando novamente em gelo por 5 minutos. Foi adicionado o mesmo volume da solução de lise, tampão triton (1X) (composição para 100 ml de solução: 1 ml de triton 10%, 5 ml de 1M de Tris-HCl pH 8.0 e 12,5 ml de 0.25 M de EDTA), que foi deixado em gelo por 15 minutos com agitação suave. Centrifugou-se o material a 18 krpm por 1 hora a 4 °C. O material, extraído com 1 volume de fenol e fenol-clorofórmio, foi centrifugado a 5 krpm por 15 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 0.1 volume de acetato de sódio 3M ou 0.01 volume de NaCl 5M mais 2 volumes de etanol absoluto, incubando a -20 °C por 30 minutos. Centrifugou-se o material 10 krpm por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado em etanol 70% e seco sob vácuo, segundo Maniatis et alii (1982). Após, ressuspendeu-se o DNA com 1 ml de

TE (10mM de Tris-HCl pH 8.0; 0.1 mM de EDTA) por 12-14 horas em gelo. O volume foi então completado para 2.4 ml de TE, onde adicionou-se 3.8 g de CsCl. Adicionou-se 380µl de brometo de etídeo (10 mg/ml). O material foi ultracentrifugado por 40 horas a 46 krpm a 22 °C. A banda inferior referente ao plasmídeo foi coletada com seringa de 1 ml. Diluiu-se a amostra com 1 volume de água e adicionou-se butanol saturado com água para a total retirada do brometo de etídeo e dialisou-se contra 1000 ml de TE por 2 horas.

2.10 Análise do DNA

a. Eletroforese em gel de agarose horizontal

Como descrito por Maniatis et alii (1982) foi utilizado gel de agarose a 0.8% em TEB 1X (89 mM de Tris-OH; 2.5 mM de EDTA; 89 mM de H_3BO_3 pH 8.2), contendo 0.25 µg/ml de brometo de etídeo. O tampão de corrida utilizado foi TEB 1X.

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis consistiram de 6% de acrilamida (30% de acrilamida, 0.8% de bizacrilamida) em TEB 1X (Maniatis et alii, 1982). Para a polimerização da acrilamida, adicionou-se 60µl de APS (25%) e 6µl de TEMED em um volume final de 20 ml. O tampão utilizado foi TEB 1X. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídeo em água.

c. Eletroforese em gel de poliacrilamida para sequenciamento de DNA

As amostras foram submetidas a eletroforese sob condições desnaturantes em gel 5% de acrilamida, 7.5 M de uréia em TEB 1X. Adicionou-se 140µl de APS e 35µl de TEMED em um volume

final de 50 ml. TEB 1X foi utilizado como tampão de corrida (Sanger et alii, 1977).

2.11 Recuperação de fragmentos de DNA de géis de agarose

Conforme Tautz & Renz (1983) modificado, os DNAs foram separados por eletroforese em géis de agarose e as bandas foram cortadas e colocadas em tubos com 10 volumes de acetato de sódio-EDTA (0.3 M de acetato de sódio; 1 mM de EDTA pH 7.0) sob agitação suave no escuro durante 10-15 minutos. As fatias dos géis foram então transferidas para um eppendorf pequeno (0.5 ml) perfurado na tampa e na porção inferior e recoberto com lâ de vidro siliconizada com sigmacote (Sigma). Foram então colocadas em nitrogênio líquido por 1 minuto. Centrifugou-se a 10 krpm por 10 minutos coletando-se o material em eppendorf de 1.5 ml. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 1 M de $MgCl_2$ e 10% de ácido acético na proporção de 1:100, mais 2.5 volumes de etanol incubando a $-20^{\circ}C$ por 30 minutos. Centrifugou-se a 10 krpm por 30 minutos e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70% e seco sob vácuo. Ressuspendeu-se o DNA em TE.

2.12 Recuperação de fragmentos de DNA em géis de poliacrilamida

Conforme Maniatis et alii (1982), os DNAs foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. As bandas cortadas e colocadas em um tubo foram homogeneizadas com bastão de vidro recobertos com parafilme. Adicionou-se 3 volumes de água e incubou-se a $42^{\circ}C$ por 18 horas em banho maria. Após centrifugou-se o material por 10 minutos a 12 krpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e adicionou-se 200 μ l de TE no gel restante, repetindo o passo anterior de centrifugação e transferência do sobrenadante. Adicionou-se 1/10 do volume de 3M de NaAc e 2.5 volumes de etanol, incubando por 30 minutos a -20

°C. Centrifugou-se o material por 15 minutos a 12 krpm. Após, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em TE.

2.13 Transferência de DNA de géis de agarose para membrana de náilon

Para a transferência de fragmentos de DNA clivados do gel de agarose para membrana de náilon foi utilizado o procedimento descrito por Southern (1979). Após corrida eletroforética horizontal, o gel foi imerso na solução de desnaturação (1.5 M de NaCl, 0.5 M de NaOH) por 30 minutos e depois transferido para uma solução de neutralização (3M de acetato de sódio pH 5.5), também por 30 minutos. Após o tratamento, o gel foi colocado sobre um suporte plano coberto com papel Whatman 3mm com as extremidades imersas numa tigela contendo o tampão de transferência SSC 20X (3M de NaCl, 0.3M de citrato de sódio). Sobre o gel foram colocadas, na ordem da membrana, uma folha de papel Whatmann, toalhas de papel e um peso de 1 Kg para garantir um contato uniforme. A transferência ocorreu a temperatura ambiente por 18 horas. Depois colocou-se a membrana de náilon sobre papel filtro a 80 °C por 2 horas para a fixação do DNA à membrana.

2.14 Marcação de DNA com α -³²P-dATP

As sondas de DNA foram preparados por marcação do DNA com sonda α -³²P- dATP por "random primer", conforme indicação do fabricante (Molecular Boehringer Mannheim). O DNA foi fervido a 100 °C por 2 minutos e logo em seguida colocado no gelo. Adicionou-se 1 μ l da mistura de 0.5 mM de dCTP, dGTP e dTTP, 1 μ l de tampão 10X (0.5 M de Tris pH 6.9, 0.1 M de sulfato de magnésio, 1mM de dithiothreitol e 0.6 mM de cada dCTP, dGTP e dTTP), 1 μ l da polimerase Klenow e uma mistura de hexanucleotídeos, num volume final de 10 μ l de água. A esta reação foi acrescentado 10 μ Ci de

α -³²P- dATP, incubando por 30 minutos a 37°C. A reação foi parada a 65 °C por 10 minutos. O material foi passado por uma coluna de gel filtração sephadex G-50. A coluna foi montada em seringas descartáveis de 1 ml (Maniatis et alii, 1982), onde aplicou-se a solução no topo. Centrifugou-se por 1 minuto a 1000 rpm. A medida de radioatividade foi feita em contador de cintilação líquida, onde obteve-se uma atividade específica entre 10⁷-10⁸ cpm/ μ g de DNA.

2.15 Hibridização de colônias

Para hibridização de colônias com fragmentos de cDNA marcados com α -³²P-dATP foram feitas replicas com filtros de nitrocelulose. Os filtros foram colocados em contato com as colônias bacterianas. Após, retirou-se as membranas que foram embebidas sucessivamente nas seguintes soluções: 1) 0.5M de NaOH por 5 minutos para a lise e desnaturação; 2) 0.5M de Tris-HCl pH 7.4 por 4 minutos para a neutralização. Secou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Colocou-se por 2 horas a 80°C para a fixação do DNA a membrana. Após, os filtros foram incubados com a solução de pré-hibridização 5X SSC, 50% formamida, 50mM de fosfato de sódio pH 6.5 e 1X denhardt a 42°C por 2 horas. A solução de hibridização foi a mesma da pré-hibridização, acrescida da sonda, incubando por 12-14 horas a 42°C. Após a hibridização, os filtros foram submetidos a 4 lavagens com: 1) 2X SSC, 0.5% SDS, duas vezes repetidas por 15 minutos a temperatura ambiente; 2) 0.1X SSC, 0.1% de SDS duas vezes repetidas por 15 minutos a temperatura ambiente. Os filtros foram então colocados em contato com filme para raio-X e expostos por 12-14 horas.

2.16 Subclonagem dos fragmentos de DNA recombinantes em pUC18

a. Clivagem e ligação do DNA

O DNA de λ gt10 recombinante foi clivado com EcoRI. O fragmento liberado foi então purificado em gel de agarose e ligado ao vetor pUC18, utilizando-se para isso DNA ligase de T4 (1U/ μ l) e tampão de ligação 10X (Tris-HCl 0.5M pH 8.0, MgCl₂ 0.1M; DTT 0.2M; BSA 100 μ g/ml, ATP 10mM). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 3 horas ou por 12-14 horas em 10-12 °C.

b. Transformação bacteriana

Segundo Morrison (1977), fez-se um inóculo de 1% de uma cultura fresca da cepa hospedeira em 30 ml de LB e incubou-se a 37°C com agitação até a cultura atingir a absorbância de 0.4 a 0.6 medida em 600 nm em espectrofotômetro. 20 ml foi transferido para um tubo de centrifuga estéril. Centrifugou-se a 5 krpm por 5 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 10 ml de MgCl₂ 0.1 M e deixadas por 1 hora em banho de gelo. Após centrifugação, ressuspendeu-se em 5 ml de CaCl₂ 0.1 M e incubou-se a 4 °C por 30 minutos. Centrifugou-se e ressuspendeu-se em 1 ml de CaCl₂ 0.1M. Após, as células ficaram competentes para serem transformadas.

DNA foi incubado com 100 μ l de células competentes por 30 minutos a 4 °C. As células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Adicionou-se 0.4 ml de LB e incubou-se a 37 °C por 1 hora com agitação. 0.1 ml foi espalhado com alça de Drigalski em placas de LB contendo o antibiótico adequado para a seleção dos transformantes. No caso de pUC18 também foram adicionados 10 μ l de IPTG (isopropiltio- β -d-galactopiranosídeo a 100 mM) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -d-galactosídeo a 40 mg/ml, dissolvido em dimetil-formamida) à placa para seleção de colônias contendo plasmídeos recombinantes.

2.17 Subclonagem dos fragmentos do pUC18 recombinante nos fagos M13mp18 e M13mp19

a. Clivagem e ligação do DNA

Para sequenciamento parcial, os DNAs do plasmídeo pUC18 e do fago M13mp19 foram clivados separadamente com EcoRI. O fragmento liberado do plasmídeo pUC18 foi purificado em gel de poliacrilamida 6% e ligado ao vetor M13mp19.

Posteriormente, o fragmento gerado por EcoRI foi clivado com **BalI** em sítio único para permitir o completo seqüenciamento do mesmo. A clonagem foi feita utilizando-se o vetor M13mp18 clivado com **Hinc II** e **EcoRI**. Tanto **BalI** como **HincII** são enzimas que cortam originando extremidades cegas. A reação de ligação foi feita utilizando-se DNA ligase de T4 e tampão de ligação 10X.

b. Transfecção

As células foram tratadas como em 2.16b. A 0.2 ml de células competentes, adicionou-se o DNA e incubou-se no gelo por 30 minutos. Após o choque térmico a 42°C por 2 minutos, as células foram plaqueadas em meio YT semi-sólido (composição por litro de água: triptona 0.8%, extrato de levedura 0.8%, cloreto de sódio 0.5% e ágar 0.75%), 0.2 ml de células em fase logarítmica, 25µl de X-gal e 10µl de IPTG foram adicionados para a seleção dos recombinantes. Incubou-se a 37°C por 18 horas.

2.18 Multiplicação dos fagos M13mp18 e M13mp19

Colônias do bacteriófago M13 foram transferidas de uma placa com células infectadas por ele para 3 ml de LB líquido. Adicionou-se 100µl de uma cultura fresca da cepa hospedeira e incubou-se por 18 horas a 37°C com agitação vigorosa. Centrifugou-se as células, ficando apenas o sobrenadante que continha partículas de fago.

2.19 Análise dos DNAs recombinantes em M13mp18/19

a. Dige

Utilizado para desfazer o capsídeo do fago permitindo visualização direta do DNA em gel.

Coletou-se 20 μ l do sobrenadante de cultivo contendo possíveis fagos recombinantes, adicionou-se SDS 2%, 10 μ l de tampão de amostra 6X (0.15% de ABF, 0.15% de xilenocianol e 15% de ficoll), incubando por 5 minutos a 65 $^{\circ}$ C. Aplicou-se as amostras para eletroforese em gel de agarose 0.5%.

b. C-teste

Utilizado para detecção de fragmentos inseridos em ambas as orientações do vetor M13 por hibridização.

Coletou-se 20 μ l do sobrenadante de cultura contendo fagos recombinantes que foram misturados com 20 μ l do sobrenadante de outra amostra recombinante. Adicionou-se 8 μ l de hin buffer 10X (Tris-HCl 1M pH 7.5, MgCl₂ 1M, NaCl 5M), SDS 2% e 25 μ l de tampão de amostra 6X incubando por 1 hora a 65 $^{\circ}$ C. Aplicou-se as amostras em gel de agarose 0.5%.

2.20 Seqüenciamento

Os fragmentos de cDNA foram subclonados nos vetores M13mp18/19 para determinação da seqüência. A seqüência nucleotídica foi determinada utilizando-se terminadores de cadeia, segundo método descrito por Sanger et alii (1977).

a. "Templates"

Conforme Sanger et alii (1977), inoculou-se 100 μ l da solução de fagos em 3 ml de LB. Adicionou-se 100 μ l de uma cultura fresca da cepa TG2 e incubou-se a 37 $^{\circ}$ C por 18 horas com agitação

vigorosa. 1 ml da cultura foi centrifugada a 10 krpm por 15 minutos. Coletou-se 800 μ l do sobrenadante e adicionou-se 200 μ l de 20% de PEG 6000 e 2.5 M de NaCl, incubando em gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a 10 krpm por 30 minutos e removeu-se cuidadosamente o sobrenadante com pipeta capilar. O precipitado foi então ressuspensionado em 100 μ l de TE. Adicionou-se 50 μ l de fenol e centrifugou-se. O sobrenadante foi coletado e repetiu-se a extração com fenol-clorofórmio. O DNA recolhido foi precipitado com 1/2 volume de acetato de amônio e 2.5 volume de etanol absoluto. Centrifugou-se a 10 krpm por 30 minutos, lavou-se o precipitado com etanol 70% e secou-se sob vácuo. Ressuspendeu-se em TE.

b. Anelamento

A reação foi realizada com 7 μ l de "template", 2 ng de primer universal, 2 μ l de 5X SB (200mM de Tris-HCl pH 7.5, 50 mM DE MgCl₂, 250 mM de NaCl) em um volume final de 10 μ l. Incubou-se a 80°C por 15 minutos e deixou-se esfriar lentamente até atingir a temperatura ambiente.

c. Reação de seqüenciamento

Utilizou-se 4 μ Ci de α -³²P-dATP, 9 μ l de água e 1U de fragmento klenow da DNA polimerase I para cada template. A mistura foi dividida igualmente em 4 tubos eppendorf. A cada um adicionou-se 2 μ l de A (150 μ l de A⁰ e 50 μ l de ddATP 0.125mM), G (150 μ l de G⁰ e 50 μ l de ddGTP 0.5mM), C (150 μ l de C⁰ e 50 μ l de ddCTP 0.25 mM) ou T (150 μ l de T⁰ e 50 μ l de ddTTP 1.25mM), incubou-se a 42 °C por 15 minutos. Após, adicionou-se 2 μ l de chase (0.5 mM de cada dNTP) a cada eppendorf e incubou-se a 42°C por 15 minutos. Adicionou-se a solução de parada (0.3% de azul de bromofenol, 0.3% de xileno-cianol, 10 mM de Na₂EDTA pH 8.2 dissolvidos em formamida) e em seguida, incubou-se a 90°C por 10

minutos. Aplicou-se as amostras no gel. Depois da eletroforese, o gel foi fixado em ácido acético, lavado em água corrente, seco e exposto a filme de raio-X por 18 horas.

2.21 Análise da seqüência de nucleotídeos

A análise da seqüência foi feita utilizando-se programas de computador como LFASTA e PUSTELL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de clones recombinantes

O isolamento de clones do banco λ gt10-C₃I foi feito utilizando-se como sonda o plasmídeo pUR292-3 que contém a seqüência que codifica os aminoácidos 117 a 210 de VP1 do subtipo C₃Indaial. Como resultado foram obtidos 40 clones recombinantes a partir da hibridização.

Os fagos recombinantes foram purificados por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de cloreto de céσιο. Os DNAs preparados destas amostras foram clivados com EcoRI, separados por eletroforese e hibridizados com pUR292-3 pela técnica de Southern (1975). Com a confirmação selecionou-se 10 clones recombinantes que apresentaram tamanhos que variaram de 0.3 a 0.9 pares de bases.

Os fragmentos dos clones selecionados foram purificados em gel de agarose e subclonados no sítio de EcoRI do plasmídeo pUC18 que fica localizado no gene da β -galactosidase. A partir daí, procedeu-se as transformações, utilizando a bactéria JM103 como hospedeira. A identificação dos clones recombinantes foi feita através da coloração das colônias bacterianas crescidas em placas de LB contendo ampicilina (Ap), X-gal e IPTG. As colônias recombinantes eram brancas devido a interrupção do gene da β -galactosidase por fragmentos inseridos e as colônias não recombinantes eram azuis, devido a ação da β -galactosidase sobre o X-gal presente no meio.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos pela técnica de lise alcalina para serem clivados novamente com EcoRI. Os cDNAs liberados pela clivagem foram então purificados em gel de poliacrilamida 6% e subclonados no sítio de EcoRI da forma replicativa do bacteriófago M13mp19 para serem seqüenciados. Este vetor possui o promotor e parte do gene Lac Z que codifica o peptídeo α da β -galactosidase. Da mesma forma que o pUC18, esses

fagos quando induzidos por IPTG produzem o peptídeo α que por complementação com o peptídeo w presente na bactéria irão gerar a proteína β -galactosidase. Essa enzima por sua vez degrada X-gal que dá a coloração azul às colônias. Quando um fragmento é inserido no "polylinker" desse vetor não ocorre mais a produção do peptídeo α , conseqüentemente são gerados fagos recombinantes cujas colônias são brancas. A introdução do DNA de fago contendo as seqüências recombinantes foi feita por transfecção utilizando-se *Escherichia coli* TG2 como bactéria hospedeira.

Seqüenciamento parcial

As placas brancas resultantes da transfecção foram inoculadas em meio líquido juntamente com a bactéria TG2. A partir do crescimento da cultura, utilizou-se o sobrenadante que continha fagos DNA fita simples para a confirmação dos recombinantes através de técnicas como dige e C-teste e para a preparação dos "templates".

Seguiu-se o seqüenciamento parcial dos clones, segundo a técnica de Sanger et alii (1977). Dos seqüenciamentos parciais selecionou-se o clone 24 para ser totalmente caracterizado. A localização da seqüência de cDNA foi feita pela comparação das seqüências obtidas com a do subtipo C1, seqüenciado por Beck et alii (1983). Com o seqüenciamento parcial pode-se estimar o tamanho do clone 24, ficando em torno de 900 nucleotídeos que abrangem parte de VP3 (extremidade C-terminal), VP1 inteira e o início do gene não estrutural p52 (extremidade N-terminal).

Seqüenciamento total do clone 24

A figura 1 apresenta a seqüência completa de nucleotídeos do clone 24, juntamente com a seqüência deduzida de aminoácidos.

Para que toda a seqüência fosse caracterizada pelo

método de terminação de cadeia usando dideoxynucleotídeos foi necessário clivar o fragmento de DNA do clone 24 em duas partes para serem subclonados separadamente no vetor M13mp18. Através da análise do mapa de restrição da seqüência de C₃I (Makoff et alii, 1982), optou-se pela utilização da enzima **BalI** (TGGCCA) para a clivagem do cDNA. O sítio de clivagem fica localizado no nucleotídeo 594 de VP1. O vetor M13mp18 escolhido para a subclonagem dos fragmentos foi clivado com **EcoRI/HincII**. Este vetor permitiu que a seqüência fosse caracterizada, iniciando a leitura a partir do sítio de **BalI**. Tanto **BalI** como **HincII** são enzimas que clivam o DNA dando origem a extremidades cegas. Portanto, os fragmentos clivados com **EcoRI/BalI** foram subclonados no vetor M13mp18 clivado com **EcoRI/HincII** e transfectados utilizando a bactéria TG2. A partir daí, foram obtidos dois clones, confirmados por seqüenciamento. Um deles abrange os nucleotídeos que vão do sítio de **BalI** em direção a VP3. O outro clone recombinante, porém, inicia na posição 380 do clone 24 e vai em direção a p52. Este tipo de clonagem não era esperado. Supõem-se que houve problema com a clivagem do fragmento, permitindo a inserção do cDNA no vetor M13mp18 apesar de não possuir sítio de clivagem para **BalI** na posição 380 de VP1.

O seqüenciamento total mostrou que o clone 24 está formado por 217 nucleotídeos de VP3 (posição 1-217) que codificam para 72 aminoácidos, 630 nucleotídeos de VP1 (posição 218-847) que codificam para 210 aminoácidos e 54 nucleotídeos do gene não estrutural p52 (posição 848-901).

De toda a seqüência do clone 24 caracterizada existem ainda duas regiões em VP3 que precisam ser confirmadas. A primeira delas é na posição 32, onde não se consegue identificar qual o nucleotídeo que faz parte da formação do códon. A outra região a ser confirmada situa-se na posição 175. Neste caso o nucleotídeo não é identificado por um problema de compressão das bases durante o seqüenciamento.

Análise da seqüência de aminoácidos de parte de VP3

A seqüência parcial de 72 aminoácidos da extremidade C-terminal de VP3 (subtipo C₃Indaial), deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos, foi comparada com parte das seqüências de aminoácidos de VP3 dos subtipos C₁ (Beck et alii, 1983), A10 (Boothroyd et alii, 1982) e O1K (Kurz et alii, 1981). (Fig. 2) As comparações revelaram 4 mudanças de aminoácidos entre C₃I/C₁, 11 mudanças entre C₃I/A10 e 10 entre C3I/O1K. A seqüência inteira de VP3 para o subtipo C₃I ainda não é conhecida.

Entretanto, Beck et alii (1983) ao comparar as seqüências inteiras de aminoácidos de VP3 dos subtipos O1, A10 e C1, encontrou níveis de trocas de aminoácidos de 16% entre O1K/C1, 19% entre O1K/A10 e 18% entre A10/C1. O nível de homologia encontrado foi de 76% entre as três seqüências de VP3. Esse nível de homologia, quando comparado com o encontrado para VP1 e VP2, segundo o mesmo autor, mostra que, mesmo entre sorotipos diferentes, VP3 é uma das mais conservadas proteínas capsídicas do vírus da febre aftosa. Os níveis de homologia entre os três subtipos para VP2 foram de 74% e para VP1 de 61%.

A região parcialmente seqüenciada de VP3 do subtipo C₃I poderá ser importante mais tarde, para a expressão de VP1 do clone 24. Sabe-se que para a proteína VP1 adotar uma estrutura secundária adequada de seus sítios antigênicos é preciso o auxílio das outras proteínas estruturais do capsídeo. As mais prováveis proteínas envolvidas na expressão da antigenicidade viral são VP2 e/ou VP3 (Baxt et alii, 1989).

Análise da seqüência nucleotídica e de aminoácidos de VP1

A seqüência nucleotídica completa de VP1 foi comparada e alinhada com duas seqüências do mesmo subtipo caracterizadas por Makoff et alii (1982) e Cheung et alii (1983). (Fig. 3)

A partir da comparação de VP1 com a seqüência descrita por Makoff et alii (1982) pode-se observar que existem 22 mudanças de nucleotídeos que resultaram na troca de 7 aminoácidos. (Fig. 4) As trocas de aminoácidos foram nas seguintes posições: 24, 56, 82, 102, 135, 138 e 194.

A comparação de VP1 do clone 24 com VP1 caracterizada por Cheung et alii (1983), mostrou que ocorreram 18 mudanças de nucleotídeos que resultaram na troca de 7 aminoácidos nas posições: 43, 56, 102, 129, 135, 139 e 140. Em ambas as comparações pode-se verificar que o número de aminoácidos trocados foi o mesmo, variando apenas o número de mudanças nucleotídicas que, na maioria das vezes, foram mutações pontuais na terceira base.

Os níveis de homologia entre a seqüência de VP1 do clone 24 e as seqüências de VP1 caracterizadas por Makoff et alii (1982) e Cheung et alii (1983) são, respectivamente, de 96.5% e de 97.1%. As cepas de C₃Indaial foram isoladas no Brasil, nos anos de 1978 (Makoff et alii, 1982), 1972 (cDNA do clone 24) e 1971 (Cheung et alii, 1983). Considerando a proximidade das duas últimas datas e o nível de homologia encontrado entre VP1 de C₃I-clone 24/C₃I de Cheung et alii (1983) é possível dizer que ambas as seqüências não variaram muito, e que, provavelmente, essas diferenças encontradas são resultado da adaptação do vírus no campo e/ou da propagação em laboratórios.

Segundo Mateu et alii (1987), os aminoácidos 138-156 de VP1, correspondem a região imunodominante do vírus da febre aftosa. De acordo com a figura 4, nessa região VP1 do clone 24 sofreu uma mudança de aminoácido na posição 138 (Ala-Thr) em relação a seqüência de VP1 determinada por Makoff et alii (1982). A troca de uma alanina que é hidrofóbica, por uma treonina que é levemente hidrofílica parece não alterar a especificidade dos determinantes antigênicos. O mesmo pode ser dito para as duas variações de aminoácidos que ocorreram com VP1-clone 24 e a seqüência determinada por Cheung et alii (1983). As variações

foram nas posições 139 (Gly-Ser) e 140 (Val-Ala). Em ambos os casos as trocas de aminoácidos foram conservativas, ou seja, as características dos aminoácidos são as mesmas. Alanina e valina são hidrofóbicas. E serina e glicina são levemente hidrofílicas.

Desse estudo conclui-se, portanto, que existe uma grande heterogeneidade entre os isolados do vírus da febre aftosa. E que essa heterogeneidade genética existe não somente entre linhagens de diferentes sorotipos, mas também entre linhagens serologicamente próximas. O conhecimento dessas mudanças antigênicas são de extrema relevância quando considera-se o aspecto prático do controle da doença, uma vez que o grau de proteção da população vacinada depende da homologia entre a linhagem da vacina e a linhagem do campo.

Perspectivas

A seqüência da cDNA do clone 24 deverá ser subclonada em vetor de expressão que possibilite a expressão de VP3-VP1. Tal cDNA ou parte do mesmo poderão ser utilizados para se testar a reatividade de anticorpos monoclonais com regiões de VP1, a fim de localizar os epítopos envolvidos na neutralização.

P G L N S K F T F S - P Y I S A A D Y A
CCCAGGTTTGAACCTCTAAGTTCACATTTTCA-TCCCCTACATCTCGGCCGCTGACTACGC
10 20 30 40 50 60

Y T A S S E A E T T S V Q G W V C V Y Q
ATACACCGCGTCCAGCGAGGCTGAAACAACAAGCGTACAGGGATGGGTTTGTGTGTACCA
70 80 90 100 110 120

I T H G K A D A D A L V V S A S A G K D
GATTACACACGGCAAGGCAGACGCCGACGCGCTCGTCTCGCTTCGGCGGG-AAAGA
130 140 150 160 170 180

VP3 | VP1

F E L R L P V D A R P Q T T T T G E S A
CTTTGAGCTCCGGCTACCTGTGGACGCTAGACCGCAAACCTACGACCACTGGTGAATCTGC
190 200 210 220 230 240

D P V T T T V E N Y G G E T Q T Q R R H
CGACCCCGTCACCACTACCGTTGAGAACTATGGAGGAGAAACACAAACTCAACGTCGCCA
250 260 270 280 290 300

H T D V A F V L D R F V K V H V S G N Q
CCACACTGACGTTGCCTTCGTTCTTGACCGGTTTGTGAAGGTCCATGTGTGCGGGCAACCA
310 320 330 340 350 360

H T L D V M Q A H K D S I V G A L L R A
ACACACACTGGACGTTATGCAGGCACACAAGGACAGTATTGTGGGTGCACTCCTCCGCGC
370 380 390 400 410 420

A T Y Y F S D L E I A V T H T G K L T W
GGCCACATACTACTTCTCTGACTTGAAATAGCAGTGACCCACACTGGGAAGCTCACATG
430 440 450 460 470 480

V P N G A P V S A L D N T T N P T A Y H
GGTGCCCAACGGCGCCCCAGTTTCTGCACTTGACAACACAACCAACCCCACTGCCTACCA
490 500 510 520 530 540

K G P L T R L A L P Y T A P H R V L A T
CAAGGGACCGCTGACTCGGCTGGCTCTCCCATACACCGCACCAACCGCGTGTGGCCAC
550 560 570 580 590 600

T Y T G T T V Y T T S A R R G D L A H L
GACGTACACCGGTACAACGGTCTACACTACCAAGTGCACGCAGGGGAGACCTAGCCACCT
610 620 630 640 650 660

A A A H A R H L P T S F N F G A V K A E
 GCGGCGGCGCACGCTCGGCACCTGCCGACGTCGTTCAACTTTGGTGCAGTTAAAGCAGA
 670 680 690 700 710 720

T I T E L L V R M K R A E L Y C P R P V
 GACAATCACAGAGCTGCTTGTGCGCATGAAGCGTGCTGAACTCTACTGCCCCAGACCGGT
 730 740 750 760 770 780

L P V Q P A G D R H K Q P L I A P A K Q
 CCTTCCGGTCCAACCAGCGGGCGATAGACACAAGCAACCGCTCATTGCGCCAGCGAAGCA
 790 800 810 820 830 840

VP1 | p52
 L L N F D L L K L A G D V E S N P G P F
 ACTGCTGAACTTCGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCTT
 850 860 870 880 890 900

C

Figura 1. Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do
 cDNA-clone 24 do vírus da febre aftosa, C₃Indaial.

		10		20		30
C3I	P	G	L	N	S	K
	F	T	F	S	-	P
	Y	I	S	A	A	D
	Y	A	Y	T	A	S
	S	S	E	A	E	T
	T					
C1	T					
A10						
01K						

		40		50		60
C3I	S	V	Q	G	W	V
	C	V	Y	Q	I	T
		H	G	K	A	D
		A	D	A	D	A
		L	V	V	S	A
		S	A	S	A	G
		K	D			
C1	C					
A10	N					
01K	N					

		70
C3I	F	E
	L	R
	L	P
	V	D
	A	R
	P	Q
C1		
A10		
01K		

Figura 2. Comparação das seqüências de aminoácidos de VP3 dos subtipos C₃Indaial (clone 24), C1 (Beck et alii, 1983), A10 (Boothroyd et alii, 1982), 01K (Kurz et alii, 1981).

	370	380	390	400	410	420
C3I	GCACCACACCGCGTGTGGCCACGACGTACACCGGTACAACGGTCTACACTACCGAGTGCA					

Mak	GCACCACACCGCGTGTGGCCACGACGTACACCGGTACAACGGCCTACACTGCCAGTGCA					

Che	GCACCACACCGCGTGTGGCCACGGCGTACACCGGTACAACGGCCTACACTACCGGTGTA					
	370	380	390	400	410	420

	430	440	450	460	470	480
C3I	CGCAGGGGAGACCTAGCCCACCTGGCGGGCGGCACGCTCGGCACCTGCCGACGTCGTTC					
	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::
Mak	CGTAGGGGAGATCTAGCCCACCTGGCGGGCGGCACGCTCGGCACCTGCCGACGTCGTTC					
	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::	:: ::::
Che	CGCAGGGGAGACCTAGCCCACCTGGCGGGCGGCACGCTCGGCACCTGCCGACGTCGTTC					
	430	440	450	460	470	480

	490	500	510	520	530	540
C3I	AACTTTGGTGCAGTTAAAGCAGAGACAATCACAGAGCTGCTTGTGCGCATGAAGCGTGCT					

Mak	AACTTTGGTGCAGTTAAAGCAGAGACAATTACAGAGCTGCTTGTGCGCATGAAACGTGCT					

Che	AACTTTGGTGCAGTTAAAGCAGAGACAATCACAGAGCTGCTTGTGCGCATGAAGCGTGCT					
	490	500	510	520	530	540

	550	560	570	580	590	600
C3I	GAACTCTACTGCCCCAGACCGGTCCTTCCGGTCCAACCAGCGGGCGATAGACACAAGCAA					

Mak	GAACTCTACTGCCCCAGACCGGTCCTTCCGGTCCAACCAACGGGCGACAGACACAAGCAA					

Che	GAACTCTACTGCCCCAGACCGGTCCTTCCGGTCCAACCAGCGGGCGATAGGCACAAACAA					
	550	560	570	580	590	600

	610	620	630
C3I	CCGCTCATTGCGCCAGCGAAGCAACTGCTG		

Mak	CCGCTCATTGCGCCAGCGAAACAAGCAACTGCTG		

Che	CCGCTCATTGCGCCAGCGAAACAGCTGCTG		
	610	620	630

Figura 3. Comparação das seqüências de nucleotídeos de VP1 do subtipo C₃Indaial-clone 24, Makoff et alii (1982) e Cheung et alii (1983).

		1 0		2 0		3 0																									
C3I	T	T	T	T	G	E	S	A	D	P	V	T	T	T	V	E	N	Y	G	G	E	T	Q	T	Q	R	R	H	H	T	
Mak	I
Che
		4 0		5 0		6 0																									
C3I	D	V	A	F	V	L	D	R	F	V	K	V	H	V	S	G	N	Q	H	T	L	D	V	M	Q	A	H	K	D	S	
Mak	V
Che	Q	V
		7 0		8 0		9 0																									
C3I	I	V	G	A	L	L	R	A	A	T	Y	Y	F	S	D	L	E	I	A	V	T	H	T	G	K	L	T	W	V	P	
Mak	Q
Che
		1 0 0		1 1 0		1 2 0																									
C3I	N	G	A	P	V	S	A	L	D	N	T	T	N	P	T	A	Y	H	K	G	P	L	T	R	L	A	L	P	Y	T	
Mak	A
Che	A
		1 3 0		1 4 0		1 5 0																									
C3I	A	P	H	R	V	L	A	T	T	Y	T	G	T	T	V	Y	T	T	S	A	R	R	G	D	L	A	H	L	A	A	
Mak	A	.	.	A
Che	A	.	.	A	G	V
		1 6 0		1 7 0		1 8 0																									
C3I	A	H	A	R	H	L	P	T	S	F	N	F	G	A	V	K	A	E	T	I	T	E	L	L	V	R	M	K	R	A	
Mak
Che
		1 9 0		2 0 0		2 1 0																									
C3I	E	L	Y	C	P	R	P	V	L	P	V	Q	P	A	G	D	R	H	K	Q	P	L	I	A	P	A	K	Q	L	L	
Mak
Che

Figura 4. Comparação das seqüências de aminoácidos de VP1 do subtipo C₃Indaial clone 24, Makoff et alii (1982) e Cheung et alii (1983).

4. RESUMO

Um clone de cDNA do vírus da febre aftosa, subtipo C₃Indaial, que abrange os genes VP1 e parte de VP3, foi clonado e seqüenciado. As seqüências nucleotídicas e de aminoácidos foram comparadas com as seqüências publicadas, e as regiões variáveis identificadas. VP1, que é a proteína mais externa e imunodominante, apresentou uma mudança de aminoácidos em relação a seqüência de VP1 do mesmo subtipo, caracterizada por Makoff et alii (1982) na região do determinante antigênico principal 138-156. Quando comparada com a seqüência do mesmo subtipo, descrita por Cheung et alii (1983), VP1 apresentou duas variações de aminoácidos nesta região. Os resultados mostram a heterogeneidade do vírus da febre aftosa mesmo entre isolados serologicamente próximos.

5. BIBLOGRAFIA

- ABARACÓN, D. & OLASCOAGA, R.C. Vacinas contra a febre aftosa. *A hora veterinária*, 3: 45-52 (1984).
- ACHARYA, R.; FRY, E.; STUART, D.; FOX, G.; ROWLANDS, D.; BROWN, F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337:709-716 (1989).
- AMADORI, M.; DAREI, S.; MELEGARI, M.; PANINA, G.F. Safety and efficacy of foot-and-mouth disease vaccines containing endonuclease-inactivated virions. *Vaccine*, 5:219-222. (1987).
- ARGOS, P.; KAMER, G.; NICKLIN, M.J.H.; WIMMER, E. Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Research*, 12:7251-7267 (1984).
- ARNOLD, E.; LUO, M.; VRIEND, G.; ROSSMANN, M.G.; PALMENBERG, A.C.; PARKS, G.D.; NICKLIN, M.J.H.; WIMMER, E. Implication of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:21-25 (1987)
- ASTUDILLO, V. Formas de organização da produção como determinantes de risco de febre aftosa. *A Hora Veterinária*, 3: 11-20 (1984).
- BACHRACH, H.L.; MOORE, D.M.; MCKERCHER, P.D.; PALATNICK, J. Immune and antibody response to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *The Journal of Immunology*, 115(6): 1636-1641 (1975).
- BARTELLING, S.J.; MELOEN, R.H.; WAGENAAR, F.; GIELENS, A.L.J.

- Isolation and characterization of trypsin-resistant O1 variants of foot-and-mouth disease virus (1979). **Journal of General Virology**, 43:383-393 (1979).
- BAXT, B. & BACHARACH, H.L. The adsorption and degradation of foot-and-mouth disease virus by isolated BHK-21 cell plasma membranes. **Virology**, 116:391-405 (1982).
- BAXT, B.; MORGAN, D.O.; ROBERTSON, B.H.; TIMPONE, C.A. Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid VP1 involved in neutralization and cell attachment. **Journal of Virology**, 52(2): 298-305 (1984).
- BAXT, B.; VAKHARIA, V.; MOORE, D.M.; FRANKE, A.J.; MORGAN, D.O. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. **Journal of Virology**, 63: 2143-2151 (1989).
- BECK, E.; FORSS, S.; STREBEL, K.; CATTANEO, R.; FEIL, G. Structure of the foot-and-mouth disease initiation site and the structural proteins. **Nucleic Acids Research**, 11:7873-7885 (1983).
- BECK, E. & STROHMAIER, K. Subtyping of european foot-and-mouth disease strains by nucleotide sequence determination. **Journal of Virology**, 61:1621-1629 (1987).
- BENTON, W.D. & DAVIS, R.W. Screening of λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques "in situ". **Science**, 198: 180-183 (1977).
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, 7:1513-1523 (1979).

BITTLE, J.L.; HOUGHTEN, R.A.; ALEXANDER, H.; SHINNICK, T.M.; SUTCLIFFE, J.G.; LERNER, R.A.; ROWLANDS, D.J.; BROWN, F. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298:30-33 (1982).

BLATTNER, F.R.; WILLIAMS, B.G.; BLEGHL, A.E.; DENNISTON-THOMPSON, K.; FABER, H.E.; FURLANG, L.A.; GRUNWALD, D.J.; KIEFER, D.O.; MOORE, D.D.; SCHUMM, J.W.; SHELDON, E.L.; SMITHIES, O. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science*, 169: 161-169 (1977).

BOLWELL, C.; BROWN, A.L.; BARNETT, P.V.; CAMPBELL, R.O.; CLARKE, B.E.; PARRY, N.R.; OULDRIDGE, E.J.; BROWN, F.; ROWLANDS, D.J. Host selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 70: 45-57 (1989).

BOOTHROYD, J.C.; HARRIS, T.J.R.; ROWLANDS, D.J.; LOWE, P.A. The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 17:153-161 (1982).

BROEKHUIJSEN, M.P.; BOLM, T.; VAN RIJN, J.; POWELS, P.H.; KLASSEN, E.A.; FASBENDER, M.J.; ENGER-VALK, B.E. Synthesis of fusion proteins with multiple copies of an antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 49: 189-197 (1986).

BROEKHUIJSEN, M.P.; VAN RIJN, J.; BLOM, A.J.M.; POWELS, P.H.; ENGER-VALK, B.E.; BROWN, F.; FRANCIS, M.J. Fusion proteins with multiple copies of major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *Journal of General Virology*, 68: 3137-3143 (1987).

BROWN, F. Peptides as the next generation of foot-and-mouth

- disease vaccines. *Bio-Technology*, 3: 445-448 (1985a).
- BROWN, F. Use of peptides for immunization against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 6:180-182 (1988).
- BROWN, F. Antigenic structure of foot-and-mouth disease virus. In: *Immunochemistry of virus. The basis for serodiagnosis and vaccines*. Eds. MHV van Reghimortk and A.R. Neuath. V. (1985b).
- BURROWS, R. Excretion of foot-and-mouth disease virus prior to the development of lesions. *The Veterinary Record*, 82: 387-388 (1968).
- CARROLL, A.L.; ROWLANDS, D.J.; CLARKE, B.E. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 12: 2461-2472 (1984).
- CARTER, P.; BEDOUELLE, H.; WIMMER, G. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Research*, 13: 4431-4443 (1985).
- CARTWRIGHT, B.; MORREL, D.J.; BROWN, F. Nature of the antibody response to the foot-and-mouth disease virus particles, its 12S protein subunit and the isolates immunizing polypeptide VP1. *Journal of General Virology*, 63: 375-381 (1982).
- CHEUNG, A.; DE LAMARTEE, J.; WEISS, S.; KÜPPER, H. Comparison of the major antigenic determinants of different serotype of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 48:451-459 (1983).
- CLARKE, B.E. & SANGAR, V. Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *Journal of General*

- Virology**, 69(9): 2313-2326 (1988).
- CLEWELL, D.B. & HELINSKI, D.R. Supercoiled circular DNA - protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, 62: 1159-1166 (1969).
- COTTRAL, G.E. Persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, their products and environment. **Bull. off Int. Epiz.**, 71: 549-568 (1969).
- DAVIS, W.R.D.; LEWIS, G.B.; RANDALL, H.A. Some distributional features of the foot-and-mouth epidemic. **Nature**, 219: 121-125 (1968).
- DE FARIA, J.F. Plano de controle e erradicação da febre aftosa. **A Hora Veterinária**, 3: 23-35 (1984).
- DE MELLO, P.A. & LA TORRE, J. Características gerais, componentes macromoleculares e estrutura do vírus da febre aftosa. **A Hora Veterinária**, 3: 36-41 (1984).
- DELLA-PORTA, A.J. Current status of foot-and-mouth disease vaccines including the use of genetic engineering. **Australian Veterinary Journal**, 60: 129-135 (1983).
- DENOYA, C.D.; SCODELLER, E.A.; GIMENEZ, B.H.; VASQUEZ, C.; LA TORRE, J.L. Foot-and-mouth disease virus I. Stability of its ribonucleic acid. **Virology**, 84: 230-235 (1978).
- DIMARCHI, R.; BROOKE, G.; GALE, C.; CRACKNELL, V.; DOEL, T.; MOWAT, N. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. **Science**, 232: 639-641 (1986).

- DIMMOCK, N. Multiple mechanisms of neutralization of animal viruses. *TIBS*, 12: 70-75 (1987).
- DOEL, T.R. Prospects for improved foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 3:35-36 (1985).
- DOMINGO, E.; DÁVILA, M.; ORTIN, J. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 11: 333-346 (1980).
- DUDRA, M.S.; LA TORRE, J.L.; SCODELLER, C.; DENOYA, C.; VASQUEZ, C. Cores in foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 116: 349-353 (1982).
- DUKE, G.M.; OSÓRIO, J.E.; PALMEMBERG, A.C. Attenuation of mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly (C) tract. *Nature*, 343: 474-475 (1990).
- FORSS, S.; STREBEL, K.; BECK, E.; SCHALLER, H. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 12: 6587-6601 (1984).
- GRAVES, J.H.; MCVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.; TRAUTMAN, R. Contact transmission of foot-and-mouth disease from infected to susceptible cattle. *The Journal of Infection Disease*, 127: 386-391 (1971).
- GREVE, J.M.; DAVIS, G.; MEYER, A.M.; FORTE, C.P.; YOST, S.C.; MARLOR, C.W.; KAMARCK, M.E.; McCLELLAND, A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56:839-847 (1989).
- HARRISON, S.C. Finding the receptors. *Nature*, 338:205-206 (1989).
- JACKSON, R.J. A detailed kinetic analysis of the "in vitro"

- synthesis and processing of encephalomyocarditis virus products. *Virology*, 149: 114-127 (1986).
- KITAMURA, W.; ADLER, C.; WIMMER, E. Structure and expression of the picornavirus genome. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 354: 183-201 (1980).
- KLEID, D.G. Using genetically engineered bacteria for vaccine production. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 413: 23-30 (1983).
- KURZ, C.; FORSS, S.; KUPPER, H.; STROHMAIER, K.; SCHALLER, H. Nuclotide sequence and corresponding amino acid sequence for the major antigen of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 9: 1919-1931 (1981).
- LA TORRE, J. & DE MELLO, P.A. Técnicas bioquímicas de diagnóstico viral e aplicações de biotecnologia em febre aftosa. *A Hora Veterinária*, 3: 61-68 (1984).
- LAPORTE, J.; GROSCLAUDE, J.; WANTYGHM, J.; BERNARD, S.; ROUZE, P. Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus da la fievre aphteuse par des serum provenant de porcs immunisés a l'aide d'une proteine virale purifiée. *C. R. Hebd. Sean. Acad. Sci.*, 276: 3399-3401 (1973).
- LERNER, R.A. Synthetic vaccines. *Scientific America*, 248: 66-74 (1983).
- MAKOFF, A.J.; PAYNTER, C.A.; ROWLANDS, D.J.; BOOTHROYD, J.C. Comparison of the amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 10: 8285-8295 (1982).
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a*

laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 545p. (1982).

MARTINEZ, M.A.; CARRILLO, C.; PLANA, J.; MASCARELLA, R.; BERGADA, J.; PALMA, E.L.; DOMINGO, E.; SOBRINO, F. Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 62(1): 75-84 (1988).

MARTINIÓ, R.G. Febre Aftosa: a enfermidade e suas implicações. *A Hora Veterinária*, 3: 5-8 (1984).

MATEU, M.G.; ROCHA, E.; VICENTE, O.; VAYREDA, F.; NAVALPOTRO, C.; ANDREU, D.; PEDROSO, E.; GIRALT, E.; ENJUANES, L.; DOMINGO, E. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research*, 8(3): 261-274 (1987).

MENDELSON, C.L.; WIMMER, E.; RACANIELLO, V.R. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily (1989).

MESSING, J. & VIEIRA, J. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, vol. 9, 309p. (1981).

MORRELL, D.J.; MELLOR, E.J.C.; ROWLANDS, D.J.; BROWN, F. Surface structure and RNA-protein interactions of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 68: 1649-1658 (1987).

MORRISON, D.A. Translation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *Journal of Bacteriology*, 132: 349-351 (1977).

ÑICKLIN, M.J.H.; TOYODA, H.; MURRAY, M.G.; WIMMER, E. Proteolytic

- processing in the replication of polio and related virus. **Bio/Technology**, 4: 33-42 (1986).
- NORRANDER, J.; KEMPE, T.; MESSING, J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis. **Gene**, 26: 101-106 (1983).
- PFAFF, E.; MUSSGAY, M.; BOHM, H.O.; SCHULZ, G.E.; SCHALLER, H. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. **The EMBO Journal**, 1: 869-874 (1982).
- PFAFF, E.; THIEL, H.J.; BECK, E.; STROHMAIER, K.; SCHALLER, H. Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. **Journal of Virology**, 62(6): 2033-2940 (1988).
- ROSEMBERG, F.J. El conocimiento de la epidemiologia de la fiebre aftosa con particular referencia a sudamerica. **Bol. Centro Panamericano Fiebre Aftosa**, 50p. (1975).
- ROSSMANN, M.G.; ARNOLD, E.; ERICKSON, J.M.; FRANKENBERGER, E.A.; GRIFFITH, J.P.; HECHT, H.J.; JOHNSON, J.E.; KAMER, G.; LUO, M.; MOSSER, A.G.; RUECKERT, R.R.; SHERRY, B.; VRIEND, G. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. **Nature**, 317: 145-153 (1985).
- ROWLANDS, D.J. Novel approaches to foot-and-mouth disease vaccination. **Vaccine**, 3: 37-39 (1985).
- ROWLANDS, D.J.; CLARKE, B.E.; CARROL, A.R.; BROWN, F.; NICHOLSON, B.H.; BITTLE, J.L.; HOUGHTEN, R.A.; LERNER, R.A. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. **Nature**, 306: 694-696 (1983).

- ROWLANDS, D.J.; SANGAR, D.V.; BROWN, F. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 26: 227-238 (1975).
- SAMBROOK, J.; FRITISCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
- SANGAR, D.V. The replication of picornaviruses. *Journal of General Virology*, 45: 1-13 (1979).
- SANGER, F.; NICKEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467 (1977).
- SCHRANK, A.; FARIAS, S.; CHIES, J.M.; ISERHARDT, S.V.; BECK, E.; ZAHA, A. Cloning and expression on *Escherichia coli* of cDNA sequence encoding foot-and-mouth disease virus VP1. *Mem. Inst. Butantan*, 50(supl.), p. 31-33 (1988).
- SELLERS, R.F.; HERNIMAN, K.A.J.; DONALDSON, A.I. The effects of killing or removal of animals affected with foot-and-mouth disease on the amounts of airborne virus present in looseboxes. *Br. Vet. Journal*, 127: 358-365 (1971).
- SOBRINO, F.; PALMA, E.L.; BECK, E.; DAVILA, M.; DE LA TORRE, J.C.; NEGRO, P.; VILLANUEVA, N.; ORTIN, J.; DOMINGO, E. Fixation of mutation in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease : heterogeneity and rate variations. *Gene*, 50: 149-159 (1986).
- SOUTHERN, E.M. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in Enzimology*, 68:152:176 (1979).

STEINHAUER, D.A. & HOLLAND, J.J. Direct method for quantification of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *Journal of Virology*, 57: 219-228 (1986).

STREBEL, K.; BECK, E. STROHMAIER, K.; SCHALLER, H. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *Journal of Virology*, 57: 983-991 (1986).

STREBEL, K. & DECK, E. A second protease of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 58:893-899 (1986).

STROHMAIER, K.; FRANZE, R.; ADAM, K.H. Localization and characterization of the antigenic portion of the foot-and-mouth disease virus immunizing protein. *Journal of General Virology*, 59: 295-306 (1982).

TAUTZ, D. & RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 132: 14-19 (1983).

THOMAS, A.A.M.; WOORTMEIJER, R.J.; PUIJK, W.; BARTELING, S.J. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *Journal of Virology*, 62: 2782-2789 (1988).

THOMAS, M. & DAVIS, R.W. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *EcoRI* restriction endonuclease. *Journal of Molecular Biology*, 91: 315-328 (1975).

TOYODA, H.; NICKLIN, M.J.H.; MURRAY, M.G.; ANDERSON, C.W.; DUNN, J.J.; STUDIER, F.W.; WIMMER, E. A second virus-encoded proteinase involved on proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45: 761-770 (1986).

VAKHARIA, V.N.; DEVANEY, M.A.; MOORE, D.M.; DUNN, J.J.; GRUBMAN, M.J. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *Journal of Virology*, 61: 3199-3207 (1987).

VASQUEZ, C.; DENOYA, C.D.; LA TORRE, J.L.; PALMA, E.L. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*, 97: 195-200 (1979).

WILD, T.F.; BURROUGHS, J.N.; BROWN, F. Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 4: 313-320 (1969).

XIE, Q-C.; McCAHON, D.; CROWTHER, J.R.; BELSHAM, G.J.; McCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *Journal of General Virology*, 68: 1637-1647 (1987).

YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. of Nat. Acad. of Sci.*, 80: 1194-1198 (1983).

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; CHIES, J.M.; FERREIRA, H.B.; ALEXANDRE, C.; NARDI, N.; SANTOS, D.S. Molecular cloning and expression of the major antigen of the foot-and-mouth disease virus C₃Indaial. *I Seminário Cubano sobre Biotecnologia, Havana, Cuba* (1986).

ERRATA

Na página 37, até o segundo parágrafo os experimentos foram realizados somente por Rochele Raupp, dados estes que farão parte de sua dissertação de mestrado.

A partir do terceiro parágrafo até o seqüenciamento parcial dos clones de C3Indaial, os experimentos foram realizados juntamente com Rochele Raupp.