

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CONSTRUÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CLONE  
INFECCIOSO DE UMA AMOSTRA BRASILEIRA DO  
VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Sandra Arenhart**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**CONSTRUÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CLONE INFECCIOSO  
DE UMA AMOSTRA BRASILEIRA DO VÍRUS DA DIARREIA  
VIRAL BOVINA**

**Sandra Arenhart**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária  
Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Arenhart, Sandra  
Construção e manipulação de clone infeccioso de uma  
amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina /  
Sandra Arenhart.-2012.  
118 p.; 30cm

Orientador: Eduardo Furtado Flores  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2012

1. BVDV 2. genética reversa 3. clone infeccioso 4.  
gene repórter 5. recombinação homóloga em levedura I.  
Furtado Flores, Eduardo II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**CONSTRUÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CLONE INFECCIOSO DE UMA  
AMOSTRA BRASILEIRA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

Elaborada por  
**Sandra Arenhart**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Eduardo Furtado Flores, PhD.**  
(Presidente/Orientador)

**Laura Helena Vega Gonzales Gil, PhD.** (Fiocruz)

**Rudi Weiblen, PhD.** (UFSM)

**Luiz Carlos Kreutz, PhD.** (UPF)

**Fernando R. Spilki, Dr.** (Feevale)

Santa Maria, 29 de março de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Eduardo Furtado Flores, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança e pela paciência, demonstradas durante todos esses anos de convívio, em especial durante a execução desse trabalho.

Ao professor Rudi Weiblen, pela orientação, ensinamentos e exemplo profissional, também dedicados durante todos esses anos de convívio.

À pesquisadora Laura H.V.G. Gil pela oportunidade proporcionada, por tornar possível a realização deste estudo, pela confiança e ensinamentos em genética reversa.

Ao professor Giovani R. Bertani, pela confiança e por permitir a realização de parte de minha docência orientada.

À professora Luciane Lovato, pelos ensinamentos, pelo carinho demonstrado e pela amizade.

Aos meus pais Guido G. Arenhart e Norma Z. Arenhart, que mesmo estando longe sempre apoiaram as minhas decisões e tornaram minha formação possível.

À minha irmã Márcia Arenhart, pela paciência, por me ouvir e me apoiar nos momentos decisivos da minha vida e por estar sempre ao meu lado.

Ao Erik Amazonas, meu *housekeeping gene - home, home again I like to be here when I can...* Pelas nossas incansáveis discussões, pela paciência e companheirismo dedicados.

A todos os colegas do Setor de Virologia, pela convivência, pela amizade e pelos ensinamentos, nesses dez anos de colaboração e parceria.

Aos colegas do LaViTE – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), pelos ensinamentos, pela paciência e pelo espírito olímpico, sempre!

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela formação acadêmica e científica.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização de mais uma grande etapa na minha formação.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### CONSTRUÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CLONE INFECCIOSO DE UMA AMOSTRA BRASILEIRA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

AUTORA: SANDRA ARENHART  
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES  
Santa Maria, 29 de março de 2012.

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um patógeno de bovinos distribuído mundialmente, associado com importantes perdas econômicas. As maiores perdas devem-se aos problemas reprodutivos causados pela infecção, e pela capacidade do vírus de causar persistência após infecção fetal no terço inicial da gestação. Para entender melhor a biologia desse vírus, sistemas de genética reversa foram desenvolvidos e tem permitido a elucidação de vários aspectos da replicação viral, interação vírus – hospedeiro, resposta imune e patogenia da infecção fetal. O presente estudo relata a construção, caracterização e manipulação de um clone infeccioso, a partir da cepa brasileira não-citopática IBSP4-ncp. O clone de DNA recombinante foi construído pela técnica de recombinação homóloga em levedura, utilizando um vetor de baixo número de cópias, construído a partir de três fragmentos genômicos, que compreendiam a fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) do vírus. As duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR) foram substituídas pelas respectivas UTRs da cepa de referência NADL. O vetor construído foi transcrito *in vitro* e o RNA obtido foi transfectado em células MDBK para recuperação de vírus infecciosos. Os vírus recuperados (CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e #3) foram mantidos por 10 passagens em cultivo celular e caracterizados *in vitro*, apresentando dinâmica de replicação, tamanho e morfologia de focos similares ao vírus parental IBSP-4. A análise do genoma por sequenciamento revelou cinco mutações pontuais no gene N<sup>pro</sup>, com trocas de aminoácidos, provavelmente refletindo uma adaptação do vírus às UTRs heterólogas. O clone infeccioso construído CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2, foi então utilizado para a construção de um vírus recombinante expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase (Gluc). O gene repórter foi inserido entre os genes N<sup>pro</sup> e Core do vírus. Para o processamento da proteína repórter, uma sequência ligante foi adicionada anteriormente ao gene, e a sequência da protease do vírus da Febre Aftosa (FMDV2A<sup>pro</sup>) foi inserida após o gene. O vetor recombinante construído foi transcrito *in vitro* e o RNA obtido foi transfectado em células MDBK. Vírus recombinantes infecciosos foram

recuperados (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e #4) e caracterizados *in vitro*, apresentando dinâmica de replicação, tamanho e morfologia de focos similares ao vírus obtido do clone infeccioso. O gene repórter Gluc foi corretamente expresso e processado pelo vírus recombinante durante 15 passagens em cultivo celular. Com os resultados obtidos nestes estudos, conclui-se que o clone infeccioso construído pode ser facilmente manipulado e é capaz de carrear em seu genoma, e expressar de forma estável, genes heterólogos com até 555 pares de base, que parecem não interferir com sua capacidade replicativa. Dessa forma, o clone obtido pode ser muito útil para manipulação genética visando estudar diferentes aspectos da biologia do BVDV e de suas interações com o hospedeiro, assim como para a produção de cepas vacinais com fenótipo atenuado e/ou com marcadores antigênicos.

**Palavras-chave:** BVDV, genética reversa, clone infeccioso, gene repórter, recombinação homóloga em levedura.

## ABSTRACT

Doctorate's Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### CONSTRUCTION AND MANIPULATION OF INFECTIOUS CLONE FROM A BRAZILIAN BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS ISOLATE

AUTHOR: SANDRA ARENHART  
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES  
Santa Maria, March , 29<sup>th</sup>, 2012.

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a worldwide pathogen associated with important losses to livestock production. Most of these losses come from reproductive disorders and from the ability of the virus to produce persistent infections following *in utero* infection of the fetus. A number of reverse genetics methodologies have been used for BVDV in order to better understand the biology of the virus, which allowed the elucidation of a number of biological features including virus replication, host-virus interaction, immune response, and the pathogenesis of fetal infection. The present study describes the construction, characterization and manipulation of an infectious clone out of a non-cytopathic Brazilian BVDV strain IBSP4-ncp. The cDNA recombinant clone was constructed by yeast homologous recombination with a low-copy vector, from three genomic fragments comprising the open reading frame (ORF). The two untranslated regions (5' and 3' UTR) were replaced by the respective UTRs of the reference strain NADL. The constructed vector was transcribed *in vitro* and the resulting RNA was transfected on MDBK cells to rescue infectious virus. The rescued viruses (IC-pBSC\_IBSP4-ncp#2 and #3) were maintained for ten passages in tissue culture and characterized *in vitro*, showing replication dynamics, focus size and morphology similar to those of the parental IBSP-4. Genomic analysis revealed five point mutations in the gene coding for N<sup>pro</sup> protein, resulting in amino acid changes. These mutations probably reflect an adaptation of the virus to the heterologous UTRs. The infectious clone IC-pBSC\_IBSP4-ncp#2 was further used for the construction of a recombinant virus expressing the *Gaussia* luciferase (Gluc) reporter gene. The reporter gene was inserted between the N<sup>pro</sup> and Core genes, being flanked by an upstream linker and a downstream sequence of the Foot and Mouth Disease virus protease (FMDV2A<sup>pro</sup>) for accurate protein processing. The recombinant vector was *in vitro* transcribed and the RNA was transfected on MDBK cells. Recombinant infectious viruses were rescued (IC-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 and



#4) and characterized *in vitro*, showing replication dynamics, focus size and morphology similar to those of the parental IBSP-4 clone. The Gluc reporter gene was accurately expressed and processed by the recombinant virus during 15 passages in tissue culture. These studies revealed that the infectious clone constructed herein can be easily manipulated and is able to carry in its genome heterologous genes up to 555 base pairs in length in a stable fashion and without interference with its replication efficiency. Thus, the constructed clone may be very useful for genetic manipulation towards studying different aspects of the BVDV biology and its interactions with the host, and for the development of vaccine strains with attenuated phenotype and/or with antigenic markers.

**Key words:** BVDV, reverse genetics, infectious clone, reporter gene, yeast homologous recombination.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Representação esquemática da estratégia de construção do clone de cDNA do vírus IBSP4-ncp.....	64
FIGURA 2 – Confirmação da recombinação dos clones infecciosos por sequenciamento.....	65
FIGURA 3 – Avaliação da infectividade viral dos vírus recuperados dos clones infecciosos por imunofluorescência indireta (IFI).....	66
FIGURA 4 – Curva de replicação dos vírus recuperados dos clones CI-pBSC_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC_IBSP4-ncp#3 e do vírus parental IBSP4-ncp.....	67
FIGURA 5 – Morfologia de focos dos vírus recuperados dos clones CI-pBSC_IBSP4-ncp#2 e CI- pBSC_IBSP4-ncp#3 comparadas ao vírus parental IBSP4-ncp.....	68

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Representação esquemática da estratégia de construção do vírus recombinante IBSP4-ncp expressando o gene repórter <i>Gaussia</i> luciferase....	96
FIGURA 2 – Avaliação da estabilidade dos vírus recombinantes CI-pBSC_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC_IBSP4-ncpGluc#4 em diferentes passagens.....	97
FIGURA 3 – Avaliação da infectividade viral dos vírus recombinantes por imunofluorescência indireta (IFI).....	98
FIGURA 4 – Atividade do gene repórter <i>Gaussia</i> luciferase.....	99
FIGURA 5 – Curva de replicação e de atividade do gene repórter <i>Gaussia</i> luciferase dos vírus construídos.....	100
FIGURA 6 – Morfologia de focos dos vírus recombinantes construídos.....	101
FIGURA 7 – Estabilidade dos vírus recombinantes recuperados a partir do DNA plasmideal extraído de <i>E.coli</i> .....	102

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 – Possíveis consequências da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), dependendo da rota de transmissão, estado imune e gestacional do hospedeiro.....	28
---	----

### CAPÍTULO 1

QUADRO 1 - Oligonucleotídeos utilizados na construção do clone de cDNA da cepa IBSP4-ncp.....	61
QUADRO 2 - Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos vírus e plasmídeos.....	62
QUADRO 3 - Análise das sequências do clone infeccioso construído e do vírus parental.....	63

### CAPÍTULO 2

QUADRO 1 - Oligonucleotídeos utilizados na construção do vírus recombinante IBSP-4ncp expressando o gene repórter <i>Gaussia</i> luciferase.....	94
QUADRO 2 - Análise das sequências do vírus recombinante expressando o gene repórter <i>Gaussia</i> luciferase comparada com o vírus parental IBSP4-ncp.....	95

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 O vírus da diarreia viral bovina.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Genótipos, biotipos e diversidade antigênica.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Organização do genoma.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Penetração e replicação viral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Resposta imune, evasão e imunossupressão.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Indução de apoptose.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7 Patogenia e apresentações da doença.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Controle e erradicação.....</b>	<b>30</b>
<b>2.9 Genética reversa para pestivírus.....</b>	<b>31</b>
<b>3. CAPÍTULO 1. Construção de um clone de cDNA recombinante do vírus da diarreia viral bovina por recombinação homóloga em levedura.....</b>	<b>38</b>
Abstract.....	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	53
Referências.....	57
<b>4. CAPÍTULO 2. Inserção e expressão estável do gene da <i>Gaussia</i> luciferase no genoma do vírus da diarreia viral bovina.....</b>	<b>70</b>
Abstract.....	71
Resumo.....	72
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	76
Resultados e Discussão.....	85
Referências.....	90
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um patógeno de bovinos de grande importância econômica, causando muitas perdas, principalmente reprodutivas (BAKER, 1995; HOUE et al., 2006). O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*. Dentro deste gênero também são classificados outras duas espécies virais de importância veterinária: o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (LINDENBACH & RICE, 2001; RIDPATH, 2005).

Os pestivírus são vírus envelopados, esféricos, variam entre 40 a 60 nm de diâmetro e possuem genoma RNA fita simples de polaridade positiva. O genoma do vírus é de aproximadamente 12.3 Kb, possui uma região 5'UTR (região não traduzida), uma única fase aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos e uma região 3'UTR (DONIS, 1995; RIDPATH, 2005). A poliproteína viral é traduzida via IRES (*internal ribosome entry site*) e é clivada durante e após a tradução, gerando 11 ou 12 proteínas maduras funcionais na seguinte ordem: NH<sub>2</sub>-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ms</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (RIDPATH, 2005).

O BVDV pode ser classificado em dois genótipos: 1 e 2 (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH, 2003). Os genótipos também podem ser divididos em dois biotipos: citopático (cp) e não citopático (ncp), de acordo com o efeito da replicação em cultivo celular. O biotipo cp é gerado a partir do ncp através de mutações e/ou recombinações na proteína não estrutural NS2-3, que passa a ser clivada em NS2 e NS3 no biotipo cp (TAUTZ et al., 1994; KÜMMERER & MEYERS, 2000; RIDPATH, 2005). Isolados ncp representam a grande maioria dos vírus na natureza e são os responsáveis pelas infecções agudas e persistentes, e consequentemente pelas perdas econômicas. Isolados cp são encontrados em animais acometidos pela doença das mucosas (DM) juntamente com o vírus ncp que o gerou, sendo chamados de vírus pares (BOLIN & GROOMS, 2004).

As consequências da infecção variam desde infecções subclínicas (maioria das infecções), doença respiratória, digestiva, reprodutiva, a doença das mucosas, a síndrome hemorrágica (SA), além de condições associadas com os efeitos imunossupressivos da infecção (BAKER, 1995; BOLIN & GROOMS, 2004). Fêmeas prenhes infectadas podem apresentar uma série de falhas reprodutivas entre elas, o nascimento de bezerras imunotolerantes e persistentemente infectados (PI), quando infectadas com o vírus ncp

(McCLURKIN et al., 1984; GROOMS et al., 2006). Os animais PI replicam e excretam o vírus durante toda a vida, sendo responsáveis pela manutenção do vírus nos rebanhos (BOLIN, 1995; HOUE, 1995). O controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e eliminação dos animais PI, associados ou não com o uso de vacinas (BOLIN, 1995). Além de prevenir a doença clínica, a vacinação visa prevenir a infecção fetal, principalmente no primeiro terço da gestação, evitando a produção de bezerros PI (BOLIN, 1995; LAUREYNS et al., 2010). Dois tipos principais de vacinas contra o BVDV são disponíveis no mercado: vacinas inativadas e vacinas atenuadas (KELLING, 2004; FLORES et al., 2005).

A tecnologia de síntese de RNA *in vitro* a partir do cDNA do genoma viral clonado em um vetor plasmideal (clone infeccioso) tem sido responsável por notáveis avanços na virologia dos pestivírus, contribuindo para o conhecimento de aspectos genéticos, moleculares e imunológicos (AGAPOV et al., 2004; LACKNER et al., 2004; GIL et al., 2006ab; HILTON et al., 2006). Dentro do gênero *Pestivirus*, vários clones infecciosos foram construídos para CSFV, BVDV-1 e 2 e BDV (MEYERS et al., 1996; MOORMAN et al., 1996; DEHAN et al., 2005; RASMUSSEN et al., 2008), gerando novas informações a respeito da biologia viral e consequente aplicação deste conhecimento para construção de vacinas, diagnóstico e controle da infecção (MEYERS et al., 2007; HENNINGSON et al., 2009; MISCHKALE et al., 2010).

Diversas estratégias de construção de clones de cDNA para pestivírus tem sido descritas ao longo das duas últimas décadas e todas elas utilizam técnicas clássicas de clonagem. Mais recentemente, foram descritas técnicas mais modernas, com menos manipulação do material genético viral (RASMUSSEN et al., 2008; 2010). Porém, a instabilidade desses sistemas em *E. coli* ainda é um problema constante (MEYERS et al., 1996; DEHAN et al., 2005; RASMUSSEN et al., 2010). O uso de diferentes cepas de *E. coli* e de diferentes vetores tem em muitos casos resultado em estabilidade nas construções dos clones de cDNA (VASSILEV et al., 1997; FAN & BIRD, 2008b; MISCHKALE et al., 2010). Um outro sistema de técnicas moleculares, utilizado também para a construção de clones infecciosos, tem conseguido resolver problemas de instabilidade para alguns vírus da Dengue (DENV) (POLO et al., 1997; PURI et al., 2000). Essa técnica utiliza o sistema de eucariotos (*Sacharomyces cerevisiae*), em que a própria maquinaria da célula com seu sistema de reparo de DNA, realiza as recombinações para a montagem da estratégia de construção desejada. Como eucariotos possuem sistemas de correção de erros no DNA, a ocorrência de mutações é praticamente inexistente (OLDENBURG et al., 1997; GIBSON, 2009). No presente estudo, um clone de cDNA da cepa brasileira de BVDV IBSP4-ncp foi construído e manipulado pela inserção de um gene repórter, utilizando o sistema de recombinação homóloga em levedura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O vírus da diarreia viral bovina

O vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea virus*, BVDV) é um patógeno de grande importância na espécie bovina, distribuído mundialmente (BAKER, 1995; HOUE et al., 2006). Além de bovinos, suínos e outros ruminantes domésticos e silvestres também podem servir de hospedeiros para o vírus. O BVDV está classificado na família *Flaviviridae*, que abriga os gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. O BVDV pertence ao gênero *Pestivirus*, que contém somente espécies de importância veterinária: o vírus da peste suína clássica (CSFV) que infecta suínos domésticos e silvestres e o vírus da doença da fronteira (BDV) que infecta ovinos, caprinos e cervídeos (LINDENBACH & RICE, 2001; RIDPATH, 2005). Três critérios são utilizados para classificar os pestivírus: hospedeiro de origem, características antigênicas e reatividade sorológica cruzada e homologias das sequências genômicas, sendo o último critério, o mais seguro para diferenciar as espécies (RIDPATH, 2005). Os pestivírus possuem características únicas dentro da família *Flaviviridae*: os genes das proteínas N<sup>pro</sup>, uma autoprotease e a E<sup>ns</sup>, uma glicoproteína com atividade de ribonuclease (RIDPATH, 2003, 2005).

Os vírions do BVDV apresentam um genoma RNA de fita simples, polaridade positiva e um nucleocapsídeo icosaédrico. Os pestivírus possuem vírions esféricos, que variam entre 40 a 60 nm de diâmetro e um envelope bilipídico (HORZINEK et al., 1971). Três glicoproteínas virais (E0, E1 e E2) estão presentes no envelope, e a presença do envelope torna esses vírus sensíveis a solventes orgânicos e detergentes. O vírion também apresenta resistência à inativação por pH baixo (HAFEZ & LIESS, 1972).

A doença conhecida como diarreia viral bovina (BVD) foi descrita pela primeira vez em 1946, como uma doença infecciosa e aguda de bovinos. Os animais apresentavam hipertermia, anorexia, gastroenterite severa, ulcerações nas mucosas oral e nasal, salivação intensa e descarga nasal. Apesar da mortalidade baixa e de alguns animais não apresentarem sinais clínicos, as fêmeas prenhes, especialmente as novilhas, abortavam (OLAFSON et al., 1946). Desde então a infecção pelo BVDV tem sido associada com uma ampla variedade de manifestações clínicas. Dentre as principais consequências da infecção estão enfermidades

gastrentérica, doença respiratória, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, doença reprodutiva, e imunossupressão, além da geração de animais persistentemente infectados (PI). Entretanto, a maioria das infecções em animais imunocompetentes cursa de forma subclínica (POTGIETER, 2004; RIDPATH, 2005). No Brasil, em 1974 foi descrito o primeiro isolamento do BVDV (VIDOR, 1974). Estudos posteriores confirmaram a presença do agente na população bovina brasileira, e as amostras do vírus isoladas compreendem principalmente vírus isolados de fetos abortados, de bezerros (provavelmente PIs), de rebanhos com problemas reprodutivos e casos de doença gastrentérica (FLORES et al., 2005).

## 2.2 Genótipos, biotipos e diversidade antigênica

O BVDV inicialmente foi segregado em dois genótipos: 1 e 2, de acordo com a análise filogenética da região 5'UTR do genoma e também pela análise fenotípica utilizando anticorpos monoclonais (Mabs) contra a glicoproteína E2 (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994). A região 5'UTR é altamente conservada no BVDV quando comparada ao restante do genoma. Por isso, diferenças nessa região tendem a ser mais significantes do que as diferenças no restante do genoma entre os dois genótipos (RIDPATH et al., 1994). Outras regiões também tem sido utilizadas para classificação filogenética do BVDV como N<sup>pro</sup>, E<sup>ns</sup>, C e NS3 (BECHER et al., 2003; XIA et al., 2007; LIU et al., 2009; MINAMI et al., 2009). As cepas “clássicas” são designadas como BVDV- tipo 1, já as cepas do tipo 2 foram detectadas originalmente em surtos na América do Norte associados com uma severa síndrome hemorrágica (SA) (RIDPATH et al., 1994). Até os dias atuais, a SA somente foi reportada como sendo causada por BVDV-2, no entanto estas cepas são a minoria dentro deste genótipo e a maioria das cepas de BVDV-2 são tão virulentas quanto o BVDV-1. Ambos os genótipos são atualmente reconhecidos como duas espécies de BVDV de bovinos (RIDPATH & FULTON, 2009). Além destas espécies já reconhecidas, ainda existem alguns pestivirus de origem bovina isolados na última década que ainda não estão classificados e são conhecidos como pestivirus “atípicos”, sugerindo uma possível nova espécie: BVDV-3 ou *Hobi-viruses* (STAHL et al., 2007; LIU et al., 2009).

Ambos os genótipos também podem ser divididos em dois biotipos: citopático (cp) e não citopático (ncp), de acordo com o efeito da replicação em cultivo celular (GILLESPIE et al., 1960). Os dois biotipos são geralmente isolados de animais com doença das mucosas



(DM) como pares, possuindo características similares genótípicas, fenotípicas e antigênicas. O biotipo cp é gerado a partir do ncp por mutações, durante esse processo uma proteína a mais é expressa, a NS3 (80KDa), como resultado da clivagem de NS2-3. A partir desta descoberta, a NS3 passou a ser considerada o marcador molecular para os vírus cp e implicada na indução de citopatogenicidade (TAUTZ et al., 1998). Além dos erros da RNA polimerase viral, o genoma do BVDV ncp pode sofrer alterações que resultam de recombinações tanto homólogas como não homólogas (TAUTZ et al., 1998). Como resultado, várias formas de geração da NS3 já foram relatadas: inserções de sequências celulares do hospedeiro (QI et al., 1992; MENDEZ et al., 1998), duplicações de sequências do próprio genoma (MEYERS et al., 1992; 1996; QI et al., 1992; TAUTZ et al., 1996), deleções de parte do genoma (TAUTZ et al., 1994; KUPFERMANN et al., 1996), mutações em ponto (KÜMMERER et al., 1998; KÜMMERER & MEYERS, 2000) ou rearranjos dentro do genoma (MEYERS et al., 1992). Apesar de muitas das mutações ocorrerem na NS2-3, parece não haver um *hot spot* para as mutações que levem à clivagem de NS2-3. Além disso, o mais intrigante é que NS3 já foi detectada nas primeiras horas pós-infecção em células infectadas com o biotipo ncp (LACKNER et al., 2004) e também *in vivo*, em animais persistentemente infectados, em que somente o vírus ncp estava presente (KAMEYAMA et al., 2008).

Ambos os biotipos possuem a capacidade de atravessar a placenta e infectar o feto, porém somente o ncp é capaz de causar infecção persistente. A infecção de fêmeas prenhes no primeiro terço da gestação com cepas ncp pode resultar no nascimento de animais persistentemente infectados (PI) e imunotolerantes para o vírus que os gerou. Essa imunotolerância parece ser vírus-específica e o hospedeiro é incapaz de montar uma resposta imune e eliminar o BVDV persistente (McCLURKIN et al., 1984). Isolados ncp representam a grande maioria dos vírus na natureza e se mantém na população pela geração de novos animais PI. Vírus cp são o biotipo de eleição para uso em vacinas e diagnóstico laboratorial pela sua facilidade de manipulação (RIDPATH, 2005).

### **2.3 Organização do genoma**

O genoma dos pestivírus é composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva e, portanto infeccioso quando introduzido em células permissivas. O genoma do vírus é de aproximadamente 12.3Kb (RIDPATH & BOLIN, 1995), dependendo da cepa; possui

uma região terminal 5'UTR (região não traduzida), uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína com aproximadamente 4.000 aminoácidos e uma região terminal 3'UTR (DONIS, 1995; RIDPATH, 2005). A região 5'UTR do genoma contém duas estruturas em forma de grampo que são importantes para a replicação e um sítio para o reconhecimento pelos ribossomos (*internal ribosome entry site* - IRES), importante para o início da tradução, que ocorre independente do *cap*. Essa região também é a mais conservada entre os pestivírus, e portanto, importante para o diagnóstico (RIDPATH, 2005). Na região 3'UTR também estão presentes importantes estruturas primárias e secundárias, que provavelmente atuam em *cis* para iniciar a síntese da fita antígenômica durante a replicação do vírus (GONG et al., 1996).

A poliproteína viral é traduzida via IRES e é clivada durante e após a tradução por proteases virais e celulares, gerando 11 ou 12 proteínas maduras funcionais. A poliproteína é organizada na seguinte ordem, primeiro as proteínas estruturais (exceção para N<sup>pro</sup>) e depois as não-estruturais: NH<sub>2</sub>-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ns</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (RIDPATH, 2005).

A primeira proteína traduzida é a N<sup>pro</sup> (protease amino-terminal, 20kDa), uma proteína não estrutural com função de autoprotease do tipo serina protease que se autocliva da poliproteína assim que é traduzida. A clivagem ocorre em um sítio bem conservado, entre uma cisteína e uma serina (STARK et al., 1993). A N<sup>pro</sup> possui homologia com outros *Pestivirus* como o CSFV, mas não com outros membros da família *Flaviviridae*. A função atribuída a ela é de interferir nas defesas celulares do hospedeiro. Ela é dispensável para a replicação, com exceção de parte da região N-terminal, cuja sequência codificante faz parte do IRES (BEHRENS et al., 1998).

A proteína Core (C, p14) é a seguinte, sendo uma pequena proteína estrutural (14kDa) que compõe o capsídeo. Carregada positivamente, interage com o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo, porém parece não ser essencial para a montagem dos vírions (IVANYI-NAGY et al., 2008). A proteína C também apresenta um alto grau de conservação entre os *Pestivirus* (DONIS, 1995).

Depois da proteína C, seguem-se as três glicoproteínas estruturais que participam da composição do envelope: E<sup>ns</sup> (gp48, E0), E1 (gp25 ou 33), E2 (gp53). A E<sup>ns</sup> é clivada por signalases celulares no retículo endoplasmático. Neste processo ela perde a sua região hidrofóbica e mantém sua porção hidrofílica, o que sugere que perde associação com o envelope. É secretada das células infectadas em grande quantidade, e também é encontrada associada ao vírion (WEILAND et al., 1999). Na sua forma livre, é capaz de atravessar a

membrana celular, exerce efeitos imunossupressivos por induzir apoptose em linfócitos, podendo também ter um papel na virulência (MEYER et al., 2002). Possui atividade de RNase na forma de monômero não glicosilado. Na sua apresentação glicosilada, forma heterodímeros por pontes dissulfeto com a E1, e também heterodímeros com E2 estão presentes no envelope (RUMENAPF et al., 1993; WEILAND et al., 1999).

A glicoproteína E1 estrutural também heterodimeriza com a E2 e juntas formam o principal complexo proteico do envelope viral, essencial para a penetração viral (RONECKER et al., 2008). A sua heterodimerização com a E<sup>ms</sup> também é essencial para a replicação viral (WEGELT et al., 2009). A E1 é imunologicamente pouco importante, uma vez que não induz níveis altos de anticorpos (RIDPATH, 2005).

A glicoproteína E2 está envolvida na ligação dos vírions aos receptores celulares e apresenta-se com caráter imunodominante, induzindo anticorpos neutralizantes em alto níveis. Por esse motivo, é alvo de inúmeras estratégias vacinais de subunidades e de DNA. A E2 contém uma região hipervariável N-terminal onde se localizam os epitopos neutralizantes que são responsáveis pela variação antigênica da E2 entre os isolados de BVDV (DONIS, 1995). Essas variações são de grande relevância para controle e diagnóstico e implicadas nas falhas de proteção vacinal (RIDPATH, 2003, 2005).

Depois de E2, seguem-se as proteínas não-estruturais, iniciando com a p7 (7KDa), uma pequena proteína conservada que forma canais iônicos, e que pode participar do transporte, maturação e liberação das partículas infecciosas (ELBERS et al., 1996; HARADA et al., 2000).

A NS2-3 (p125) é a próxima proteína a ser traduzida. A NS2 possui função de cisteína protease e é responsável pelo processamento da NS2-3. A NS2 sozinha também participa na regulação da replicação, limitando a replicação no início da infecção juntamente com um cofator celular (Jiv). Esse controle parece ser essencial para manutenção do fenótipo ncp (LACKNER et al., 2005). A região da NS3 tem função de serina protease e, junto com a NS4A, que atua como cofator, faz a clivagem de todas as proteínas seguintes. A NS3 também possui atividade de helicase e NTPase necessárias para a replicação viral. A proteína NS2-3 também tem participação regulatória na síntese de RNA e morfogênese dos vírions maduros (AGAPOV et al., 2004; LACKNER et al., 2004). A proteína NS2-3 tem sido muito estudada, por causa da porção NS3 presente nos vírus cp, além de ser uma proteína imunogênica, mas que não induz resposta imune protetora (DONIS 1995; LAMBOT et al., 1997).

A NS4A (p10) é uma proteína altamente conservada que atua como cofator na atividade de protease da NS3, interagindo com a porção N-terminal da NS3 (TAUTZ et al.,

2000). Também parece ter um papel essencial para a replicação eficiente do RNA (GRASSMANN et al., 2001). Já a NS4B (p38) é uma fosfoproteína que se associa com as membranas celulares como as do retículo endoplasmático, e também pode ter participação na atenuação da citopatogenicidade (QU et al., 2001).

A última proteína codificada pelo genoma é a replicase viral, também dividida em duas: NS5A (p58) e NS5B (p75). A NS5A interage com a subunidade alfa do fator de iniciação da elongação eucariótico 1 $\alpha$  (eEIF1 $\alpha$ ), podendo participar da replicação do genoma viral (JOHNSON et al., 2001).

A NS5B é a polimerase de RNA, dependente de RNA (RdRp), responsável pela replicação do genoma viral, contém o motivo canônico das polimerases Gli-Asp-Asp (ZHONG et al., 1998). É capaz de iniciar a síntese do RNA viral dependente ou independente de sequências iniciadoras (de novo) (CHOI et al., 2004). Também participa no direcionamento do RNA recém sintetizado para a encapsidação (ANSARI et al., 2004).

## 2.4 Penetração e replicação viral

A glicoproteína E2 é a principal ligante à superfície celular e responsável pelo tropismo viral (THIEL et al., 1996). Heterodímeros de E1-E2 são essenciais para a penetração do BVDV (RONECKER et al., 2008) e a E<sup>ms</sup> participa com ligações inespecíficas, mas não é necessária (IQBAL et al., 2000; RONECKER et al., 2008). O receptor identificado (CD46) é uma proteína transmembrana presente em todas as células, que regula a ativação do sistema complemento e determina a susceptibilidade celular ao vírus (MAURER et al., 2004; ZEZAFOUN et al., 2011). A penetração ocorre por endocitose mediada por clatrina (GRUMMER et al., 2004), fusão do envelope com a membrana endossomal sob pH baixo e então o ácido nucléico é liberado no citoplasma (DONIS 1995; GONG et al., 1996). Após, o genoma de polaridade positiva é diretamente traduzido em uma poliproteína e, aparentemente, somente um códon AUG (345-388 nt) está envolvido na iniciação da tradução. O recrutamento de ribossomos ocorre via IRES, um elemento de RNA presente na região 5'UTR que atua em *cis* (DENG & BROCK, 1993).

A replicação do genoma do BVDV é similar à de outros vírus RNA de polaridade positiva e ocorre logo após a tradução. Primeiro, um complexo de replicação é montado associado às membranas, composto por fatores celulares e virais na região 3'UTR.

Concomitantemente inicia-se a produção de cópias de RNA de polaridade negativa (antigenômica). Então, a região 5'UTR das fitas negativas recém sintetizadas se arranja em estruturas secundárias em forma grampo e modula a síntese de nova fitas de RNA positivas genômicas. Esse processo requer a polimerase (NS5B), proteínas celulares e cofatores virais (NS2/3, NS4B, NS5A) (GONG et al., 1996; GU et al., 2000). No decorrer da replicação, a quantidade de fitas positivas no citoplasma vai aumentando em comparação com as fitas negativas de RNA (GONG et al., 1996; YU et al., 1999). A progênie de fitas RNA genômicas se associa com a proteína do capsídeo Core por interações com a região 5'UTR. Depois de encapsidado, os vírions sofrem maturação em vesículas intracelulares e são liberados por exocitose (GONG et al., 1996).

## 2.5 Resposta imune, evasão e imunossupressão

O BVDV induz resposta imune humoral e celular. A resposta imune à infecção resulta na produção de anticorpos contra as proteínas E<sup>ms</sup>, E1, E2 e NS3/NS2-3, enquanto que a resposta a vírus inativados somente induz anticorpos contra as proteínas estruturais E<sup>ms</sup>, E1 e E2. As proteínas E2 e NS2-3/NS3 são imunodominantes (RIDPATH, 2005). Dos quatro domínios da E2, três são determinantes antigênicos, e para uma resposta imune efetiva e protetora, é necessário que a E2 mantenha a sua conformação nativa. Anticorpos contra o BVDV são detectados 2-3 semanas pós-infecção e podem ter o seu platô em 10-12 semanas (HOWARD et al., 1992). A reatividade sorológica entre os dois genótipos 1 e 2 é relativamente baixa, o que indica um distinto sítio antigênico na sequência de E2 entre os dois genótipos (RIDPATH, 2005).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> possuem um papel central no estabelecimento da memória imune contra o BVDV. Essa resposta é primariamente direcionada às proteínas NS3 e E2, mas também contra a Core, E<sup>ms</sup> e NS2-3 (COLLEN et al., 2000; 2002). Uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> com fenótipo Th2 é observada, induzindo altos níveis do fator de crescimento de células B e interleucina-4 (IL-4) (RHODES et al., 1999). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> também produzem IL-2 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), demonstrando uma resposta de memória tipo Th1, mas não produzem IL-4 ou atividade estimulatória de células B (RHODES et al., 1999). LEE et al. (2008) observaram que a IL-12 foi induzida em monócitos 1 h pós-infecção com o vírus ncp, mas voltou aos níveis normais dentro de 24 h, tanto para o vírus ncp quanto para o cp. A

resposta dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é primariamente dirigida contra as mesmas proteínas da resposta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (COLLEN et al., 2002).

Diferentes respostas tem sido observadas de acordo com o biotipo infectante (LAMBOT et al., 1997, 1998b; RHODES et al., 1999; GLEW et al., 2003). Vários estudos demonstram que vírus ncp não induzem IFN-1 *in vitro*, independente das cepas e tipos celulares utilizados, e a essa característica suspeitava-se ser implicada *in vivo* na indução de persistência (NAKAMURA et al., 1995; SCHWEIZER & PETERHANS, 2001; GLEW et al., 2003). Células infectadas pelo BVDV ncp também são resistentes a indução de IFN-1 por RNA de fita dupla (dsRNA) (NAKAMURA et al., 1995, SCHWEIZER & PETERHANS, 2001).

A proteína não estrutural N<sup>pro</sup> tem sido implicada no bloqueio da síntese do IFN-1 *in vitro* tanto para vírus ncp quanto para cp. Baigent et al. (2002) demonstraram que a infecção pelo biotipo ncp levava a translocação do fator 3 de regulação do interferon (IRF-3) para o núcleo, mas sem sua ligação ao DNA, e que tanto o biotipo ncp quanto o cp inibem atividade do IRF-3 (BAIGENT et al., 2004). Utilizando um replicon subgenômico, Horscroft et al. (2005) observaram que a N<sup>pro</sup> era a proteína responsável pela supressão do IRF-3, quando induzido pelo vírus Sendai. Gil et al. (2006b) também demonstraram que a N<sup>pro</sup> é a proteína responsável pelo bloqueio na indução de IFN $\alpha/\beta$  e o domínio amino-terminal da proteína (49 aa) seria o responsável por esta função, independente da atividade catalítica de N<sup>pro</sup>. Logo após, Hilton et al. (2006) observaram que, além de impedir a ligação do IRF-3 ao DNA, a N<sup>pro</sup> também é capaz de marcar o IRF-3 para ubiquitinação e subsequente degradação, e também confirmaram que a atividade de autoprotease não é requerida para a inibição. Chen et al. (2007) demonstraram que tanto cepas ncp quanto cp não induzem IFN-1, e que N<sup>pro</sup> interage com IRF-3 independente da fosforilação de IRF-3, o que resulta em poli-ubiquitinação pós transcrição e subsequente degradação do IRF-3. A N<sup>pro</sup> parece direcionar diretamente à ubiquitinação e isso requer a enzima ubiquitina ativadora E1 (CHEN et al., 2007). Adicionalmente, a N<sup>pro</sup> contém um motivo TRASH de ligação ao zinco Cis-X<sub>21</sub>-Cis-X<sub>3</sub>-Cis (X é qualquer aminoácido) na região C-terminal, que parece ser essencial para sua ligação com o IRF-3 (SZYMANSKI et al., 2009).

Resultados opostos *in vitro* e *in vivo* tem sido relatados. Em um experimento utilizando uma cepa ncp defectiva na N<sup>pro</sup> inoculada em bezerros, detectou-se IFN em níveis semelhantes aos animais inoculados com a cepa parental. Porém, a cepa defectiva teve a sua virulência reduzida (HENNINGSON et al., 2009). Mutantes de uma cepa ncp virulenta (NY 93) em que a proteína N<sup>pro</sup> foi deletada, não foram capazes de prevenir a infecção fetal e nem

os danos causados aos fetos apesar da indução de IFN-1, porém foram fortemente atenuados para bovinos adultos (MEYERS et al., 2007).

A proteína estrutural E<sup>ms</sup> na sua forma secretada também tem demonstrado a função de bloquear a indução do IFN-1 *in vitro*. Iqbal et al. (2004) utilizando a proteína E<sup>ms</sup> expressa em células de inseto, demonstraram que ela bloqueia a indução de IFN-1 por dsRNA, tanto quando expressa na célula, como quando adicionada ao meio de cultura. Ela é capaz de se ligar diretamente ao dsRNA, necessitando de seu sítio catalítico para inibir a sinalização, mas só atua sob pH baixo. Magkouras et al. (2008) confirmaram esses achados utilizando somente a proteína E<sup>ms</sup> expressa em células MDBK ou expressa pelo próprio vírus ncp, ambas também foram capazes de eliminar a síntese de IFN quando adicionadas ao sobrenadante, mas não quando transfectadas nas células, sua atividade foi independente da atividade da N<sup>pro</sup>. Mätzner et al. (2009) mostraram evidências que E<sup>ms</sup> cliva RNA de fita simples (ssRNA) mais eficientemente do que dsRNA e que, para isto, necessita de sua atividade catalítica. Também demonstraram que a clivagem ocorre sob pH neutro e não ácido como descrito anteriormente, sugerindo que a E<sup>ms</sup> pode funcionar como um receptor *decoy*, que degradaria o RNA viral para prevenir a indução de IFN em células ainda não infectadas, em animais PI.

Um estudo *in vivo* utilizando mutantes gerados por genética reversa de uma cepa ncp virulenta (NY 93) sem a atividade de E<sup>ms</sup>, demonstrou que os mutantes não foram capazes de prevenir a infecção fetal e nem os danos causados aos fetos, apesar de induzirem IFN-1, porém, foram fortemente atenuados para bovinos adultos (MEYERS et al., 2007). Quando utilizou-se um mutante duplo (E<sup>ms</sup> sem atividade enzimática e N<sup>pro</sup> deletada), a infecção fetal via intranasal foi evitada. Uma forte resposta de IFN-1 nos fetos foi detectada, diferentemente do vírus parental, que não induziu IFN-1. Porém, quando um mutante duplo construído a partir de outra cepa ncp naturalmente atenuada (KE9) foi utilizado, a infecção fetal ocorreu em todos os fetos (MEYERS et al., 2007). Tanto a N<sup>pro</sup> quanto a E<sup>ms</sup>, quando tiveram sua atividade avaliada *in vivo*, não impediram a infecção fetal, mas demonstraram um fenótipo atenuado para bezerros e para bovinos adultos.

A indução da persistência viral é frequentemente atribuída à inabilidade do BVDV ncp em induzir IFN tipo I *in vitro*, porém *in vivo* os resultados encontrados são um pouco diferentes. Charleston et al. (2001) avaliaram a resposta imune de fetos infectados com o vírus ncp no período de gestação susceptível à geração de animais PI e não detectaram IFN-1 no fluido amniótico, porém detectaram baixos níveis de proteína Mx no baço dos fetos (utilizada como um indicador sensível da presença do IFN-1), além de IFN no soro das mães. Depois Smirnova et al. (2008) demonstraram que fetos infectados com o biotipo ncp também são

capazes de produzir IFN-1. Em um feto infectado aos 90 dias de gestação, foram detectados IFN-1 em níveis baixos e ISG15 (gene induzido pelo IFN-1) em outros fetos também infectados na mesma data. Em outro estudo, genes induzidos pelo IFN -1 (ISG15 e PKR) e RNA helicases (RIG-1, LGP-2 e MDA-5) foram detectados em fetos infectados aos 75 dias de gestação com a cepa ncp do BVDV (SHOEMAKER et al., 2009).

Esses resultados foram confirmados posteriormente em bezerros gnotobióticos, que demonstraram forte resposta de IFN $\alpha/\beta$  depois da infecção pelo biotipo ncp (CHARLESTON et al., 2002). A proteína Mx também foi induzida *in vivo* em bezerros inoculados com o BVDV ncp (MÜLLER-DOBLIES et al., 2004). Na tentativa de saber quais as células responsáveis pela produção do IFN-1 *in vivo*, Brackenbury et al. (2005) conseguiram identificar células presentes nos linfonodos expressando os marcadores mielóides CD14, CD11b e CD172a. Depois, Gibson et al. (2012), apontaram estas células produtoras de IFN $\alpha/\beta$  como fazendo parte de um subgrupo de células apresentadoras de antígeno (APC), em infecções com o biotipo ncp.

Animais persistentemente infectados (PI) são capazes de montar uma resposta imune para vários antígenos, incluindo antígenos de BVDV heterólogos. Não possuem anticorpos contra o vírus persistente e a tolerância parece ser mediada por células T específicas. Porém, a diferença em apenas um aminoácido já é suficiente para induzir uma resposta a um BVDV heterólogo (COLLEN et al., 2000). Monócitos *ex vivo* de um animal PI foram capazes de estimular resposta proliferativa em linfócitos *ex vivo* de um animal que teve infecção aguda. Isso demonstra a presença de memória T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específica e que monócitos de animais PI estimulam resposta específica via MHC-I e II (GLEW & HOWARD, 2001).

Muitas evidências tem se acumulado de que a infecção pelo BVDV resulta em imunossupressão do hospedeiro. Seguindo-se à infecção, o BVDV tem sido detectado em linfócitos, macrófagos e neutrófilos. O BVDV tem afinidade por linfócitos T, e isso pode ter um papel na indução de tolerância e interferência na função dos linfócitos (RIDPATH, 2005; RIDPATH & FULTON, 2009). Macrófagos alveolares tem sua expressão de receptores Fc e da proteína do complemento 3 (C3) diminuídas, além da diminuição da atividade fagocítica, após a infecção com o BVDV cp (WELSH et al., 1995). Ambos os biotipos diminuem a produção de ânion superóxido e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos derivados da medula óssea, mas somente o ncp potencializa a produção de óxido nítrico (NO) em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (ADLER et al., 1996). Diminuição do TNF $\alpha$  também foi encontrada em monócitos periféricos infectados com os dois biotipos 24h pós-infecção (LEE et al., 2008). Glew et al. (2003) demonstraram que células dendríticas também são



susceptíveis a infecção pelos dois biotipos *in vitro*, mas que estas células não tem sua função afetada pela infecção viral, porém sofrem citopatologia e são capazes de produzir IFN $\alpha/\beta$  somente em resposta ao vírus cp. No entanto, monócitos infectados pelo vírus ncp tem suas habilidades de estímulo alogênico e de estimular linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória comprometidas, mas não são mortos pelo vírus cp e também produzem IFN em resposta ao vírus cp. Lee et al. (2008) observaram que monócitos infectados *in vitro* induzem quantidades semelhantes de IFN-1 para ambos os biotipos, porém para o ncp o aumento já ocorreu 1h pós-infecção, o que poderia significar alguma diferença da interação do vírus ncp com o hospedeiro.

Além dos estudos sobre indução/bloqueio do IFN-1, alguns estudos também buscaram saber como os vírus ncp/cp são apresentados ao sistema imune e, portanto, que tipo de resposta induzem no hospedeiro. Ambos os biotipos parecem interferir com a captura de antígenos de monócitos, mudando a forma de captura de fase fluida (macropinocitose) para aquela mediada por fase fluida mais a endocitose mediada pelo receptor de manose, 24h pós-infecção. Essa função alterada dos monócitos poderia implicar em imunotolerância e também na imunossupressão por alteração da sua capacidade funcional como APC (BOYD et al., 2004). Monócitos infectados *in vitro* apresentam níveis maiores do receptor *Toll-like* (TLR) 3 para o vírus ncp 1h pós-infecção, porém 24h depois, ambos cp e ncp expressam mais o TLR7. Dessa forma, o vírus ncp poderia escapar do sistema imune alterando a expressão dos TLRs e sua sinalização (LEE et al., 2008). A IL-1 também tem sua atividade diminuída em monócitos de animais PI, demonstrando que o BVDV produz e/ou ativa algum fator solúvel inibidor de IL-1, tanto em infecções agudas causadas por ambos biotipos quanto persistentes (JENSEN & SCHULTZ, 1991). Uma significativa diminuição da IL-1 $\beta$  também foi observada em monócitos infectados com ambos os biotipos do BVDV. Nesse mesmo experimento, as moléculas co-estimulatórias CD80/86 também foram significativamente diminuídas para ambos os biotipos, o que na prática poderia implicar em diminuição da apresentação de antígenos para linfócitos T (LEE et al., 2008).

A infecção pelo BVDV possui um caráter imunossupressor bem caracterizado, potencializando doenças do trato respiratório causadas pelos vírus parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3), herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), pelos procariotos *Mannheimia hemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* e *Hemophilus sommus*. A infecção também potencializa patógenos do trato gastrintérico, como o rotavírus bovino (BoRV) (KAPIL et al., 2005). As ações imunossupressivas relatadas do BVDV incluem, entre outras: diminuição da proliferação de linfócitos, aumento da produção

de prostaglandina E2, diminuição da atividade microbicida e migração aleatória de neutrófilos. Outras ações são a diminuição da secreção de imunoglobulinas, redução da expressão do complemento, de receptores Fc e produção de quimiocinas, diminuição da quimiotaxia, inibição da formação de leucotrienos e inibição da atividade metabólica de PBMCs (PETERHANS, 2003).

## 2.6 Indução de apoptose

Uma das características de cepas cp do BVDV é a indução de morte celular em cultura de células epiteliais, geralmente 24-48 h pós-infecção. Essa “habilidade” de cepas cp é considerada uma perda de função, uma vez que cepas ncp não induzem apoptose, e parece estar relacionada com as mudanças que ocorrem na NS2-3 e que dão origem à NS3, embora outros mecanismos não possam ser excluídos. As células infectadas com vírus cp demonstram sinais clássicos de apoptose, como arredondamento, fragmentação do DNA e inativação da polimerase poly-ADP-ribose (PARP) (ZHANG et al., 1996; HOFF & DONIS, 1997).

As vias de indução de apoptose são variadas e diversas já foram relatadas como sendo induzidas pelo BVDV cp. A via intrínseca, com liberação de citocromo *c* no citoplasma, aumento da expressão do fator ativador de protease apoptótica-1 (APAF-1) e aumento da atividade da caspase-9, já foi demonstrada (GRUMMER et al., 2002). Também foi demonstrada a participação da via extrínseca, por meio do TNF $\alpha$  (YAMANE et al., 2005). Células infectadas pelo BVDV cp apresentam aumento do estresse oxidativo que precede a ativação das caspases (SCHWEIZER & PETERHANS, 1999), induzindo resposta mediada pelo estresse via retículo endoplasmático, que leva à ativação da quinase PERK, hiperfosforilação do fator eucariótico iniciador da tradução-2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) e diminuição da proteína anti-apoptótica bcl-2, levando à apoptose via caspase 12 (JORDAN et al., 2002). Em contraste, a bcl-2 foi superexpressa em células infectadas pelo BVDV ncp (BENDFELDT et al., 2003).

Outra via de indução de apoptose pelo biotipo cp é a via iniciada pelo RNA de fita dupla (dsRNA). Diversos autores já relataram que os BVDV cp produzem maiores quantidades de RNA durante a replicação, assim como maiores quantidades de proteína (VASSILEV & DONIS, 2000; LACKNER et al., 2004). Essa via do dsRNA ativa as proteínas 2'-5'-oligoadenilato sintetase (2'-5'-OAS) e a proteína quinase R (PKR), que

participam da indução da apoptose via caspase 3 (YAMANE et al., 2006). Ao contrário do BVDV cp, o biotipo ncp desenvolveu a capacidade de bloquear a ativação de PKR, permitindo a sobrevivência celular (GIL et al., 2006a).

Como mencionado anteriormente, uma das características da infecção pelo BVDV cp, é a expressão da NS3 como proteína separada, e que isso levaria a indução de apoptose. Gamlen et al. (2010) demonstraram que a NS3, juntamente com seu cofator NS4A, é capaz de induzir apoptose via caspases 3 e 9, e que a indução é dependente da atividade catalítica de NS3. Porém, St-Louis et al. (2005) já haviam estudado a indução de apoptose pela NS3 sem seu cofator, e mesmo assim houve indução de apoptose via caspase 8 e 9.

*In vitro*, monócitos tem sido implicados como indutores de apoptose. Adler et al. (1997) observaram que macrófagos derivados da medula óssea tratados com sobrenadante de células ou macrófagos infectados com o vírus cp tinham uma diminuição dos níveis de óxido nítrico (NO) e um aumento na mortalidade celular. Utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Lambot et al. (1998a) identificaram monócitos como sendo a população celular que mais foi sofreu apoptose induzida direta e indiretamente pelo vírus cp. Esses monócitos também contribuíram por meio de algum fator solúvel para a apoptose de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Perler et al. (2000) demonstraram que macrófagos derivados de monócitos infectados com cp, mas não com ncp, produziram algum fator solúvel capaz de induzir apoptose em macrófagos não infectados.

*In vivo*, diferentemente do que é encontrado *in vitro*, a apoptose também é induzida pelo vírus ncp. Depleção massiva de linfócitos B nas placas de Peyer é encontrada após a infecção com o vírus ncp em bezerros e correlacionada com aumento da clivagem de caspase 3 e células positivas na técnica de TUNEL (PEDRERA et al., 2009). A apoptose de linfócitos T também foi observada, porém em menor intensidade. Essa apoptose aparentemente foi mediada por macrófagos secretando TNF $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , mesmo presentes em baixo número (PEDRERA et al., 2009). Em outro estudo, também com vírus ncp em bezerros Pedrera et al. (2011) encontraram apoptose moderada nas áreas interfoliculares de células T das placas de Peyer, associados a níveis moderados de caspase 8 clivada (via extrínseca). Intensa depleção foi observada nos folículos de células B, associados a uma intensa ativação da caspase 8 clivada. Os níveis de caspase 3 clivada (efetora) também foram similares aos de caspase 8. Outro achado interessante foi a expressão aumentada de bcl-2 nas áreas de células T, que poderiam estar protegendo estas células da apoptose, e justificando o fato destas células serem menos susceptíveis à apoptose.

## 2.7 Patogenia e apresentações da doença

O BVDV geralmente penetra no hospedeiro pela via oronasal, replica nas mucosas e linfonodos regionais, faz viremia associado a leucócitos e se dissemina para outros órgãos. Depois da fase de viremia, o que vai determinar a forma clínica apresentada vai depender principalmente do biotipo infectante, se o animal está gestando, e da fase da gestação (Tabela 1).

O BVDV apresenta tropismo por tecidos epiteliais e linfóides, e também é responsável pela imunossupressão nas infecções agudas. A maioria dos isolados de ambas as espécies virais (BVDV-1 e BVDV-2) apresenta baixa virulência e causa uma infecção com doença branda ou subclínica. Nestes casos, os animais desenvolvem hipertermia moderada, leucopenia e produzem anticorpos neutralizantes. Estima-se que 70 a 90% das infecções causadas por BVDV ocorram sem manifestação de sinais clínicos (BOLIN & GROOMS, 2004; BROCK, 2004). Os sinais clínicos, quando presentes, são variáveis e dependem da imunidade do hospedeiro, da época da infecção, da amostra viral envolvida e de outros patógenos associados. O biotipo ncp do BVDV é o principal responsável pelas manifestações clínicas causadas pela infecção que se apresentam de diversas formas (BAKER, 1995; BOLIN & GROOMS, 2004).

Ridpath & Fulton (2009) dividem a infecção pelo BVDV em dois tipos (aguda ou persistente) e cinco formas da doença aguda (infecção aguda, infecção aguda severa, infecção aguda hemorrágica, infecção aguda – trato respiratório e infecção aguda – imunossupressão). A infecção persistente com o vírus ncp seguida da infecção aguda com o vírus cp resulta em doença das mucosas (DM). Infecções agudas podem resultar em doença entérica, do trato respiratório, ou trato reprodutivo variando na severidade, que depende da cepa infectante, da imunidade, do status reprodutivo e da presença de outros patógenos. Os animais podem apresentar hipertermia leve passageira, sialorréia, tosse e diarreia. As formas variam de subclínicas a fatais, infecções agudas de animais *naïve* de todas as idades pode resultar em diarreia e pneumonia. Na forma aguda severa esse quadro leve passa ser acentuado (RIDPATH & FULTON, 2009).

Na forma aguda hemorrágica ocorre trombocitopenia e consequente hemorragia, lesões similares às da DM e altas taxas de mortalidade (CORAPI et al., 1989). Nesse caso, a doença se manifesta tanto em bezerros quanto em adultos e é causada por isolados mais virulentos identificados inicialmente como BVDV-2 (RIDPATH et al., 1994).

Tabela 1 – Possíveis consequências da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) dependendo da rota de transmissão, estado imune e gestacional do hospedeiro.

Rota de transmissão	Animal infectado		Consequências
Pós-natal (transmissão horizontal)	Soropositivo	Não prenhe	- Doença leve ou infecção subclínica
		Susceptível	- Doença leve ou infecção subclínica - Doença moderada a severa
	Susceptível	Período reprodutivo	- Falha na concepção - Sucesso na concepção
		Prenhe	- Infecção fetal
Prenhe (transmissão vertical)	Susceptível	Feto de Fêmea PI	- Infecção fetal - perda embrionária/aborto - imunotolerância, feto/bezerro PI
		Feto (0 até 90-125 dias), cepa cp	- Infecção fetal - perda embrionária/aborto - malformações fetais
		Feto (0 até 40-125 dias), cepa ncp	- Infecção fetal - perda embrionária/aborto - imunotolerância, feto/bezerro PI - malformações fetais
	Soropositivo	Feto imunocompetente (>125 dias), cp/ncp	- Infecção fetal - aborto - malformações fetais - feto/bezerro normal, soropositivo
		Infecção natural	- Proteção fetal - Infecção fetal?
		Vacinado	- Proteção fetal - Infecção fetal - perda embrionária/aborto - malformações fetais - imunotolerância, feto/bezerro PI - feto/bezerro normal, soropositivo

Fonte: Adaptado de Larson (2005).

A forma respiratória é outro grande problema causado por sua ação direta e indireta na fase de recria dos bovinos. Novamente, a infecção aguda e a consequente imunossupressão estão envolvidas na patogenia do Complexo Respiratório Bovino (CRB), uma doença frequentemente aguda e severa. O BVDV compõe o grupo de agentes virais e bacterianos

responsáveis por essa enfermidade que leva a perda de peso, retardo no crescimento e que pode evoluir para pneumonia e morte dos bezerros (DIÉGUEZ et al., 2009; FULTON et al., 2009; VAN CAMPEN, 2009).

A forma aguda imunossupressora apresenta-se devido as características do BVDV de interagir com o sistema imune do hospedeiro, comprometendo várias de suas funções, destruindo células do tecido linfóide associadas ao intestino (GALT) e reduzindo o número de células circulantes, predispondo o hospedeiro à infecções secundárias (PETERHANS, 2003; RIDPATH & FULTON, 2009).

Uma forma muito comum de apresentação é a reprodutiva, quando ocorre diminuição do desempenho dos rebanhos afetados. Essa forma pode ser subclínica ou acompanhada de hipertermia, inapetência, retorno tardio ao cio, aborto e malformações congênitas (BAKER, 1995; HOUE, 1999; GROOMS, 2006). Em geral, acredita-se que todos os isolados de BVDV, independente do biotipo, sejam capazes de infectar o feto. Esta infecção, dependendo da fase gestacional, pode causar reabsorção embrionária, mumificações, natimortalidade, malformações congênitas e abortos em qualquer idade, ou ainda levar a geração de bezerros PI.

A infecção fetal com amostras ncp entre os dias 45 e 125 de gestação frequentemente resulta no nascimento de bezerros imunotolerantes e persistentemente infectados (PI) com o vírus (McCLURKIN et al., 1984). Os animais PI (forma persistente da doença) replicam e excretam o vírus durante toda a vida, constituindo-se no principal reservatório e fonte de disseminação viral entre os animais (HOUE, 1995). Estes animais vivem entre 6 meses a dois anos, em média, e podem desenvolver uma forma fatal da infecção conhecida como doença das mucosas.

A DM se apresenta na forma de lesões ulcerativas gastrointestinais, hemorragia e diarreia, e acontece devido à mutações do vírus persistente ou superinfecção com vírus cp vacinal ou de campo (BAKER, 1995; BOLIN, 1995) A DM é uma sequela tardia da infecção persistente estabelecida pelo BVDV (BAKER, 1995; TAUTZ et al., 1998). A DM também pode se apresentar na forma crônica, em que os sinais clínicos são inespecíficos, em um quadro de definhamento progressivo prolongado, podendo apresentar lesões orais e na pele (FERREIRA et al., 2008).

## 2.8 Controle e erradicação

O controle da infecção pelo BVDV pode ser realizado com ou sem com o uso de vacinas (BOLIN, 1995). O principal objetivo da vacinação é a prevenção da infecção fetal, principalmente no primeiro terço da gestação, antes que o feto se torne imunocompetente, evitando a consequente produção de bezerros PI (BOLIN, 1995; LINDBERG, 2003; LAUREYNS et al., 2010). A importância epidemiológica dos animais PI tem sido muito evidenciada pelos programas de controle e erradicação que vem obtendo sucesso em alguns países da Europa (KALAICYOGLU, 2007; LAUREYNS et al., 2010), reforçando a necessidade de eliminação dos animais PI dos rebanhos para controlar efetivamente a infecção (BOLIN, 1995; LINDBERG, 2003; RIDPATH, 2003). No entanto, o processo de identificação de animais PI apresenta um elevado custo, e para resolver este problema muitos estudos tem desenvolvido estratégias de coleta e de amostragens dos animais, tanto de rebanhos leiteiros (utilizando leite como amostras) quanto de rebanhos de corte (utilizando soro como amostra) (DEREGT, 2005; HILL et al., 2010; GANNÉE et al., 2011). Dois pontos importantes no controle sem vacinação devem ser levados em consideração. Primeiro, como vantagem, esses rebanhos não vacinados podem ser monitorados pelo *status* sorológico, os animais somente serão soropositivos se o vírus estiver circulando no rebanho e não por anticorpos vacinais. Segundo, como desvantagem, esses rebanhos soronegativos passam a ser totalmente susceptíveis à infecção, portanto medidas de monitoramento passam a ter extrema importância para impedir a reintrodução do vírus no rebanho (DEREGT, 2005; HOUE et al., 2006).

A vacinação é recomendada somente para propriedades de alto risco e deve ser utilizada até que se removam todos os animais PI da propriedade ou até que se reduza a incidência de animais PI a um nível baixo e não haja riscos de reintrodução do BVDV no rebanho (VAN OIRSCHOT et al., 1999; HOUE et al., 2006; LAUREYNS et al., 2010). A vacinação é recomendada também para a imunização de fêmeas susceptíveis antes do período de cobertura. Essa medida é indicada para prevenir a transmissão via transplacentária (MOENNIG et al., 2005). Por outro lado, a vacinação de bezerros é indicada para prevenção de doenças respiratórias e digestivas severas, principalmente em rebanhos confinados (FULTON et al., 2002; DEREGT, 2005).

Dois tipos principais de vacinas contra o BVDV são disponíveis no mercado: vacinas inativadas e vacinas atenuadas (VAN OIRSCHOT, 1999; KELLING, 2004). Ambos os tipos

apresentam vantagens e desvantagens. As vacinas inativadas necessitam de grandes quantidade de antígeno, adjuvantes, aplicação de várias doses, normalmente não induzem resposta imune celular completa, porém são seguras quando aplicadas em vacas prenhes. Já as vacinas atenuadas necessitam de menores quantidade de antígeno – uma vez que o vírus replica, aplicação de somente uma ou duas doses, induz resposta imune completa – humoral e celular, mas não é recomendada para vacas prenhes, pois pode infectar o feto (VAN OIRSCHOT et al., 1999; KELLING, 2004). Essas vacinas têm sido extensivamente utilizadas no controle/prevenção da infecção pelo BVDV, porém apesar da disponibilidade e grande uso das vacinas inativadas e atenuadas, uma importante falha destas vacinas é a falta de um marcador antigênico.

O controle e a erradicação do BVDV poderiam ser mais facilmente alcançados com o auxílio de vacinas com marcador antigênico, acompanhada de teste diagnóstico que diferencie animais vacinados de naturalmente infectados (VAN OIRSCHOT et al., 1999; SHAMS, 2005; KALAICYOGLU, 2007). Vacinas diferenciais já foram desenvolvidas e são utilizadas com sucesso em programas de controle e erradicação para os vírus da pseudorraiva (PRV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1). Essa estratégia também está sendo utilizada para CSFV (MOORMANN et al., 2000; SHAMS, 2005; KALAICYOGLU, 2007). Existem atualmente duas vacinas de subunidade baseadas na expressão da proteína E2 licenciadas e acompanhadas de um teste de ELISA diferencial para este vírus (KALAICYOGLU, 2007).

## **2.9 Genética reversa para pestivírus**

A tecnologia de genética reversa permite a manipulação direta de um genoma de um vírus RNA, a partir de seu DNA clonado. Nesse contexto, a tecnologia de clones infecciosos é uma ferramenta poderosa para investigar a biologia viral, por meio da introdução de mutações, deleções, inserções e rearranjos do genoma viral, que resultariam em alterações no fenótipo. Possui também aplicação na produção de vacinas, permitindo a produção de cepas vacinais mais seguras, mais eficazes e possibilitando a diferenciação de animais infectados de vacinados, entre outras vantagens. Além disso, esses sistemas de genética reversa para pestivírus já permitiram a elucidação de vários aspectos do ciclo replicativo do vírus *in vitro* e *in vivo*, das diferenças apresentadas tanto geneticamente quanto fenotipicamente dos dois biotipos, da patogenia e/ou dos mecanismos de evasão da resposta imune e indução de



persistência fetal, contribuindo para o maior entendimento da infecção pelo BVDV (BECHER et al., 2000; MEYER et al., 2002; DEHAN et al., 2005; GIL et al., 2006b; MEYERS et al., 2007; HENNINGSON et al., 2009; ZEMKE et al., 2010).

O primeiro sistema de genética reversa para pestivírus foi desenvolvido na década de 90, com a descrição da construção do clone infeccioso da cepa vacinal C do CSFV (MOORMANN et al., 1996). Resumidamente, nessa construção o genoma completo foi construído em dois fragmentos de aproximadamente 6 Kb obtidos de vários cDNAs do vírus clonados em plasmídeos. E mais um PCR para introdução dos sítios de restrição em cada extremidade de cada fragmento e entre a sequência do promotor de T7 RNA polimerase (também adicionada pelo primer) na região 5'UTR do primeiro fragmento. As extremidades do genoma foram determinadas pelo método de ligação de extremidades. Os fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM4z-blue (alto número de cópias), porém não foi possível recuperar a sequência completa. Então os dois fragmentos foram clonados separadamente em um vetor de baixo número de cópias (pPRK) para dar estabilidade aos construídos e clonados novamente no pPRK onde foram ligados em um fragmento completo e transformados em células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Esse plasmídeo foi então linearizado em um sítio de restrição único na 3'UTR, purificado e transcrito *in vitro* para transfecção e recuperação do vírus. Mesmo utilizando um vetor estável rearranjos ou inserções ocorreram depois de mais de um ciclo de amplificação das colônias de *E. coli*, portanto vírus somente foram recuperados de células procariontas recém transformadas (MOORMANN et al., 1996).

Ainda no mesmo ano, o primeiro clone de BVDV foi construído por Meyers et al. (1996), que utilizaram a cepa de BVDV-1 CP7. Na estratégia utilizada, o clone infeccioso foi construído a partir de sete plasmídeos que continham a fragmentos da sequência da cepa CP7, menos 23 nucleotídeos da extremidade 5'UTR que não haviam sido determinados, e foram então substituídos pelos da cepa NADL e adicionada também a sequência promotora da T7. A extremidade 3'UTR, também ainda não conhecida, foi introduzida por oligonucleotídeos com base na sequência de outros isolados de BVDVs. Todos os fragmentos foram clonados por técnicas moleculares clássicas em um vetor de baixo número de cópias (pACYC177), linearizado e transcrito *in vitro*. Os vírus recuperados demonstraram uma capacidade replicativa ao redor de 10 vezes menor que o parental, essa diminuição na replicação foi atribuída à mutações inseridas pela *E. coli*, e também talvez às sequências heterólogas introduzidas.

O segundo clone infeccioso de BVDV construído foi o da cepa de BVDV-1 NADL. Nessa estratégia, Vassilev et al. (1997) também utilizaram cinco plasmídeos que continham a

sequência completa do genoma do vírus. As extremidades das UTRs 5' e 3' foram inseridas por meio de oligonucleotídeos. Todos os fragmentos foram unidos em dois plasmídeos e depois em um plasmídeo (pGEM4), também por técnicas moleculares clássicas. Um marcador genético foi inserido pela deleção de 3 nt na posição 5182-5184 (códon 1600 - Ac. Glu.), na sequência celular de NADL. Problemas de instabilidade em *E. coli* foram observados, porém resolvidos utilizando uma cepa diferente (GM119). O fenótipo do vírus recuperado foi indistinguível do vírus parental.

Kümmerer & Meyers (2000) construíram o clone infeccioso da cepa de BVDV-1 Oregon utilizando uma estratégia similar à descrita por Meyers et al. (1996) e Vassilev et al. (1997). Quatro plasmídeos contendo a sequência do genoma e mais dois fragmentos de RT-PCR das duas extremidades heterólogas da cepa SD-1 (400 nt 5'UTR e 50 nt 3'UTR) foram utilizados para construir o plasmídeo pOR. O vírus recuperado replicou com menor eficiência do que o vírus parental.

O primeiro clone infeccioso da cepa de BVDV-2 foi construído partir de uma biblioteca de cDNA da cepa virulenta NY'93/C por Meyer et al. (2002). A 5'UTR foi determinada pela tecnologia de amplificação rápida de extremidades do cDNA (RACE) e amplificada por RT-PCR. A sequência da proteína E2 foi instável no vetor e teve que ser amplificada por RT-PCR. A extremidade 3'UTR havia sido determinada anteriormente também por RACE, assim oligonucleotídeos foram planejados e o clone da biblioteca de cDNA com a extremidade completa 3' pode ser construído. O vetor de baixo número de cópias pACYC177 foi novamente utilizado e o vírus recuperado demonstrou características de replicação equivalentes ao vírus parental. Além disso, quando o vírus recuperado foi inoculado em animais e manteve as suas características virulentas originais.

Dehan et al. (2005) já utilizaram uma metodologia mais moderna na construção do segundo clone infeccioso de BVDV-2 da cepa virulenta 890/256. As extremidades do genoma foram determinadas por ligação das extremidades e, então, dois fragmentos de RT-PCR (2kb e 10.5Kb) foram clonados, sequenciados, e digeridos em dois fragmentos e ligados. O genoma inteiro ligado foi amplificado por PCR, e a sequência do promotor T7 adicionada com um oligonucleotídeo ao produto final. Ao terminal 3' do produto foi adicionado um sítio de restrição e um outro sítio de restrição foi adicionado internamente para marcar o vírus construído. O PCR do genoma completo foi purificado, transcrito e transfectado em células MDBK. O vírus recuperado demonstrou uma replicação mais de 10 vezes inferior ao vírus parental e foi atenuado em bezerros, provavelmente pela menor eficiência replicativa. Posteriormente, outro clone de cDNA da cepa 890 foi construído por Mischkale et al. (2010).

Nessa estratégia, quatro fragmentos de RT-PCR foram digeridos, ligados e clonados em um vetor de baixo número de cópias em *E. coli*. O clone foi instável em *E. coli* cepa DH10B e foi então reconstruído na cepa MDS42. O vírus recuperado apresentou características de replicação similares ao parental, mas quando foi inoculado em animais demonstrou um fenótipo mais atenuado.

O clone infeccioso da cepa de BVDV SD-1 foi construído por Fan & Wang (2009). Na estratégia utilizada, sete produtos de RT-PCR foram amplificados, digeridos com duas enzimas diferentes cada um e clonados. Os erros encontrados foram corrigidos por mutação direta do sítio. Ao final, depois de várias subclonagens, o genoma completo foi unido no vetor pACXF e transformado em *E. coli* XL1-blue. O vírus recuperado demonstrou características de replicação similares ao vírus parental e foi capaz de infectar os fetos quando inoculado em quatro fêmeas prenhes.

Essas construções utilizaram diferentes estratégias para a obtenção dos clones de cDNA. Porém, o que elas apresentam em comum é o uso de vários produtos de RT-PCR, uso de vários sítios de restrição, necessitando assim de várias digestões e ligações, além de subclonagens em diferentes plasmídeos e usos do sistema de clonagem em procariotos. Alguns problemas de instabilidade ainda são encontrados e tornam difícil a recuperação de clones viáveis e/ou com replicação eficiente. Fan & Bird (2008b) utilizaram um cromossomo artificial de bactéria (BAC) e diferentes cepas de *E. coli* para prevenir possíveis problemas de instabilidade anteriormente relatados (FAN & BIRD, 2008a) e os vírus foram eficientemente recuperados.

Recentemente, Rasmussen et al. (2010) construíram dois clones infecciosos (Paderborn - CSFV e Ghiforn - BDV) utilizando apenas um PCR do genoma completo, clonados também no vetor BAC. Foram transformados em *E. coli* DH10B, digeridos e transcritos *in vitro*. O vírus Paderborn foi recuperado sem problemas, porém para o vírus Ghiforn, somente algumas células foram positivas na primeira passagem, indicando problemas na replicação viral, mesmo com o mínimo de manipulação utilizada. Rasmussen et al. (2008), já haviam recuperado o primeiro vírus de BDV (Ghiforn), a partir de um PCR do genoma completo, adicionado da sequência do promotor da RNA polimerase do T7, transcrito *in vitro*, transfectado e recuperado com fenótipo similar ao parental, porém dessa forma, sem a clonagem do genoma em um plasmídeo, a manipulação não é possível.

Outra técnica molecular tem sido utilizada para resolver problemas de instabilidade na construção de clones infecciosos de alguns flavivírus em *E. coli* (POLO et al., 1997; PURI et al., 2000). Polo et al. (1997), utilizaram duas estratégias para construir o clone infeccioso de

DENV-2 cepa NGC, uma utilizando um cromossomo artificial de levedura (YAC) e outra utilizando um vetor de transferência. Ambas as construções foram realizadas utilizando uma série de clonagens e subclonagens em diferentes plasmídeos, por fim esses foram linearizados e quatro fragmentos foram transformados em levedura para recombinação homóloga. Ambas as construções foram realizadas em *Sacharomyces cerevisiae* cepa YPH857. A construção utilizando o vetor de transferência, foi então transformada em *E. coli* STBL2 (para obtenção de maiores quantidades de DNA) e o DNA purificado. Na construção utilizando o YAC, o DNA foi digerido, ligado e transformado no mesmo vetor de transferência em *E. coli* e o DNA purificado. Colônias de dois tamanhos foram encontradas em *E. coli*, demonstrando ainda alguma instabilidade. Para transcrição *in vitro*, os vetores foram linearizados, purificados e transcritos utilizando o promotor da RNA polimerase SP6. Ambos vírus recuperados foram infecciosos com eficiência de replicação similar ao parental.

Puri et al. (2000) construíram um clone infeccioso de DENV-1 cepa WP, a partir de três fragmentos de RT-PCR, transformados em levedura (YPH857) para recombinação homóloga juntamente com um vetor de transferência. Os fragmentos 1 e 3 foram previamente clonados no vetor em *E. coli* e unidos ao fragmento 2 diretamente da RT-PCR (que continha sobreposições ao 1 e 3) por recombinação. Novamente o material recombinado foi amplificado em *E. coli* STBL2. O vetor foi linearizado, transcrito *in vitro* e transfectado em células LLCMK2. Os vírus recuperados foram fenotipicamente similares ao parental.

A técnica de recombinação homóloga baseia-se na capacidade de reparo do DNA da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, em que fragmentos com sequências homólogas mínimas de 15pb são corretamente unidos (OLDENBURG et al., 1997; GIBSON, 2009; SHANKS et al., 2009). A recombinação homóloga em levedura como método de clonagem aplica-se como uma alternativa às técnicas padrão moleculares, e tem contribuído para as mais diversas aplicações. Essa técnica tem sido empregada também em outros sistemas que não clones infecciosos. Na construção de adenovírus como vetores (HOKANSON et al., 2003), em estudos de genes do HIV (MAROZSAN & ARTS, 2003), na criação de bibliotecas de vírus RNAs (DELMOND et al., 2004), além do uso na construção de organismos procariotos (GIBSON et al., 2008).

No presente estudo, um clone infeccioso da cepa brasileira do BVDV IBSP4-ncp foi construído (CI-pBSC\_IBSP4-ncp) utilizando o sistema de recombinação homóloga em levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Depois de caracterizado *in vitro* este clone foi utilizado para a construção de um vírus recombinante expressando um gene repórter (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc), construído também por recombinação homóloga e caracterizado *in vitro*. As

construções e caracterizações destes vírus serão apresentadas na forma de dois capítulos que se seguem.



### 3. CAPITULO 1

#### **Construção de um clone de cDNA recombinante do vírus da diarreia viral bovina por recombinação homóloga em levedura**

Sandra Arenhart<sup>1</sup>, Eduardo F. Flores<sup>1\*</sup>, Rudi Weiblen<sup>1</sup> e Laura H.V.G. Gil<sup>2</sup>

(Artigo a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* - 2012)

---

<sup>1</sup> Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, PE 50670-420, Brasil.

**ABSTRACT.-** Arenhart S., Flores E.F., Weiblen R. & Gil L.H.V.G. 2012. [**Construction of a recombinant cDNA clone of bovine viral diarrhea virus by homologous recombination in yeast.**] Construção de um clone de cDNA recombinante do vírus da diarreia viral bovina por recombinação homóloga em levedura. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

\_\_\_\_\_Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV) infection is responsible for considerable economic losses to the livestock industry. Two biotypes of the virus are known: cytopathic (cp) and non-cytopathic (ncp). The ncp biotype has been implicated as responsible for the majority of infections, and is able to produce persistence and to spread among cattle. The development of new strategies to control the infection depends on a better understanding of the viral biology. To this end, an infectious clone from the Brazilian strain of BVDV (IBSP4-ncp) was obtained by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The entire open reading frame (ORF) of the IBSP4 virus was amplified in three RT-PCR fragments, and both 5' and 3' untranslated regions (UTR) were replaced by the UTRs from the NADL strain. Two recombinant clones were characterized (IC-pBSC\_IBSP4-ncp#2 and #3). Transfection of MDBK cells with *in vitro* transcribed RNA of the clones resulted in recovery of viable and replicative viruses. The kinetics of replication, focus size and morphology of the rescued viruses were similar to those of the parental virus. In addition, the obtained viruses were stable after ten cell passages in tissue culture. Sequencing of the viral genome at the fifth passage (p5) revealed five mutations in the N-terminal region of the first ORF protein, N<sup>pro</sup> (A18V, N26D, V38A, A43S e E55D). It was hypothesized that this mutation occurred in order to stabilize secondary structure in this genome region, which contains *cis* elements important for an efficient genome replication, thereby self-adapting to heterologous UTRs. In



conclusion, the constructed infectious clone will be useful to develop studies concerning viral biology and pathogenesis, viral mechanisms of evasion of the immune system, persistence and, potentially for genetic manipulation for use in vaccines.

INDEX TERMS: BVDV, pestivirus, reverse genetics, infectious clone, yeast homologous recombination.

**RESUMO.-** A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por consideráveis perdas em rebanhos bovinos. Dois biotipos deste vírus são conhecidos: citopático (cp) e não-citopático (ncp). Dentre eles, o biotipo ncp tem sido implicado como responsável pela maioria das infecções e consequentes perdas econômicas, por sua capacidade de causar persistência, e assim, se disseminar entre os animais. Para desenvolver novas estratégias de controle da infecção é necessário melhor entender a biologia do vírus. Para isso, construiu-se um clone infeccioso de uma cepa brasileira do BVDV (IBSP4-ncp), utilizando a técnica molecular de recombinação homóloga em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A fase aberta de leitura (ORF) completa do vírus IBSP4 foi amplificada em três fragmentos de RT-PCR, substituindo-se as regiões não-traduzidas (UTRs) 5' e 3' pelas UTRs da cepa NADL. Dois clones recombinantes obtidos foram caracterizados (CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e #3). A transfecção de células MDBK com RNA obtido por transcrição *in vitro* dos clones resultou na replicação e recuperação de vírus viável. Os vírus obtidos apresentaram cinética de replicação, tamanho e morfologia de placas similares ao vírus parental. Além disso, foram estáveis após 10 passagens em cultivo celular. O sequenciamento realizado na passagem 5 (p5) revelou cinco mutações na região N-terminal da primeira proteína da ORF, N<sup>pro</sup> (A18V, N26D, V38A, A43S e E55D). Hipotetiza-se que essas mutações tenham ocorrido para a estabilização da estrutura secundária do RNA nesta região, que contém elementos em *cis* importantes para a replicação do genoma, assim adaptando-se às UTRs heterólogas. Em

resumo, a obtenção desse clone infeccioso será útil para estudos da biologia e patogenia viral, mecanismos de evasão viral, persistência e, potencialmente para manipulação genética para uso em vacinas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BVDV, pestivirus, genética reversa, clone infeccioso, recombinação homóloga em levedura.

## INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um patógeno de bovinos que causa importantes perdas econômicas, principalmente reprodutivas (Houe et al. 2006). O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*. Neste gênero também são classificados outras duas espécies virais de importância veterinária: o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira (BDV) (Ridpath 2005). Os pestivírus são vírus envelopados, esféricos, variam entre 40 a 60 nm de diâmetro e possuem genoma RNA fita simples de polaridade positiva. O genoma do vírus é de aproximadamente 12.3 Kb, possui uma região 5'UTR (região não traduzida), uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos e uma região 3'UTR (Donis 1995, Ridpath 2005). A poliproteína viral é traduzida via IRES (*internal ribosome entry site*) e é clivada durante e após a tradução por proteases virais e celulares, gerando 11 proteínas maduras funcionais. A poliproteína é organizada na seguinte ordem: NH<sub>2</sub>-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ms</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. O BVDV pode ser classificado em dois genótipos: 1 e 2 (Kümmerer & Meyers 2000). Essa divisão é baseada em diferenças na região 5'UTR e na diversidade da glicoproteína E2. Ambos os genótipos também podem ser divididos em dois biotipos: citopático (cp) e não citopático (ncp), de acordo com o efeito da replicação em cultivo celular. O biotipo cp é gerado a partir do ncp por deleções, duplicações, rearranjos genéticos, inserções de sequências celulares ou por mutações em ponto. Essas

mutações ocorrem principalmente na proteína não estrutural NS2-3, que passa a ser clivada em NS2 e NS3 no biotipo cp (Tautz et al. 1994, Kümmerer & Meyers 2000, Ridpath 2005). Isolados ncp representam a grande maioria dos vírus na natureza e são os responsáveis pelas infecções agudas e, conseqüentemente, pela maioria das perdas econômicas (Bolin & Grooms 2004).

As conseqüências da infecção pelo BVDV se apresentam de diversas formas, como infecções subclínicas, doença respiratória, digestiva, reprodutiva, doença das mucosas (DM), síndrome hemorrágica (SH), e condições associadas com os efeitos imunossupressivos da infecção (Bolin & Grooms 2004). Além disso, a infecção fetal com o vírus ncp no primeiro terço gestacional frequentemente resulta no nascimento de bezerros imunotolerantes e persistentemente infectados (PI), que são os principais mantenedores do vírus nos rebanhos (McClurkin et al. 1984). Diversos estudos tem sido realizados para o entendimento da patogenia e persistência da infecção pelo vírus ncp, focando principalmente na interação vírus-resposta imune ou possíveis proteínas virais envolvidas no escape do sistema imune ou na indução da persistência viral (Meyer et al. 2002, Gil et al. 2006, Hilton et al. 2006, Meyers et al. 2007, Magkouras et al. 2008, Henningson et al. 2009). Porém, para tal é necessário o uso de ferramentas como o sistema de genética reversa que permita a manipulação direta do genoma de um vírus de RNA, a partir de seu cDNA clonado. O primeiro sistema de genética reversa para pestivírus foi desenvolvido na década de 1990, com a descrição da construção do clone infeccioso da cepa vacinal C do CSFV (Moormann et al. 1996). Logo após, o primeiro clone de BVDV foi construído por Meyers et al. (1996), que utilizou a cepa CP7. Desde então, foram descritas a construção de clones infecciosos para diversos pestivírus: Alfort/187 (Ruggli et al. 1996), NADL (Vassilev et al. 1997), Oregon (Kümmerer & Meyers 2000), NY'93/C (Meyer et al. 2002), SD-1 (Fan & Bird et al. 2009), 890 (Mischkale et al. 2010), Paderborn (Rasmussen et al. 2010), entre outros. Estes sistemas de genética reversa para pestivírus têm permitido a

elucidação de vários aspectos do ciclo replicativo, da patogenia e/ou dos mecanismos de evasão da resposta imune (Becher et al. 2000, Meyer et al. 2002, Dehan et al. 2005, Gil et al. 2006, Meyers et al. 2007, Henningson et al. 2009, Szymanski et al. 2009, Zemke et al. 2010).

As técnicas utilizadas nas construções e manipulações dos clones infecciosos, no entanto, são laboriosas e incluem o uso de inúmeros amplicons, plasmídeos e vários sítios de restrição enzimática. Nesse contexto, a técnica de recombinação homóloga em levedura como método de clonagem aplica-se como uma alternativa que tem contribuído para as mais diversas aplicações moleculares. Essa técnica tem sido empregada para superar os problemas de instabilidade de genomas de clones infecciosos de alguns flavivírus em *E. coli* (Polo et al. 1997, Puri et al. 2000), na construção de adenovírus como vetores (Hokanson et al. 2003), em estudos de genes do HIV (Marozsan & Arts 2003), na criação de bibliotecas de vírus RNAs (Delmond et al. 2004), além do uso na construção de organismos procariotos (Gibson et al. 2008). Nesta estratégia, um fragmento de DNA, contendo sequências homólogas ao vetor nas suas extremidades, pode ser diretamente clonado por recombinação *in vivo* no vetor. Múltiplos fragmentos de DNA podem ser corretamente recombinados numa única molécula (Gibson et al. 2008, Gibson 2009). Essa estratégia possui as vantagens de não depender de vários sítios de restrição, inserções de mutações ou vários produtos de amplificação, como no sistema de clonagem em bactéria, o que torna a técnica mais eficiente e menos laboriosa e (Oldenburg et al. 1997, Gibson et al. 2008, 2009, Shanks et al. 2009).

Esse trabalho relata a construção de um clone infeccioso de BVDV da cepa brasileira IBSP4-ncp, utilizando a técnica de recombinação homóloga em levedura. Dois clones foram recuperados com sucesso, demonstrando características fenotípicas similares ao vírus parental. A construção de um clone infeccioso de BVDV de uma cepa brasileira abre novas possibilidades de estudos moleculares, imunopatogênicos, construção de vírus atenuados ou quiméricos para o desenvolvimento de vacinas contra o BVDV e outros pestivírus.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Cultivo de células e vírus.** Células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), livres de pestivírus, foram mantidas em meio MEM (*minimal essential medium* – SIGMA ALDRICH, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% soro equino, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Os cultivos celulares foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para a construção do clone infeccioso foi utilizado o biotipo não-citopático (ncp) da cepa IBSP-4 do BVDV isolada no Instituto Biológico de São Paulo (IBSP) de um rebanho com problemas reprodutivos (Flores et al. 2005). Após o isolamento, o vírus foi clonado biologicamente por diluição limitante em células MDBK para a separação dos biotipos cp e ncp. A clonagem e purificação foram confirmadas por imunoperoxidase (IPX) e imunofluorescência indireta (IFI). Os vírus purificados foram também caracterizados quanto ao perfil de reatividade com anticorpos monoclonais (Mabs) e caracterizados filogeneticamente por meio de sequenciamento da região 5' não traduzida (região não traduzida - UTR) como pertencendo ao genótipo tipo 1b (Flores et al. 2005, Bianchi et al. 2011).

**Oligonucleotídeos e plasmídeo.** Os oligonucleotídeos para amplificação e recombinação homóloga (Quadro 1) foram inicialmente planejados com base em regiões conservadas entre diferentes cepas de referência e de isolados do BVDV tipo 1, utilizando sequências completas disponíveis no banco de dados público *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas sequências (U86600, U86599, U63479, M96751, DQ088995, AJ585412, AJ133739, AJ133738, AF526381, AF091605) foram alinhadas utilizando o programa para o alinhamento de múltiplas sequências ClustalW2 disponível na web (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Adicionalmente, os oligonucleotídeos foram planejados para que os amplicons obtidos tivessem além das sequências necessárias para a amplificação, as regiões homólogas (~20-25 nt) para a recombinação homóloga em

levedura. Todos os oligonucleotídeos foram adquiridos da Invitrogen. O plasmídeo de baixo número de cópias pBSC\_NADL\_HDR contendo o genoma completo da cepa de referência NADL utilizado para a construção dos clones foi gentilmente cedido pelo Dr. Ruben O. Donis (CDC Influenza Division, Atlanta, USA). Já os oligonucleotídeos para sequenciamento foram posteriormente desenhados com base nos amplicons obtidos para a recombinação (Quadro 2).

**Extração do RNA viral.** Células MDBK foram inoculadas com o vírus IBSP4-ncp a uma m.o.i. (*multiplicity of infection*) de 1. Após 72 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o RNA viral genômico foi extraído do sobrenadante através da utilização do kit QIAamp Viral RNA Mini Kit/QIAamp MiniElute Vírus Spin (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, 200 µL de sobrenadante de células infectadas foram tratados sob condições de desnaturação para inativar RNAses e assegurar o isolamento de RNA viral intacto, em seguida carregado em coluna de purificação. Após a ligação do RNA à membrana de sílica-gel, os contaminantes foram removidos através de duas lavagens por dois tampões de lavagem diferentes. O RNA foi eluído da coluna com uma solução aquosa livre de RNAses e armazenado - 80°C, até o momento do uso.

**Construção do clone de cDNA da cepa IBSP4-ncp por recombinação homóloga em levedura.** A técnica de recombinação homóloga foi utilizada nas manipulações genéticas do plasmídeo pBSC\_NADL\_HDR que contém o clone infeccioso do vírus NADL. O vetor contém cinco sítios de restrição para a enzima *Bam*HI localizados na *open reading frame* (ORF), o que permitiu a retirada parcial da ORF do clone NADL. Para a construção do clone de cDNA do IBSP4-ncp, a ORF completa do vírus foi amplificada em três fragmentos por RT-PCR. Os fragmentos foram planejados para que houvesse sobreposição de nucleotídeos entre cada fragmento do genoma e entre os fragmentos das extremidades com o vetor digerido (Fig.1).

**Preparação do vetor para a recombinação.** Para a recombinação homóloga do vetor com os três fragmentos virais amplificados, o plasmídeo de baixo número de cópias pBSC\_NADL\_HDR foi digerido de maneira que mantivesse suas regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' inteiras. Quatro µg do plasmídeo foram então digeridas com a enzima *Bam*HI (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C durante 3 h, seguido da desfosforilação com 5U da enzima CIAP (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA) por 45 min a 37°C. O produto final foi resolvido em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo. A banda com o tamanho específico foi excisada do gel e purificada com o Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

**Amplificação da ORF completa da cepa IBSP-4ncp por RT-PCR.** A construção do vírus pBSC\_IBSP4-ncp foi realizada por recombinação homóloga em levedura de três produtos de RT-PCR contendo extremidades homólogas e o vetor pBSC\_NADL\_HDR digerido com *Bam*HI. O primeiro fragmento (4.081pb) foi amplificado com os oligonucleotídeos BVDVqm 5'UTR\_NADL\_IBSP-4-F e BVDV-Osloss-4458R e continha a sequência de 25 nt 3'terminais da UTR 5' do vírus NADL. O segundo fragmento (4.466pb) foi amplificado com os oligonucleotídeos BVDV1-4121F e BVDV1-8893R e continha somente a sequência da cepa IBSP4-ncp. E o terceiro fragmento (3.360pb) foi amplificado com os oligonucleotídeos BVDV-Osloss-8520F e BVDVqm 3'UTR\_NADL\_IBSP-4-R e continha 25 nt 5'terminais na UTR3' do vírus NADL. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação desses fragmentos estão representados na (Quadro 1). A transcrição reversa a partir do RNA viral foi realizada utilizando a enzima Superscript III Reverse Transcriptase 200U/µL (Invitrogen), os oligonucleotídeos antisense específicos para cada um dos três fragmentos e o inibidor de RNase - RNAaseOUT 40 U/µL (Invitrogen), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante (Invitrogen), tendo como volume de reação 20 µL. Para 50 µl de reação de PCR foi utilizado 1X do tampão KlenTaq-LA *polymerase* (Clontech), 1,3% DMSO,

0.4 M betaina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* (Clontech), 20 pmol dos oligonucleotídeos específicos e aproximadamente 50 ng do cDNA molde. As condições de PCR foram: 5 min a 95°C para desnaturações iniciais e ativação da polimerase, seguidas de 35 ciclos, cada ciclo composto de 30 seg de desnaturação a 95°C, 30 seg de anelamento a 52°C, 1 min de extensão para cada 1.000 pares de base (pb) a 72°C, e 10 min de extensão final a 72°C.

**Transformação da levedura e recombinação.** Os três fragmentos de RT-PCR contendo os genes do vírus IBSP4-ncp e o vetor pBSC-NADL-HDR digerido com a enzima *Bam*HI foram introduzidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, cepa RFY206 (MATA *his3 $\Delta$ 200 leu2-3 lys2 $\Delta$ 201 ura3-52 trp1 $\Delta$ ::hisG*) (Finley & Brent 1994), pela transformação com acetato de lítio (LiOAc) (Sambrook & Russel 2001). Para isto as leveduras foram amplificadas em meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose* – 20 g de peptona, 10 g de extrato de levedura, 20 g de glucose, ddH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L), a 30°C por 16h. No dia seguinte, meio YPD foi inoculado com a levedura em uma densidade óptica (DO) de 0,1, e posteriormente crescido a 30°C até uma DO de 0,55. Em seguida, as leveduras foram concentradas por centrifugação, lavadas e transformadas. Após a transformação as leveduras foram plaqueadas em placas de YNB (*Yeast Nitrogen Base* - 6,7 g *Yeast nitrogen base w/o amino acids, w/ ammonium sulfate* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA, 20 g glucose, 1:10 V/V solução de aminoácidos 10X – *Yeast synthetic drop-out medium without tryptophan* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA) sólido na ausência do aminoácido triptofano (trp) e mantidas a 30°C por até três dias.

**Extração de DNA plasmideal da levedura e confirmação da identidade dos clones.** Cinco colônias positivas para a recombinação entre todos os fragmentos de RT-PCR e para vetor foram cultivadas em 20 mL de meio YNB líquido, na ausência do trp, por 18-24 h à 30°C. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas



com ddH<sub>2</sub>O e ressuspendidas em 400µL de tampão SCE (1 M Sorbitol, 100 mM NaAc e 60 mM EDTA). Em seguida, foram adicionados 4 µL de zimolase (200 mg/mL) e 2 µL de β-mercaptoetanol. As células foram incubadas por uma hora e depois concentradas por centrifugação. A extração do DNA plasmideal foi prosseguida com o Kit QIAprep Spin MiniPrep (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo recomendações do fabricante. A construção foi previamente confirmada por PCR com um par de oligonucleotídeos específicos para amplificar um produto contendo parte do vetor e parte do construído. As condições de PCR foram anteriormente descritas. Esse mesmo PCR foi reconfirmado por sequenciamento genético. Posteriormente, os plasmídeos confirmados foram amplificados em levedura e extraídos utilizando-se o Kit Plasmid Midi (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

**Caracterização *in vitro* dos clones infecciosos construídos.** Para a caracterização dos vírus construídos, RNA sintetizado *in vitro* de dois clones foi introduzido em células eucariotas por eletroporação. A replicação viral foi avaliada por ensaios de imunofluorescência indireta e imunoperoxidase. Todos os vírus recuperados pelo sistema de genética reversa foram amplificados, clarificados por centrifugação e estocados a -80°C, e posteriormente caracterizados quanto a seu perfil genético e fenotípico na passagem cinco (p5).

**PCR do genoma completo e transcrição *in vitro*.** A amplificação completa do genoma viral para a transcrição *in vitro* foi realizada em uma reação de 50 µL utilizando a enzima KlenTaq-LA (Clontech). A reação foi composta de 100 ng de DNA plasmideal de levedura, 1X do tampão KlenTaq-LA (Clontech), 1,3% Dimetil-sulfóxido (DMSO), 0,4 M betaina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* e 20 pmol de oligonucleotídeos específicos (pBSC-T7-NADL-F e NADL-3'UTR-R). Esses oligonucleotídeos se alinham nas extremidades 5'-UTR e 3'UTR do genoma NADL, respectivamente. O oligonucleotídeo pBSC-T7-NADL-F contém a sequência do

promotor para RNA polimerase do bacteriófago T7, o que permite a transcrição *in vitro* do produto de PCR amplificado por este par de oligonucleotídeos. As condições de amplificação foram: 4 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 32 ciclos de 1 min de desnaturação a 93°C, 1 min de anelamento a 58°C, 13 min de extensão a 72°C com acréscimos de 10 seg a cada ciclo e 20 min finais de extensão a 72°C.

O produto de PCR contendo a sequência completa do genoma viral possui na região 5' terminal a sequência para o promotor de bacteriófago T7, o qual foi inserido através do oligonucleotídeo utilizado para a amplificação. Após purificação com fenol- clorofórmio e precipitação com etanol a transcrição *in vitro* foi realizada utilizando-se o kit T7 MEGAscript (Ambion) conforme instruções do fabricante.

**Transfecção do RNA viral em células MDBK por eletroporação.** Para a eletroporação de células MDBK foram utilizados: 20 µg do RNA transcrito *in vitro* e  $8 \times 10^6$  células MDBK suspensos em tampão *Cytomix* (Ansari et al. 2004). A eletroporação foi realizada em cubetas de 4 mm, seguindo as seguintes condições: 900 V, 99 mseg, 10 pulsos, 1 s de intervalo entre os pulsos (eletroporador ECM-830, BTX) (Lin Qu et al. 2001). Resumidamente, as células foram individualizadas com tripsina 0,02% por 5 min, lavadas uma vez com meio MEM (sem suplementos e antibióticos), centrifugadas e lavadas novamente duas vezes com PBS pH7,2/DEPC (dietilpirocarbonato) a 4°C e ressuspensas em 400 µL *Cytomix* 1X pH 7,6, 24 µL de ATP 0.1 M e 60 µL de Glutathione 0.1 M. Após a eletroporação, as células foram mantidas em repouso a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min antes de serem ressuspensas em meio MEM completo 5% de soro equino e distribuídas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>.

**Ensaio de Imunofluorescência indireta e imunoperoxidase.** As células eletroporadas com o RNA viral foram monitoradas nos dias 1–5 após eletroporação, por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para BVDV (Kreutz et al.

2000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC [SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA]) diluído 1:100 em PBS pH 7,2. A microscopia de imunofluorescência indireta foi realizada utilizando-se o microscópio Leica DMI 4000B.

Para a detecção dos antígenos virais por imunofluorescência indireta, células MDBK transfectadas e/ou inoculadas foram cultivadas, fixadas em solução acetona 50% (em PBS pH 7,2) por 10 min a - 20°C. Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 1 h com os anticorpos primários, lavadas três vezes com PBS pH 7,2 e três vezes com ddH<sub>2</sub>O, secas à temperatura ambiente. Após incubação a 37°C por 1 h com o anticorpo secundário, as células foram lavadas, secadas e montadas para leitura com glicerol (50% em PBS) e lamínula de vidro.

Para a detecção de antígenos virais por imunoperoxidase (IPX), células MDBK inoculadas, foram cultivadas, fixadas em solução acetona 30% (em PBS pH 7,2) por 13 min a 4°C e secadas ao ar durante 24 h. As células foram então lavadas com PBS-Tween-20 0.25%, incubadas a 37°C por 60-90 min com anticorpo monoclonal contra BVDV (descrito no item anterior) diluído 1:2 em tampão de ligação (PBS pH 7,2, NaCl 0.5M e Tween-20 0.01%). Lavadas com PBS-Tween-20 0.25%, incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1/1000 - SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA), lavadas e incubadas por mais 60-90 min com a Proteína G Rec conjugada com peroxidase (1/500 – Invitrogen). Por fim, as células foram lavadas e incubadas com substrato para a peroxidase (Tampão de Acetato 50 mM, pH 5.0) a 37°C por 30 min. Os focos/placas virais foram visualizadas sob luz branca.

**Transformação e extração do DNA plasmideal de bactérias.** Com o objetivo de obter-se maiores quantias de DNA, os plasmídeos construídos e extraídos de levedura foram utilizados para transformar células *Escherichia coli*, linhagem DH10B (Invitrogen) por eletroporação. As condições de eletroporação para cubetas de 1 mm foram: 2.75 kV, 99 usec,

5 pulsos, intervalo de 1 seg entra cada pulso (eletroporador ECM-830, BTX). As bactérias foram então distribuídas em placas de meio Luria Bertani (LB) sólido contendo cloranfenicol (20 mg/mL) e incubadas a 37°C durante 18-20 h. Colônias positivas foram confirmadas por PCR para a presença do plasmídeo recombinante e posteriormente foram cultivadas em 5 mL de meio LB com cloranfenicol (20 mg/mL) a 37°C sob agitação durante 16-20 h. Este pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio LB com o antibiótico de seleção e incubado a 37°C 16-20 h. Posteriormente, as células foram concentradas por centrifugação e o DNA plasmideal preparado utilizando-se o Kit Plasmid Midi (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

**Sequenciamento.** As construções plasmideais pBSC\_IBSP4-ncp#2, pBSC\_IBSP4-ncp#3, o vírus parental IBSP4-ncp e um dos vírus recuperados (CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2), foram submetidos ao sequenciamento completo do genoma. Os oligonucleotídeos utilizados para todos os sequenciamentos estão representados no Quadro 2. As reações de sequenciamento foram realizadas com o mix BigDye terminator 3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante e posteriormente os produtos desta reação foram resolvidos em um sequenciador ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As análises das sequências de nucleotídeos foram realizadas com *softwares* do pacote Lasergene® (DNASTAR Inc.) e uma sequência consenso de cada vírus foi gerada pelo programa SeqMan II (Lasergene®, DNASTAR Inc.).

**Avaliação da infectividade viral dos clones infecciosos.** Para avaliar a infectividade viral dos clones infecciosos construídos, os mesmos foram inoculados em cultivo celular por 10 passagens consecutivas. Para isso células MDBK (confluência de 90%) foram inoculadas com cada passagem dos vírus recuperados a uma m.o.i. de 0.5 em placas de 6 poços. Após 1 hora de incubação, o inóculo foi removido e substituído por meio fresco contendo 5% de soro equino. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. As monocamadas de

células foram tripsinizadas e ressuspensas com MEM contendo 5% de soro equino em lâminas de IFI, mantidas *overnight* a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, fixadas em acetona 50% e submetidas ao ensaio de IFI. Os sobrenadantes dos poços inoculados foram coletados e congelados a -80°C.

**Cinética de replicação dos vírus construídos.** Para determinar a dinâmica de replicação dos vírus construídos, células MDBK (confluência de 90%) foram inoculadas com os clones recuperados na passagem 5 (p5) (CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3) e com o vírus parental IBSP4-ncp com uma m.o.i. de 0.3, em placas de 24 poços. Após 1 hora de incubação a 37°C, o inóculo foi removido e a monocamada de células foi lavada três vezes com MEM. MEM contendo 5% de soro equino foi então adicionado e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Em diferentes períodos pós-inoculação a progênie viral foi coletada (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 e 72 h), congelada a -80°C e seus títulos virais quantificados por diluição seriada em placas de 24 poços e revelados por imunoperoxidase. O vírus IBSP4-ncp foi utilizado como controle em todos os ensaios.

**Ensaio de formação de focos virais.** Para avaliação do tamanho e da morfologia dos focos dos vírus construídos CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2, CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 e do vírus parental IBSP4-ncp, células MDBK (confluência de 90%) foram infectadas com diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) de cada vírus (p5) em teste em placas de 6 poços. Após 1 hora de adsorção a 37°C, o inóculo foi removido, e as células foram recobertas com meio MEM contendo 1% de agarose e 5% de soro equino, e posteriormente incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após três dias, as células foram fixadas com acetona 30% a 4°C em PBS pH 7,2 durante 13 min, secas sob temperatura ambiente por 24 h e submetidas ao ensaio de imunoperoxidase.

**Estabilidade dos plasmídeos transformados em células procariotas.** Os plasmídeos pBSC\_IBSP4-ncp#2 e pBSC\_IBSP4-ncp#3 transformados em células *E. coli*. DH10B (Invitrogen) foram submetidos a reação de PCR para amplificação completa do genoma e

adição da sequência para o promotor do bacteriófago T7. Foram então purificados com fenol/clorofórmio, precipitados, transcritos *in vitro* e o RNA resultante foi transfectado em células MDBK nas mesmas condições descritas anteriormente. Os vírus recuperados foram inoculados em placas de 6 poços semeadas com células MDBK. Foram realizadas cinco passagens consecutivas de três dias para avaliação da infectividade viral revelada por IFI.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção de um clone infeccioso do genoma da cepa de BVDV IBSP4-ncp utilizando a técnica de recombinação homóloga foi realizada com sucesso. Na estratégia de clonagem utilizou-se o vetor pBSC\_NADL\_HDR, que contém o clone infeccioso do vírus NADL. Para isto foi necessário apenas o uso de sítios de restrição para a enzima *Bam*HI, o que permitiu a retirada de praticamente toda a ORF do vírus NADL, restando apenas 325 nt da extremidade 5' da ORF e 836 nt da extremidade 3', além das duas UTRs. Esses nucleotídeos excedentes da ORF do NADL foram retirados pela levedura durante o processo de recombinação homóloga. Para a recombinação dos amplicons com as UTRs presentes no vetor, 25 nt terminais de cada UTR do vírus NADL foram introduzidos com os oligonucleotídeos utilizados para recombinação (Quadro 1) nos fragmentos 1 e 2 (Fig.1), nas suas extremidades 5' e 3', respectivamente. Assim, os fragmentos 1 e 2 continham 25 nt a mais em uma de suas extremidades para que houvesse a recombinação homóloga. Já o fragmento 2 foi produzido com uma sobreposição de 356 nt com o fragmento 1 e 373 nt com o fragmento 3, para a recombinação.

Um dos requisitos da recombinação homóloga em levedura é a presença de homologia suficiente nas extremidades dos fragmentos, ou do vetor a serem recombinados para recrutar a maquinaria de recombinação. Inicialmente, acreditava-se que uma homologia maior que 100 pb fosse necessária para induzir recombinação (Oldenburg et al. 1997). Contudo, vários

estudos tem demonstrado que uma homologia entre 15 – 50 pb já é suficiente para mediar o processo (Oldenburg et al. 1997, Gibson 2009). Por outro lado, não haveria restrições quanto ao tamanho máximo de homologia entre fragmentos a serem recombinados, como no caso do fragmento 2, com quase 400 nt de homologia com os fragmentos 1 e 3. Essas variações de tamanho de fragmentos introduzidos, de tamanho de homologia nas sequências e a possibilidade do uso de sítios de restrição nativos, tornam essa técnica bastante flexível, facilitando ou mesmo aumentando as possibilidades de estratégias de recombinação.

Antígenos de vírus infeccioso de dois clones (CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3), recuperados a partir do RNA transcrito e transfectado em células MDBK, foram detectados por imunofluorescência indireta (IFI) já na passagem zero (p0) (dados não mostrados). Para verificar se esses vírus mantinham a capacidade replicativa similar a do vírus parental IBSP4-ncp, foram realizadas dez passagens em cultivo celular, avaliando-se periodicamente por IFI. Em todas as passagens, aproximadamente 100% das células apresentavam-se positivas para antígenos virais aos três dias após a inoculação (Fig.3 C, D, E e F). Esses resultados demonstraram que os vírus obtidos a partir dos clones CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 são estáveis após sucessivos ciclos de replicação em cultivo celular. A eficiência de replicação também foi mantida ao longo dessas passagens, a julgar pelo percentual alto de células positivas na IFI detectadas a cada passagem.

A próxima etapa foi avaliar se os vírus obtidos a partir dos clones CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 mantinham a mesma cinética de replicação do vírus parental. O estudo de cinética revelou que os vírus recuperados de ambos os clones alcançaram seu pico máximo de replicação por volta de 48 h pós-inoculação, assim como o vírus parental (Fig.4). Por fim, foi avaliada a morfologia dos focos virais, por imunoperoxidase. Esses ensaios demonstraram que os vírus obtidos dos dois clones produziram focos com morfologia

e diâmetro indistinguíveis daqueles produzidos pelo vírus parental IBSP4-ncp (Fig. 5). Juntos, esses resultados demonstram que os vírus recuperados dos clones mantêm as características fenotípicas do vírus parental, com relação a eficiência de replicação em cultivo, morfologia e tamanho de focos infecciosos e cinética de replicação. Assim, a troca das UTRs por UTRs de uma cepa de mesmo genótipo aparentemente não afetou a capacidade replicativa dos vírus obtidos (Fig.2). Além de não influenciarem negativamente a replicação viral, nem alterarem o fenótipo viral em cultivo celular, essas UTRs ainda podem ser utilizadas como marcadores genéticos do clone infeccioso, pois confirmam que os vírus recuperados são realmente oriundos dos clones construídos e não possíveis contaminações com o vírus parental. As UTRs da cepa NADL foram utilizadas na construção dos clones porque a sequência completa da cepa IBSP4-ncp ainda não havia sido determinada. Meyers et al. (1996) já haviam descrito estratégia semelhante quando construíram o primeiro clone infeccioso de BVDV, em que parte das sequências terminais da cepa CP7 (que ainda não haviam sido determinadas) foram substituídas por parte das UTRs do vírus NADL (21-23 nt na 5'UTR e 33 nt na 3'UTR). Posteriormente, as extremidades da cepa parental foram determinadas e, assim, substituídas no clone sem qualquer alteração na replicação viral (Becher et al. 2000). A alta taxa de conservação entre as UTRs do BVDV ou até mesmo entre espécies diferentes de pestivírus, foi demonstrada de maneira prática num experimento conduzido por Hoffmann (2003). O autor construiu um vírus quimérico da cepa C do CSFV que continha a 5'UTR completa do BVDV, e que, a despeito da UTR quimérica de espécie diferente, vírus infecciosos e eficientes na replicação foram recuperados. Caso haja necessidade futura de substituição das UTRs heterólogas pelas originais, acredita-se que não haverá qualquer alteração na cinética viral, uma vez que suas sequências originais estarão sendo restituídas.

Como mencionado acima, não houve alterações nas características fenotípicas dos vírus obtidos a partir dos clones infecciosos. No entanto, a análise do sequenciamento revelou



a presença de alterações em alguns aminoácidos (aa) da proteína N<sup>pro</sup> (Quadro 3). Três trocas de nucleotídeos geraram mutações não sinônimas de mesmo grupo químico (Ala18Val, Val38Ala e Glu55Asp). Outras duas trocas de nt levaram à mutações não sinônimas de grupos químicos diferentes (Asn26Asp e Ala43Ser). Hipotetiza-se que essas mutações no terço inicial da sequência da N<sup>pro</sup> estão possivelmente relacionadas à substituição da UTR original, que teria gerado a necessidade de alterações na estrutura secundária do RNA genômico para permitir interações necessárias a eficiente replicação viral. Nesse sentido, acredita-se que a região 5' terminal da sequência da N<sup>pro</sup> possa ter um papel importante na replicação do BVDV (Behrens et al. 1998, Becher et al. 2000). Essa função não estaria relacionada à iniciação da tradução, mas sim com a replicação, o que demonstra a importância das sequências em *cis* contidas nessa região para a replicação do genoma (Myers et al. 2001) e justificam as alterações encontradas nessa região, que provavelmente ocorreram para que o vírus se adaptasse à nova UTR e mantivesse a eficiência de replicação similar ao vírus parental.

Uma última mutação não sinônima de mesmo grupo químico foi observada na proteína NS5B, no último códon da poliproteína (Ser3898Asn). O significado dessa mutação é incerto, pois o aa Serina foi substituído por um aa de mesma função química. Assim, essa alteração poderia tanto ser uma mutação aleatória quanto uma necessidade de adaptação, apesar dessa região do genoma não ter sido diretamente implicada na replicação viral, como a região da N<sup>pro</sup>. Além destas, nenhuma outra mutação foi encontrada ao longo do genoma, nem mesmo nas UTRs.

Por fim, os plasmídeos foram transformados em células *E. coli*, para a obtenção de uma maior quantidade de DNA e avaliação da estabilidade dos plasmídeos em células procariontas. Os dois clones já recuperados em levedura foram transcritos *in vitro* a partir do DNA plasmideal extraído de bactérias e transfectados em células MDBK. Depois de

recuperados, os vírus foram submetidos a cinco passagens consecutivas para avaliação da infectividade viral (Fig.3, G-H). As construções utilizando o vetor de baixo número de cópias pBSC\_HDR foram estáveis quando recuperadas a partir de *E. coli* por pelo menos cinco passagens consecutivas. Ou seja, os plasmídeos são estáveis em *E. coli* e são capazes de gerar transcritos que originam vírus viáveis. Desta forma, células bacterianas podem ser utilizadas para a amplificação dos plasmídeos originalmente construídos e amplificados em levedura.

Os clones construídos neste estudo são quiméricos em suas UTRs, porém mantêm a ORF do vírus IBSP4-ncp, dessa forma mantêm as suas características antigênicas e imunogênicas originais. A utilização de um isolado brasileiro justificou-se pela grande variabilidade genética e antigênica dos isolados do BVDV. Dessa forma, a obtenção destes clones representa um avanço importante na virologia animal do país, fornecendo um importante instrumento para o estudo e combate às infecções pelo BVDV. O uso dessa tecnologia permitirá uma gama de manipulações genéticas para estudos de biologia viral, estudos da patogenia do BVDV no que se refere a indução de persistência viral, investigação de mecanismos de escape do sistema imune, produção de vírus com fenótipos desejados como a atenuação e o potencial imunogênico, além de permitir a construção de vírus vacinais cuja resposta sorológica possa ser distinguida da resposta à infecção natural.

## REFERÊNCIAS

- Ansari I.H., Chen L.M., Liang D., Gil L.H., Zhong W. & Donis R.O. 2004. Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol.* 78(18):9612-9623.
- Becher P. Orlich M. & Thiel H.-J. 2000. Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* 74(17):7884-7894.
- Behrens S.-E., Grassmann C.W., Thiel H.-J., Meyers G. & Tautz N. 1998. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* 71(3):2364-2372.
- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Perfil genotípico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesq. Vet. Bras.* 31(8):649-655.

- Bolin S. R. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am.* 11(3):615-626.
- Bolin S.R. & Grooms D.L. 2004. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. North Am.* 20:51-68.
- Canal C.W., Strasser M., Hertig C., Masuda A. & Peterhans E. 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.
- Delmond I.F., Pierrugues O., Wispelaere de M., Guilbaud L., Gaubert S., Divéki Z., Godon C., Tepfer M. & Jacquemond M. 2004. A novel strategy for creating recombinant infectious RNA virus genomes. *J. Virol. Met.* 121:247-257.
- Dehan P., Couvreur B., Hamers C., Lewalle P., Thiry E., Kerkhofs P. & Pastoret P.-P. 2005. Point mutations in an infectious bovine viral diarrhoea virus type 2 cDNA transcript that yields an attenuated and protective viral progeny. *Vaccine.* 23:4236-4246.
- Donis R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am.* 11(3):393-423.
- Fan Z.C. & Wang H.H. 2009. Regeneration and characterization of a recombinant bovine viral diarrhoea virus and determination of its efficacy to cross the bovine placenta. *Virus Genes.* 38:129-135.
- Finley R.L. & Jr. Brent R. 1994. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *PNAS.* 91(26):12980-12984.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Roehe P.M., Alfieri A.A. & Pituco E.M. 2005. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25:125-134.
- Gibson D.G., Benders G.A., Axelrod K.C., Zaveri J., Algire M.A., Moodie M., Montague M.G., Venter J.C., Smith H.O. & Hutchinson C.A. 2008. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic genome. *PNAS.* 105(51):20404-20409.
- Gibson D.G. 2009. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 37(20):6984-6990.
- Gil L.H.V.G., Ansari I.H., Vassilev V.B., Liang D., Lai V.C.H., Zhong W., Hong Z., Dubovi E.J. & Donis R.O. 2006. The amino terminal domain of bovine viral diarrhoea virus N<sup>pro</sup> protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J. Virol.* 80(2):900-911.
- Henningson J.N., Topliff C.L., Gil L.H.V., Donis R.O., Steffen D.J., Charleston B., Eskridge K.M. & Kelling C. 2009. Effect of the viral protein N<sup>pro</sup> on virulence of bovine viral diarrhoea virus and induction of interferon type I in calves. *Am. J. Vet. Res.* 70(9):1117-1123.
- Hilton L., Moganeradj K., Zhang G., Chen Y.-H., Randall R.E., McCauley J.W. & Goodbourn S. 2006. The N<sup>pro</sup> product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding

- by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J. Virol.* 80(23):11723-11732.
- Hoffmann. A. 2003. Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhoea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR. *J. Virol. Met.* 114:77-90.
- Hokanson C.A., Dora E., Donahue B.A., Rivkin M., Finer M. & Mendez M.J. 2003. Hybrid yeast–bacteria cloning system used to capture and modify adenoviral and nonviral genomes. *Hum. Gene Therapy.* 14:329-339.
- Houe H., Lindberg A. & Moenning, V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:427–436.
- Kreutz L.C., Donis R.O., Gil L.H.V., Lima M., Hoffman A.N., Garcez D.C., Flores E.F. & Weiblen R. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(12):1459-1466.
- Kümmerer B.M. & Meyers G. 2000. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 74(1):390-400.
- Magkouras I., Mätzner P., Rümenapf T., Peterhans E. & Schweizer M. 2008. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E<sup>ms</sup> of pestiviruses. *J. General Virol.* 89:2501-2506.
- Marozsan A.J. & Arts E.J. 2003. Development of a yeast-based recombination cloning/system for the analysis of gene products from diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol. Met.* 111:111-120.
- Meyer C., von Freyburg M., Elbers K. & Meyers G. 2002. Recovery of a virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* 76(16):8494-8503.
- Meyers G., Tautz N., Becher P., Thiel H.-J. & Kümmerer B. M. 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70(12):8606-8613.
- Meyers G., Ege A., Fetzer C., von Freyburg M., Elbers K., Carr V., Prentice H., Charleston B. & Schürmann E.-M. 2007. Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E<sup>ms</sup> RNase and N<sup>pro</sup> protease. *J. Virol.* 81(7):3327-3338.
- McCurkin A.W., Littledike E.T., Cutlip R.C., Frank G.H., Coria M.F. & Bolin S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Can. J. Comp. Med.* 48:156-161.
- Moormann R.J.M., van Gennip H.G.P., Miedema G.K.W., Hulst M.M. & van Rijn P.A. 1996. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* 70(2):763-770.

- Myers T.M., Kolupaeva V.G., Mendez E., Baginski S.G., Frolov I., Hellen C.U.T. & Rice C.M. 2001. Efficient translation initiation is required for replication of bovine viral diarrhea virus subgenomic replicons. *J. Virol.* 75(9):4226-4238.
- Oldenburg K.R., Vo K.T., Michaelis S. & Paddon C. 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25(2):451-452.
- Polo S., Ketner G., Levis R. & Falgout B. Gary. 1997. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J. Virol.* 71(7):5366-5374.
- Puri B., Polo S., Hayes C.G. & Falgout B. 2000. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific, 74 strain. *Virus Genes.* 20(1):57-63.
- Qu L., MacMullan L.K. & Rice C.M. 2001. Isolation and Characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 75(22):10651-10662.
- Ridpath J.F. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* 72(1/2):17-30.
- Rasmussen T.B., Reimann I., Uttenthal A., Leifer I., Depner K., Schirmeier H. & Beer M. 2010. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Vet. Microbiol.* 142:13-17.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shanks R.M.Q., Kadouri D.E., MacEachran D.P. & O'Toole G.A. 2009. New yeast recombineering tools for bacteria. *Plasmid.* 62(2):88-97.
- Szymanski M.R., Fiebach A.R., Tratschin J.-D., Gut M., Ramanujam V.M., Gottipati K., Patel P., Ye M., Ruggli N. & Choi K.H. 2009. Zinc binding in pestivirus N<sup>pro</sup> is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation. *J. Mol. Biol.* 391:438-449.
- Tautz N., Thiel H.-J., Dubovi E.J. & Meyers G. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 68(5):3289-3297.
- Vassilev V.B., Collet M.S. & Donis R.O. 1997. Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J. Virol.* 71(1):471-478.
- Zemke J., König P., Mischkale K., Reimann I. & Beer M. 2010. Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. *Vet. Microbiol.* 142:69-80.

**Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na construção do clone de cDNA da cepa IBSP4-ncp**

Oligonucleotídeo	Sequência
BVDVqm 5'UTR_NADL_IBSP-4-F	<b>CTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATTGCAAAT</b> GAAC
BVDV-Osloss-4458R	TGAGGGGCAAGAGTATGCTGAC
BVDV1-4121F	ACYATMCCRAACTGGAGRCCAC
BVDV1-8893R	CATCTCATAGCCACATGGGCAC
BVDV-Osloss-8520F	TTGAAGCAGTYCAGACAATTGG
BVDVqm 3'UTR_NADL_IBSP-4-R	<b>ATTTATTTACAATATATACATTTTGTCTCAACTGCTGGCACCGA</b> CAG

As sequências homólogas para recombinação em levedura estão em negrito. Os oligonucleotídeos estão identificados de acordo com as sequências que amplificam e/ou possuem. <sup>a</sup>F- senso. <sup>b</sup>R- antisenso.

**Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos vírus e plasmídeos**

Oligonucleotídeo	Sequência
pBSC-T7-NADL-F <sup>a</sup>	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTTAATACGACTCACTATAGTATAC
NADL5'UTR-F	GTATACGAGAATTAGAAAAG
BVDV-Osloss-324 F	ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA
BVDV-Osloss-326 R <sup>b</sup>	TCAACTCCATGTGCCATGTAC
BVDV-Osloss-946F	AAAAGGGGAGRATGAAGATAAC
BVDV-Osloss-1406F	CCAACGCCATGARTGGAAC
BVDV-Osloss-2422R	CCTTGRAACACTTGGCCTCTC
BVDV-Osloss-2241F	GTATAAGACCAGATTGGTG
BVDV-Osloss-2837 F	CCAGATGGTTTGCCCTATAG
BVDV-Osloss-3495R	GTAGGGACTCAGCGAAG
BVDVV-Osloss-3447F	GACCTAGAGATCACTGACCACC
BVDV1-4121F	ACYATMCCRAACTGGAGRCCAC
BVDV-Osloss-4764F	GAGGAAGAAGTCTACGGCATGC
BVDV-Osloss-5124F	GATCTAGAACACCTAGGRTGGATC
BVDV-Osloss-5910F	GCAGAGTTAAAGTAGGAAAAG
BVDV-Osloss-6378F	GTCATAGGAAAATTCACAG
BVDV-Osloss-7455R	GAGCAGGGCATTCTCAGCAG
BVDV-Osloss-8166R	GGTGAACATTTTCAGTGC
BVDV-Osloss-8759F	GTTGTGACTGGACTCCTAG
BVDV1-8893R	CATCTCATAGCCACATGGGCAC
BVDV-Osloss-9312F	CATAAAAATAACCTTGAAG
BVDV-Osloss-10167R	GAAGAAACCAACTAGACAG
BVDV-Osloss-10842R	CTGAGTCCAGTACTTCTCC
BVDV-Osloss-11760R	CCTCTCTCTCCACTTAATC
BVDV-Osloss-11058F	CAACTGGGTGAAGCAGCAG
NADL-3'UTR-R	GGGGGCTGTTAGAGGTCTTC

Os oligonucleotídeos estão identificados de acordo com as sequências que amplificam e/ou possuem. <sup>a</sup>F-senso. <sup>b</sup>R- antisenso.

**Quadro 3. Análise das sequências do clone infeccioso construído e do vírus parental**

Região no genoma	Posição na ORF <sup>a</sup>	IBSP4-ncp parental		CI-pBSC_IBSP4-ncp#2	
		Nucleotídeo	Aminoácido	Nucleotídeo	Aminoácido
N <sup>pro</sup>	18	T	Ala <sup>b</sup>	C	Val <sup>b</sup>
N <sup>pro</sup>	26	C	Asn <sup>c</sup>	T	Asp <sup>c</sup>
N <sup>pro</sup>	38	G	Val <sup>b</sup>	A	Ala <sup>b</sup>
N <sup>pro</sup>	43	A	Ala <sup>c</sup>	G	Ser <sup>c</sup>
N <sup>pro</sup>	55	A	Glu <sup>b</sup>	T	Asp <sup>b</sup>
NS5B	3898	G	Ser <sup>b</sup>	A	Asn <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Posição na fase aberta de leitura (ORF) em códons.

<sup>b</sup> Aminoácidos de mesmo grupo químico.

<sup>c</sup> Aminoácidos de grupos químicos diferentes.



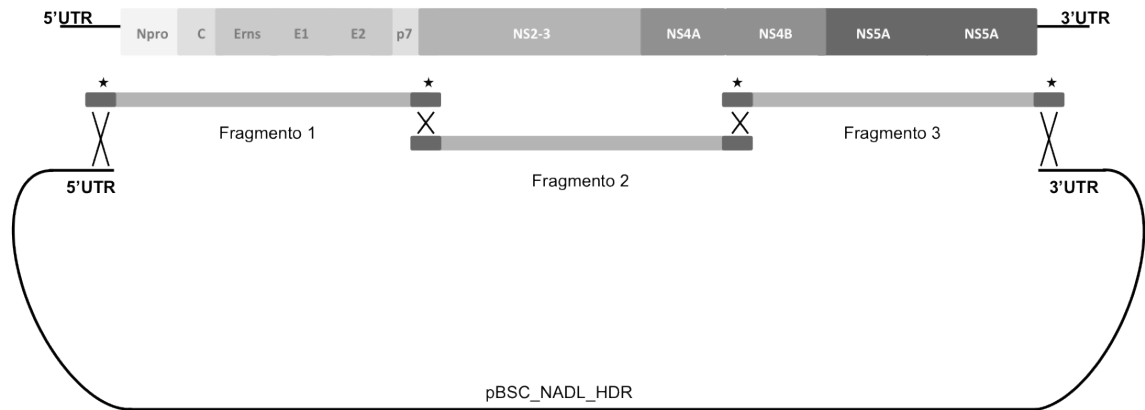


Fig.1. Representação esquemática da estratégia de construção do clone de cDNA do vírus IBSP4-ncp. Organização do genoma viral da cepa IBSP-4ncp, acima. Recombinação homóloga em levedura entre três produtos da PCR (Fragmentos 1, 2 e 3) e o vetor pBSC\_NADL\_HDR digerido pela enzima *Bam*HI. \*Seqüências homólogas para a recombinação em levedura.

**A**

CI-pBSC_IBSP4-ncp#2	TTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCACAAATGAACTTTTATACAAAA
CI-pBSC_IBSP4-ncp#3	TTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCACAAATGAACTTTTATACAAAA
IBSP4-ncp	CTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCACAAATGAACTTTTATACAAAA
NADL	TTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATCACAAATGAACTTTTATACAAAA

**B**

CI-pBSC_IBSP4-ncp#2	TGCTTATGGCAGCTGTCGGTGCCAGCAATTGAGACAAAATGTATATATTGTAAATAAATTAATCCA
CI-pBSC_IBSP4-ncp#3	TGCTTATGGCAGCTGTCGGTGCCAGCAATTGAGACAAAATGTATATATTGTAAATAAATTAATCCA
IBSP4-ncp	TGCTTATGGCAGCTGTCGGTGCCAGCAATTGAAACAAAATGTATATATTGTACATAAATCTGTATTT
NADL	TGCTCATGACGGCCGTCGGCGTCAGCAGCTGAGACAAAATGTATATATTGTAAATAAATTAATCCA

Fig.2. Confirmação da recombinação dos clones infecciosos por sequenciamento. (A) Sequência consenso parcial da região não traduzida 5'(UTR) e do início da fase aberta de leitura (ORF), demonstrando a recombinação entre a cepa NADL e IBSP4-ncp. (B) Sequência consenso parcial da região 3'UTR e do final da ORF, confirmando a recombinação entre a cepa NADL e IBSP4-ncp. Retângulo superior evidencia o códon de iniciação da tradução e o retângulo superior evidencia o códon de parada da tradução viral.

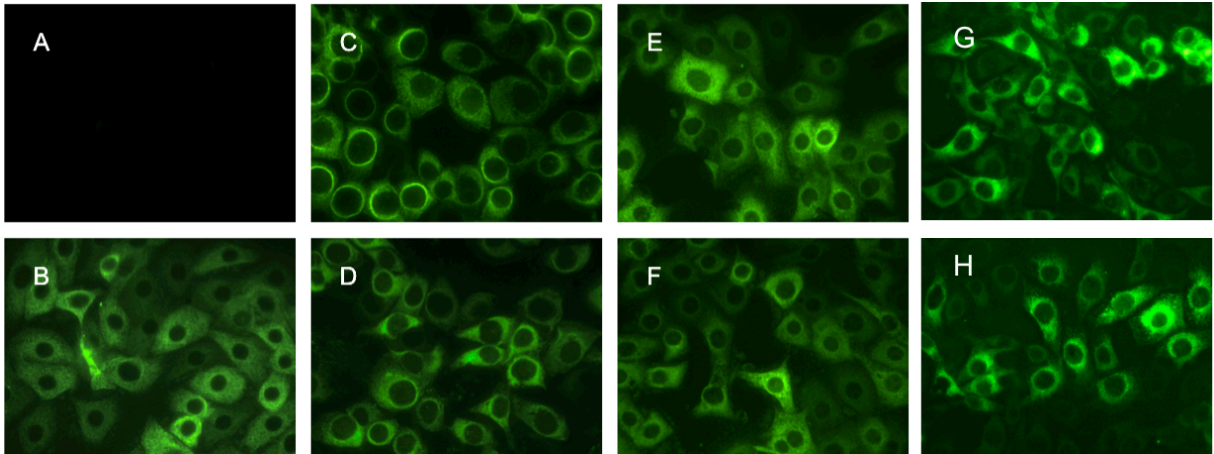


Fig.3. Infectividade viral dos vírus recuperados dos clones infecciosos por imunofluorescência indireta (IFI). Células MDBK inoculadas clones construídos CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 em diferentes passagens. (A) Controle negativo, células MDBK não infectadas. (B) controle positivo, células inoculadas com o vírus parental IBSP4-ncp. (C e E) Clone infeccioso CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 passagens 5 e 10 respectivamente. (D e F) Clone infeccioso CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 passagens 5 e 10, respectivamente (G e H). Os mesmos clones 2 e 3, respectivamente, recuperados a partir do DNA plasmideal extraídos de *E. coli* na passagem 5. Imagens coletadas em um aumento 630x.

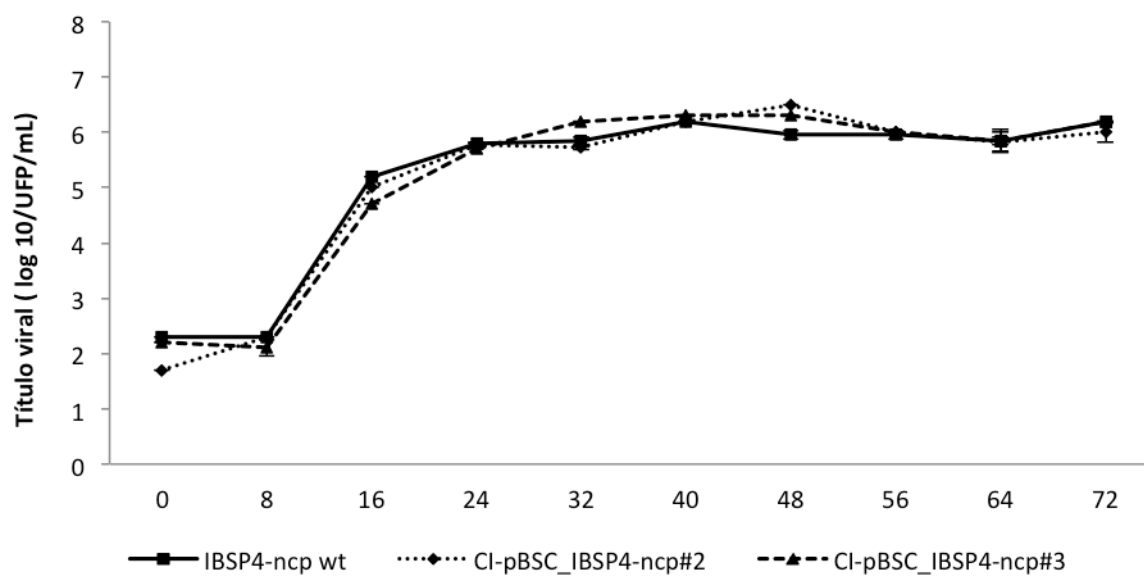


Fig.4. Curva de replicação dos vírus recuperados dos clones CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 e do vírus parental IBSP4-ncp. Células MDBK foram inoculadas com uma multiplicidade de infecção de 0,3. No tempos indicados em horas, os sobrenadantes foram coletados e os títulos virais quantificados por ensaio de placa e coloração de imunoperoxidase. Cada valor representa a média de dois experimentos independentes.

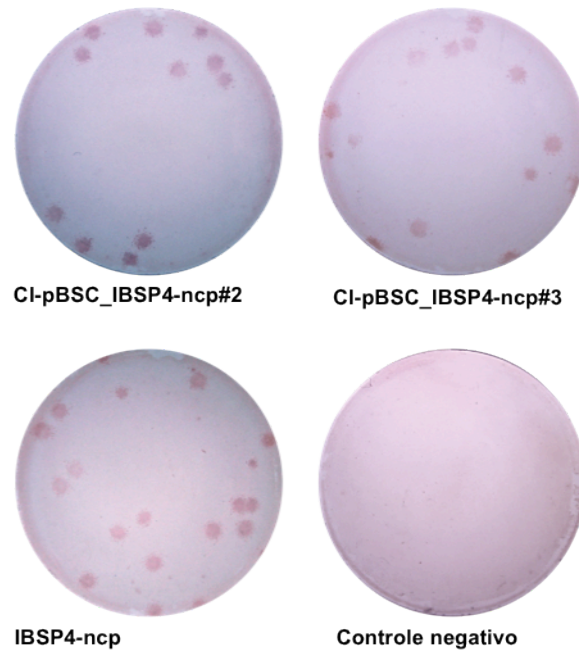


Fig.5. Morfologia de focos dos vírus recuperados dos clones CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e CI- pBSC\_IBSP4-ncp#3 comparadas ao vírus parental IBSP4-ncp. Monocamadas de MDBK foram inoculadas com diluições seriadas de cada vírus ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ), cobertas com agarose 1%, fixadas 72 horas após e reveladas pela coloração de imunoperoxidase.



## 4. CAPITULO 2

### **Inserção e expressão estável do gene da *Gaussia* luciferase no genoma do vírus da diarreia viral bovina**

Sandra Arenhart<sup>1</sup>, Eduardo F. Flores<sup>1\*</sup>, Rudi Weiblen<sup>1</sup> e Laura H.V.G. Gil<sup>2</sup>

(Artigo a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2012)

---

<sup>1</sup> Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, PE 50670-420, Brasil.

**ABSTRACT.-** Arenhart S., Gil L.H.V.G., Flores E.F. & Weiblen R. 2012. [**Stable insertion and expression of the *Gaussia* luciferase gene on the genome of bovine viral diarrhea virus**]. Inserção e expressão estável do gene da *Gaussia* luciferase no genoma do vírus da diarréia viral bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

The use of reverse genetics to manipulate bovine viral diarrhea virus (BVDV) genome has helped to understand many issues on the viral biology, including virus-host interactions and persistence. In order to develop studies on the pathogenesis of BVDV, a recombinant virus expressing the reporter gene *Gaussia* luciferase (Gluc, 555 base pair) was constructed out of a non-cytopathic isolate, inserting the Gluc gene between N<sup>pro</sup> and Core genes. To overcome possible problems concerning the instability of the recombinant viral genome, yeast homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* was performed. The recombinant virus was constructed using the infectious clone IBSP4-ncp in a low-copy vector. In brief, the vector was digested and the Gluc gene inserted between N<sup>pro</sup> and Core sequences. Along with the gene, a linker and the sequence for the Foot and Mouth Disease virus protease (FMDV2A<sup>pro</sup>) were introduced. Two recombinant clones were obtained expressing Gluc (IC-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 and #4). *In vitro* transcribed RNA from both clones were transfected in MDBK cells, resulting in replicative and infectious viruses. The kinetics of replication, focus size and morphology of the rescued viruses were similar to those of the parental virus, and were stable during 15 passages in cell culture. Similarly, reporter gene activity was also stable and constant during 15 passages. The reporter gene used in this study was correctly processed and most importantly, did not affect the replication ability of the parental virus. Therefore, these results indicate that it is possible to express genes up to 555bp



between N<sup>pro</sup> and Core proteins of the IBSP4-ncp virus. This ability, together with the ease of manipulating this clone, are promising towards the use of this clone in studies of virus biology and pathogenesis.

INDEX TERMS: BVDV, reverse genetics, heterologous gene, *Gaussia* luciferase, yeast homologous recombination.

**RESUMO.-** O uso da genética reversa para manipulação do genoma do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tem auxiliado no entendimento de vários aspectos da biologia do vírus, incluindo as interações com o hospedeiro e indução de persistência. No intuito de desenvolver estudos sobre a patogenia da infecção causada pelo biotipo não-citopático (ncp) do BVDV, um vírus recombinante expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase (Gluc, 555 pares de base) foi construído, inserindo-se o gene entre os genes das proteínas N<sup>pro</sup> e Core. Para superar possíveis problemas relacionados à instabilidade do genoma viral recombinante, utilizou-se a técnica de recombinação homóloga em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O vírus recombinante foi construído utilizando o clone infeccioso da cepa IBSP4-ncp em um vetor de baixo número de cópias. Resumidamente, o vetor foi digerido e o gene Gluc foi introduzido entre a sequência de N<sup>pro</sup> e Core. Juntamente com o gene introduziu-se uma sequência ligante e a sequência do gene da protease do vírus da Febre Aftosa (FMDV2A<sup>pro</sup>), utilizando os oligonucleotídeos planejados. Dois clones recombinantes expressando a Gluc foram obtidos (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e #4). A transfecção do RNA obtido pela transcrição desses clones *in vitro* em células MDBK resultou na replicação e produção de vírus infecciosos. Os vírus recuperados demonstraram cinética de replicação, morfologia e tamanho de placas semelhantes ao vírus parental, e foram estáveis após 15 passagens em cultivo celular. Da mesma forma, atividade do gene repórter também se manteve estável e

constante durante essas passagens. O gene repórter Gluc utilizado no presente trabalho foi corretamente processado, e mais importante, em nada alterou a cinética de replicação do vírus IBSP4. Portanto, esses resultados indicam que é possível expressar de forma estável genes com até 555 pb entre as proteínas Npro e Core do BVDV IBSP-4. Essa característica, aliada a facilidade de manipulação do clone, é promissora no sentido do uso desse clone para estudos de biologia e patogenia da infecção pelo BVDV.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BVDV, genética reversa, gene heterólogo, *Gaussia* luciferase, recombinação homóloga em levedura.

## INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno de bovinos, que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com outras duas espécies virais de importância veterinária: o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (Ridpath 2005). O BVDV é um vírus envelopado, esférico, entre 40 a 60 nm de diâmetro e possui genoma RNA fita simples polaridade positiva com aproximadamente 12,3 Kb. Possui uma região 5'UTR (região não traduzida), uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos e uma região 3'UTR (Donis 1995, Ridpath 2005). A poliproteína é traduzida via IRES (*internal ribosome entry site*) gerando 11 proteínas maduras funcionais: NH<sub>2</sub>-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>gns</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. O BVDV pode ser classificado em dois genótipos: 1 e 2 (Kümmerer & Meyers 2000). Ambos os genótipos podem ser divididos em dois biotipos: citopático (cp) e não citopático (ncp), de acordo com o efeito da replicação em cultivo celular. O biotipo cp é gerado a partir do ncp por deleções, duplicações, rearranjos genéticos, inserções de sequências celulares ou até mesmo por mutações em ponto que levam à clivagem

de NS2-3 em NS2 e NS3 (Tautz et al. 1994, Kümmerer & Meyers 2000, Ridpath 2005). Isolados ncp representam a grande maioria dos vírus na natureza e são os responsáveis por grande parte das infecções agudas e pelas infecções persistentes (Bolin & Grooms 2004). Vírus ncp são os principais responsáveis pelas perdas econômicas na pecuária bovina, causadas em grande parte pela forma reprodutiva da infecção. Dentre elas, a infecção fetal com o vírus ncp no primeiro terço gestacional frequentemente resulta no nascimento de bezerras imunotolerantes e persistentemente infectados (McClurkin et al. 1984). O *pool* de vírus BVDV ncp que replica nestes animais frequentemente da origem à vírus mutantes cp, que desencadeiam uma síndrome fatal conhecida como Doença das Mucosas (Tautz et al. 1994).

Com o uso da genética reversa diversos estudos tem sido realizados para o entendimento da patogenia, interação vírus/hospedeiro e a persistência da infecção pelo vírus ncp. A maioria destes estudos tem demonstrado a importância da proteína N<sup>pro</sup> na inibição da indução de interferon tipo I (IFN-I) *in vitro*, via indução da degradação proteossomal do fator regulatório do IFN (IRF-3) e que isto poderia ser um dos fatores de evasão viral ligados à indução de persistência viral (Gil et al. 2006, Hilton et al. 2006, Meyers et al. 2007, Szymanski et al. 2009). Assim como também a proteína E<sup>ms</sup>, que parece prevenir a indução de IFN em células não infectadas, por atuar nos RNAs de fita dupla liberados possivelmente pelas células já infectadas *in vitro* e, assim, esse poderia ser um mecanismo para manter o estado de imunotolerância em animais persistentemente infectados (Iqbal et al. 2004, Meyers et al. 2007, Magkouras et al. 2008). Apesar de todos estes estudos, ainda existem muitos aspectos não entendidos ou até mesmo ainda não definidos que necessitam de estudos *in vivo*. Henningson et al. (2009) demonstraram que apesar de vários trabalhos apontarem a N<sup>pro</sup> como inibidora da indução de IFN, foi observado que tanto o vírus recombinante deletado na N<sup>pro</sup> quanto o vírus original induziram IFN em bovinos jovens, contradizendo trabalhos prévios realizados *in vitro*.

Portanto, outros fatores ainda podem estar envolvidos na indução de tolerância e precisam ser esclarecidos.

No intuito de desenvolver estudos de patogenia da infecção persistente, entre outros, um BVDV recombinante expressando um gene heterólogo entre os genes N<sup>pro</sup> e Core foi construído. Essa estratégia foi descrita por Fan et al. (2008), porém problemas de instabilidade ocorreram na sua construção, em que o vírus recuperado deletava parte do gene heterólogo, somente sendo recuperado após o aparecimento de duas mutações adaptativas no gene inserido. Assim, para solucionar problemas de instabilidade de genomas virais construídos em bactérias, o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta-se como uma alternativa, ainda pouco utilizada, mas que mostrou-se eficaz na construção de clones infecciosos de alguns *Flavivirus* como DENV tipo 2 (Polo et al. 1997) e DENV tipo 1 (Puri et al. 2000), além da construção de genomas de outros agentes infecciosos não virais (Gibson et al. 2008, Benders et al. 2010).

O uso de genes repórteres é uma técnica amplamente utilizada em manipulações genéticas de *Flavivirus*, *Hepacivirus* e também alguns *Pestivirus* como o vírus da Peste Suína Clássica (Jones et al. 2007, Shustov et al. 2007, Suzuki 2008, Marukian et al. 2008, Doceul et al. 2008, Ruggli et al. 2009), mas ainda pouco utilizada no BVDV (Liang et al. 2009, Fan & Bird 2011). Constitui-se numa opção rápida e fácil para avaliar a replicação de um genoma viral, uma vez que há uma correlação da expressão do gene repórter e a expressão gênica e replicação viral. Além disso, genes repórteres constituem-se em uma ferramenta valiosa para estudos das funções das proteínas virais, estudos de patogenia, validação de estratégias de manipulação genética de vetores vacinais competentes, entre outros. Este artigo descreve uma estratégia estável, utilizando recombinação homóloga em levedura, para construção do vírus da diarreia viral bovina IBSP4-ncp recombinante expressando o gene heterólogo *Gaussia* luciferase entre os genes das proteínas N<sup>pro</sup> e Core. Com os resultados obtidos, demonstrou-se

a praticidade em manipular este genoma de BVDV *in vitro* e o seu potencial efetivo para uso em genética reversa de *Pestivirus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Cultivo de células e vírus.** Células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), livres de pestivírus, foram mantidas em meio MEM (*Minimal Essential Medium* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% soro equino, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina. A cepa não-citopática (ncp) do vírus IBSP4 foi obtida do clone infeccioso pBSC\_IBSP4-ncp#2 previamente construído (em preparação, Arenhart et al. 2012).

**Oligonucleotídeos e plasmídeos.** Os oligonucleotídeos para amplificação, construção do vírus recombinante (Quadro 1) e sequenciamento (manuscrito em preparação Arenhart et al. 2012) foram planejados com base na sequência da cepa IBSP4-ncp e do clone infeccioso pBSC\_NADL\_HDR. Adicionalmente, os oligonucleotídeos foram planejados para que os amplicons obtidos tivessem além das sequências necessárias para a amplificação, as regiões homólogas (~20-25 nt) para a recombinação homóloga em levedura. Todos os oligonucleotídeos foram adquiridos da Invitrogen. O plasmídeo pBSC\_IBSP4-ncp#2 contendo o genoma completo da cepa de IBSP4-ncp foi utilizado para a construção do vírus recombinante expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase. O gene repórter *Gaussia* luciferase foi obtido do plasmídeo pGluc-NS(WF10) gentilmente cedido pelo Dr. Daniel R. Perez (Department of Veterinary Medicine, University of Maryland, USA).

**Construção do vírus recombinante IBSP4-ncp expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase.** O vírus recombinante IBSP4-ncp expressando o gene *Gaussia* luciferase (Gluc) foi construído segundo a estratégia de Fan et al. (2008), que introduziram o gene eGFP2A entre as proteínas N<sup>pro</sup> e Core da cepa de BVDV SD1. Para a construção do vírus

recombinante quimérico, o gene Gluc foi introduzido entre os genes das proteínas N<sup>pro</sup> e Core do vírus IBSP4-ncp. Todas as manipulações do plasmídeo pBSC\_IBSP4-ncp#2, que contém o clone infeccioso do vírus IBSP4-ncp, foram realizadas utilizando a técnica de recombinação homóloga. Dois sítios de restrição para a enzima *SacI* localizados nas proteínas N<sup>pro</sup> e NS2 foram utilizados, permitindo a retirada de parte do genoma para a introdução do gene Gluc. Posteriormente, esse vetor digerido foi ligado por recombinação homóloga com três produtos de PCR. Cada um dos fragmentos continha sequências homólogas entre suas extremidades e as extremidades do vetor (Fig.1).

**Preparação do vetor para a recombinação.** O plasmídeo pBSC\_IBSP4-ncp#2 foi digerido retirando parte dos genes das proteínas N<sup>pro</sup>, NS2-3 e a sequência entre eles. Quatro µg do plasmídeo foram digeridas com a enzima *SacI* (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C durante 3 h, seguido da desfosforilação com 5U da enzima CIAP (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA) por 45 min a 37°C. O produto final foi resolvido em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo, e a banda com o tamanho específico foi excisada do gel e purificada com o Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

**Reação de PCR para a construção do vírus recombinante repórter.** A construção do vírus pBSC\_IBSP4-ncpGluc foi realizada por recombinação homóloga em levedura de três produtos de PCR contendo extremidades homólogas e o vetor pBSC\_IBSP4-ncp#2 digerido com *SacI*. O primeiro fragmento (561 pb) foi amplificado com os oligonucleotídeos BVDVqm 5'UTR\_NADL\_IBSP-4-F e IBSP-4/Npro\_linker\_Gluc-R a partir do plasmídeo pBSC\_IBSP4-ncp#2, continha parte da sequência parcial da N<sup>pro</sup> e uma sequência ligante de 21 nt (*linker*) N-terminais da proteína Core modificados e otimizados. O segundo fragmento (632 pb) amplificado a partir do plasmídeo pGluc-NS(WF10) com os oligonucleotídeos Linker\_Gluc-F e FMDV2A\_GLuc-R. Esse fragmento contém o gene Gluc (555 pb), a

sequência ligante acima citada e a sequência da protease 2A<sup>pro</sup> do vírus FMDV. O terceiro fragmento (3.614 pb) foi amplificado também a partir do pBSC\_IBSP4-ncp#2 com os oligonucleotídeos FMDV2A\_IBSP4/Core-F e BVDV-Osloss-4458R contendo parte da sequência de FMDV2A<sup>pro</sup> e a sequência da cepa IBSP4-ncp que compreende desde o gene da proteína Core até parte do gene da proteína NS2-3. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação desses fragmentos estão apresentados no Quadro 1.

Para 50µl de reação de PCR foi utilizado 1X do tampão KlenTaq-LA *polymerase* (Clontech), 1,3% DMSO, 0.4 M betaina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* (Clontech), 20 pmol dos oligonucleotídeos específicos e aproximadamente 50 ng de cDNA molde. As condições de PCR foram: 5 min a 95°C para desnaturações iniciais e ativação da polimerase, seguidas de 35 ciclos, cada ciclo composto de 30 seg de desnaturação a 95°C, 30 seg de anelamento a 52°C, 1 min de extensão para cada 1.000 pb a 72°C, e 10 min de extensão final a 72°C.

**Transformação da levedura e recombinação.** Os três fragmentos de PCR contendo os genes do vírus IBSP4-ncp e o gene repórter Gluc, o vetor pBSC-IBSP4-ncp#2 digerido com a enzima *SacI* foram introduzidos em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa RFY206 (MATa *his3Δ200 leu2-3 lys2Δ201 ura3-52 trp1Δ::hisG*) (Finley & Brent 1994), pela transformação com acetato de lítio (Sambrook & Russel 2001). Para isto, as leveduras foram amplificadas em meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose* – 20 g de peptona, 10 g de extrato de levedura, 20 g de glucose, ddH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L), a 30°C por 16h. No dia seguinte, meio YPD foi inoculado com a levedura em uma densidade óptica (DO) de 0,1, e posteriormente cultivado a 30°C até uma DO de 0,55. Em seguida, as leveduras foram concentradas por centrifugação, lavadas e transformadas. Após a transformação, as leveduras foram plaqueadas em placas de YNB (*Yeast Nitrogen Base* -6,7 g, *Yeast nitrogen base w/o amino acids, w/ ammonium sulfate* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA, 20 g glucose, 1:10 V/V solução de aminoácidos

10X – *Yeast synthetic drop-out medium without tryptophan* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA) sólido na ausência do aminoácido triptofano (trp) e mantidas a 30°C por até três dias.

**Extração de DNA plasmideal da levedura e confirmação dos clones.** Cinco colônias positivas para a recombinação entre todos os fragmentos de PCR e para vetor foram cultivadas em 20 mL de meio YNB líquido, na ausência do trp, por 18-24 h à 30°C. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas com ddH<sub>2</sub>O e ressuspendidas em 400 µL de tampão SCE (1 M Sorbitol, 100 mM NaAc e 60 mM EDTA). Em seguida, foram adicionados 4 µL de zimolase (200 mg/mL) e 2 µL de β-mercaptoetanol. As células foram incubadas por 1 h e depois concentradas por centrifugação. A extração do DNA plasmideal foi prosseguida com o Kit QIAprep Spin MiniPrep (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo recomendações do fabricante. A construção foi previamente confirmada por PCR com um par de oligonucleotídeos específicos para amplificar um produto contendo o gene introduzido (757F- GGAGAGTAACTGGTAGTGA e 1137R- GTCACGCAAGAACTAGAG). As condições de PCR foram as mesmas descritas anteriormente e a identidade do produto foi confirmada por sequenciamento. Posteriormente, os plasmídeos confirmados foram amplificados em levedura e extraídos utilizando-se o Kit Plasmid Midi (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

**Caracterização *in vitro* dos vírus recombinantes construídos.** Para a caracterização dos vírus construídos, RNA sintetizado *in vitro* da cada clone foram introduzidos em células eucarióticas por eletroporação. A replicação viral foi avaliada por ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) e imunoperoxidase (IPX). A expressão do gene repórter foi avaliada pela atividade da *Gaussia* luciferase medida em luminômetro. Todos os vírus recuperados pelo sistema de genética reversa foram amplificados, clarificados por centrifugação e estocados a -80°C, e posteriormente caracterizados quanto a seu perfil



genético e fenotípico na passagem cinco (p5).

**PCR do genoma completo e transcrição *in vitro*.** A amplificação completa do genoma viral para a transcrição *in vitro* foi realizada em uma reação de 50  $\mu$ L utilizando a enzima KlenTaq-LA (Clontech). A reação foi composta de 100 ng de DNA plasmideal de levedura, 1X do tampão KlenTaq-LA (Clontech), 1,3% Dimetil-sulfóxido (DMSO), 0,4 M betaina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* e 20 pmol de oligonucleotídeos específicos (pBSC-T7-NADL-F e NADL-3'UTR-R). Esses oligonucleotídeos se alinham nas extremidades 5'-UTR e 3'UTR do genoma NADL, respectivamente. O oligonucleotídeo pBSC-T7-NADL-F contém a sequência do promotor para RNA polimerase de bacteriófago T7, o que permite a transcrição *in vitro* do produto de PCR amplificado por este par de oligonucleotídeos. As condições de amplificação foram: 4 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 32 ciclos de 1 min de desnaturação a 93°C, 1 min de anelamento a 58°C, 13 min de extensão a 72°C com acréscimos de 10 seg a cada ciclo e 20 min finais de extensão a 72°C. O produto de PCR contendo a sequência completa do genoma viral possui na região 5' terminal a sequência para o promotor bacteriófago T7, o qual foi inserido através do oligonucleotídeo utilizado para a amplificação. Após purificação com fenol- clorofórmio e precipitação com etanol a transcrição *in vitro* foi realizada utilizando-se o kit T7 MEGAscript (Ambion) conforme instruções do fabricante.

**Transfecção do RNA viral em células MDBK por eletroporação.** Para a eletroporação de células MDBK foram utilizados: 20  $\mu$ g do RNA transcrito *in vitro* e  $8 \times 10^6$  células MDBK suspensas em tampão *Cytomix* (Ansari et al. 2004). A eletroporação foi realizada em cubetas de 4mm, seguindo as seguintes condições: 900V, 99 mseg, 10 pulsos, 1 seg de intervalo entre os pulsos (eletroporador ECM-830, BTX) (Lin Qu et al. 2001). Resumidamente, as células foram individualizadas com tripsina 0,02% por 5 min, lavadas uma vez com meio MEM (sem suplementos e antibióticos), centrifugadas e lavadas

novamente duas vezes com PBS pH 7,2/DEPC (dietilpirocarbonato) a 4°C e ressuspensas em 400 µL *Cytomix* 1x pH 7,6, 24 µL de ATP 0,1 M e 60 µL de Glutathione 0,1 M. Após a eletroporação, as células foram mantidas em repouso a temperatura ambiente por 10 min antes de serem ressuspensas em meio MEM completo 5% de soro equino e distribuídas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>.

**Ensaio de imunofluorescência indireta e de imunoperoxidase.** As células eletroporadas com o RNA viral foram monitoradas nos dias 1–5 após eletroporação, por imunofluorescência indireta, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para BVDV (Kreutz et al. 2000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC [SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA]) diluído 1:100 em PBS pH 7,2. A microscopia de imunofluorescência indireta foi realizada utilizando-se o microscópio Leica DMI 4000B.

Para a detecção de antígenos virais por imunofluorescência indireta, células MDBK transfectadas e/ou inoculadas foram cultivadas, fixadas em solução acetona 50% (em PBS pH 7,2) por 10 min a - 20°C. Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 1 h com os anticorpos primários, lavadas três vezes com PBS pH 7,2 e três vezes com ddH<sub>2</sub>O, secadas à temperatura ambiente. Após incubação a 37°C por 1 h com o anticorpo secundário, as células foram lavadas, secadas e montadas para leitura com glicerol (50% em PBS) e lamínula de vidro. Para a detecção de antígenos virais por imunoperoxidase, células MDBK inoculadas, foram cultivadas, fixadas em solução acetona 30% (em PBS pH 7,2) por 13 min a 4°C e secadas ao ar durante 24 h. As células foram então lavadas com PBS-Tween-20 0.25%, incubadas a 37°C por 60-90 min com anticorpo monoclonal contra BVDV (descrito no item anterior) diluído 1:2 em Tampão de Ligação (PBS pH 7,2, NaCl 0,5 M e Tween-20 0.01%). Lavadas com PBS-Tween-20 0.25%, incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1/1000 - SIGMA-ALDRICH, St Louis, MA, USA), lavadas e incubadas por mais

60-90 min com a Proteína G Rec conjugada com peroxidase (1/500 – Invitrogen). Por fim, as células foram lavadas e incubadas com substrato para a peroxidase (Tampão de Acetato 50mM, pH 5,0) a 37°C por 30 min. Os focos/placas virais foram visualizadas sob luz branca.

**Teste de atividade do gene repórter *Gaussia* luciferase.** A expressão e atividade do gene repórter foi detectada através do teste de atividade da enzima *Gaussia* luciferase. Para a o teste de atividade, células MDBK transfectadas com o RNA transcrito *in vitro* e as passagens realizadas com cada clone foram utilizadas. Para o teste foi utilizado o BioLux *Gaussia* luciferase Assay Kit (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA). Resumidamente, utilizou-se 10 µL do sobrenadante de cada amostra, 50 µL do tampão 1X BioLux já acrescido o substrato 100X, conforme instruções do fabricante. A atividade da luciferase foi mensurada usando o luminômetro Mithras LB 940 (Berthold).

**Transformação e extração do DNA plasmideal de bactérias.** Com o objetivo de obter-se maiores quantias de DNA, os plasmídeos construídos e extraídos de levedura foram utilizados para transformar células *Escherichia coli*, linhagem DH10B (Invitrogen) por eletroporação. As condições de eletroporação para cubetas de 1 mm foram: 2.75 kV, 99 usec, 5 pulsos, intervalo de 1 seg entra cada pulso (eletroporador ECM-830, BTX). As bactérias foram então distribuídas em placas de meio Luria Bertani (LB) sólido contendo cloranfenicol (20 mg/mL) e incubadas a 37°C durante 18-20 h. Colônias positivas foram confirmadas por PCR para a presença do plasmídeo recombinante e posteriormente foram amplificadas em 5 mL de meio LB com cloranfenicol (20 mg / mL) a 37°C sob agitação durante 16-20 h. Este pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio LB com o antibiótico de seleção e incubado a 37°C 16-20 h. Posteriormente, as células foram concentradas por centrifugação e o DNA plasmideal preparado utilizando-se o Kit Plasmid Midi (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

**Extração do RNA viral, transcrição reversa e PCR.** O RNA viral genômico foi extraído do sobrenadante das amostras com o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit/QIAamp MiniElute Vírus Spin (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, 200  $\mu$ l de sobrenadante de células infectadas foram tratados sob condições de desnaturação para inativar RNAses e assegurar o isolamento de RNA viral intacto, em seguida carregado em coluna de purificação. Após a ligação do RNA à membrana de sílica-gel, os contaminantes foram removidos através de duas lavagens por dois tampões de lavagem diferentes. O RNA foi eluído da coluna com uma solução aquosa livre de RNAses e armazenado - 80°C. A transcrição reversa a partir do RNA viral previamente extraído foi realizada utilizando a enzima Superscript III Reverse Transcriptase 200 U/ $\mu$ L (Invitrogen), os oligonucleotídeos antisense específicos para cada um dos três fragmentos e o inibidor de RNase - RNAaseOUT 40 U/ $\mu$ L (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante (Invitrogen), tendo como volume de reação 20  $\mu$ L. As condições de PCR foram semelhantes aquelas descritas anteriormente.

**Sequenciamento.** As regiões recombinadas correspondentes ao gene repórter das construções pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4 foram inicialmente sequenciadas para confirmação. Posteriormente o clone infeccioso parental CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2, os plasmídeos completos e um vírus recuperado (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3) foram submetidos ao sequenciamento completo do genoma. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit BigDye terminator 3.1 cycle sequencing (Applied Biosystem) de acordo com instruções do fabricante, posteriormente os produtos desta reação foram resolvidos no sequenciador ABI 3100 Genética Analyzer (Applied Biosystems). As análises das sequências foram realizadas com programas do pacote Lasergene® (DNASTAR Inc.) e uma sequência consenso de cada amostra foi gerada pelo programa SeqMan II (Lasergene®, DNASTAR Inc.).

**Avaliação da infectividade dos vírus construídos e da estabilidade do gene repórter.** Para avaliar a infectividade dos vírus obtidos a partir dos clones recombinantes expressando o gene repórter Gluc, os vírus recuperados cada clone foram submetidos a 15 passagens consecutivas em células MDBK. Nas diferentes passagens, as células foram submetidas a IFI e os sobrenadantes foram submetidos ao teste de atividade da *Gaussia* luciferase, para avaliação da estabilidade e funcionalidade do gene repórter.

**Cinética de replicação dos vírus recombinantes e da atividade da *Gaussia* luciferase.** Para determinar a eficiência de replicação dos vírus construídos, células MDBK (confluência de 90%) foram inoculadas em duplicata com os vírus recuperados (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4) e com o clone infeccioso parental CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 com uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,3 em placas de 24 poços. Após 1 hora de incubação a 37°C, o inóculo foi removido e a monocamada de células foi lavada três vezes com MEM. MEM contendo 5% de soro equino foi então adicionado e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Em diferentes períodos pós-inoculação a progênie viral foi coletada (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 e 72 h) e congelada a -80°C. Os seus títulos virais foram posteriormente quantificados por diluição seriada em placas de 24 poços por ensaio de IPX. O vírus CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 foi utilizado como controle em todos os ensaios. Para avaliação da curva de atividade/expressão da enzima *Gaussia* luciferase foram utilizados os mesmos sobrenadantes colhidos em diferentes períodos pós-inoculação da curva de replicação dos vírus recombinantes.

**Ensaio de formação de focos virais.** Para avaliação do tamanho e morfologia de focos infecciosos dos vírus construídos CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2, CI-pBSC\_IBSP4-ncp#3 e do vírus parental CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2, células MDBK (confluência de 90%) foram infectadas com diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) de cada vírus em teste em placas de 6 poços. Após 1 h de adsorção a 37°C, o inóculo foi removido, e as células foram recobertas com meio MEM

contendo 1% de agarose e 5% de soro equino, e posteriormente incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 dias, as células foram fixadas com acetona 30% durante 13 min, secadas em temperatura ambiente por 24 h e submetidas ao ensaio de IPX.

**Estabilidade dos plasmídeos em células *E. coli*.** Os plasmídeos pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4 transformados em células *E. coli*. DH10B foram submetidos a reação de PCR para amplificação completa do genoma e adição da sequência para o promotor do bacteriófago T7. Foram então purificados com fenol/clorofórmio, precipitados, transcritos *in vitro* e o RNA resultante foi transfectado em células MDBK nas mesmas condições descritas anteriormente. Os vírus recuperados foram inoculados em placas de 6 cavidades semeadas com células MDBK. Foram realizadas cinco passagens consecutivas de três dias para avaliação da infectividade viral revelada pelo ensaio de IFI e para testar a atividade de enzima *Gaussia* luciferase a cada passagem viral.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para construir um BVDV recombinante infeccioso, utilizou-se a estratégia de recombinação homóloga em levedura, utilizando um vetor de transferência de baixo número de cópias. Dois clones (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4) foram construídos com o gene repórter *Gaussia* luciferase. Vírus obtidos de ambos os clones foram recuperados e se mantiveram estáveis por 15 passagens consecutivas em cultivo celular.

### **Construção dos clones recombinantes expressando o gene *Gaussia* luciferase.**

A *Gaussia* luciferase é a menor luciferase conhecida (185 aa e 19 KDa), clonada a partir do *Copepode* marinho *Gaussia princeps*, é naturalmente secretada e emite grandes quantidades de luz, o que facilita a sua detecção (Tannous et al. 2004). Esse gene possui ainda a vantagem de ser pequeno (555pb), portanto poderia causar uma menor alteração na estrutura secundária do RNA genômico viral e ser, assim, mais estável. Outra característica importante

desta luciferase é a sua estabilidade em cultivo celular depois de secretada, resistente à variações de pH e temperatura, podendo também ser estocada por longos períodos (Tannous et al. 2004, Roda et al. 2009). O local de inserção do gene foi anteriormente descrito com sucesso por Fan et al. (2008). Porém, na sua construção o vírus ncp SD-1 deletava parte do gene inserido (eGFP2A) e somente pode ser recuperado após o aparecimento de duas mutações adaptativas (A1625G e A1626G) no gene heterólogo, que foram posteriormente introduzidas para confirmar sua necessidade na estabilidade estrutural do genoma viral com o gene inserido. Em nossa estratégia, a construção do vírus recombinante pBSC\_IBSP4-ncpGluc foi realizada no sistema eucarioto de levedura. Para fazer isto, foram necessários três produtos de PCR mais o plasmídeo contendo o clone infeccioso IBSP4-ncp (Fig.1). Primeiramente, o plasmídeo pBSC\_IBSP4-ncp#2 foi digerido utilizando a enzima *SacI* em dois sítios de restrição nativos para a retirada da sequência entre parte de N<sup>pro</sup> e parte da NS2-3, depois foi recombinado a três fragmentos de PCR. O primeiro fragmento (555 pb) reconstruiu a proteína N<sup>pro</sup> completa, continha parte da sequência 5'UTR na extremidade 5' para a recombinação e introduziu a sequência ligante na sua porção 3' terminal. Esta sequência foi construída para a clivagem correta do gene repórter entre N<sup>pro</sup> e Gluc, por a proteína N<sup>pro</sup> ter sua atividade de autoprotease (protease de cisteína semelhante à papaína) C-terminal entre seu último aminoácido cisteína e o primeiro aa da proteína Core, uma serina (Stark et al. 1993, Rümenapf et al. 1998). A sequência ligante consistiu-se de 21 nt com seus códons modificados e otimizados para recombinação, mas com a mesma codificação dos sete primeiros aa da proteína Core. O segundo fragmento (631 pb) continha também a sequência ligante na sua extremidade 5', todo o gene Gluc (555 pb) e no 3'terminal a sequência (51 nt) da protease 2A<sup>pro</sup> do vírus da Febre Aftosa (FMDV). FMDV2A<sup>pro</sup> também é uma autoprotease, porém sua clivagem é N-terminal e atuando em *cis*, não necessitando de nenhuma sequência que não a sua própria (Ryan & Drew 1994). Com a ação destas duas

autoproteases o gene repórter pode ser eficientemente liberado da poliproteína e posteriormente secretado das células por uma sinalização própria. Parte da sequência da protease 2A<sup>pro</sup> foi também introduzida no fragmento 3, na extremidade 5' para a recombinação. O restante do fragmento 3 (3.614 pb) continha a sequência viral de Core até parte de NS2-3, para reconstrução da parte retirada pela digestão do plasmídeo.

Depois da recombinação em levedura, o inserto foi confirmado por PCR (Fig.2) e sequenciamento (dados não mostrados). Em seguida, o DNA plasmídeo de três clones foi amplificado em levedura, extraído e submetido a uma reação de PCR do genoma completo e adição da sequência para o promotor da RNA polimerase T7. O amplicons foram purificados, transcritos *in vitro* e os RNAs obtidos foram transfectados em células MDBK para avaliação da infectividade. Ambos foram infectivos como demonstrado por IFI e pela atividade da *Gaussia* na passagem zero (p0) (dados não mostrados). Os vírus recuperados dos dois clones foram inoculados em células MDBK por 15 passagens consecutivas de três dias para avaliação da infectividade viral (Fig.3) e atividade do gene repórter Gluc (Fig.4). Vírus dos dois clones demonstraram sua infectividade demonstrando uma infecção de aproximadamente 100% (Fig.3) das células infectadas e uma atividade constante e estável da Gluc nestas mesmas passagens (Fig.4), com uma aumento da atividade ao redor de 450.000 vezes em relação ao controle negativo (1.500 em média).

#### **Estabilidade dos vírus recombinantes expressando o gene repórter Gluc.**

Para verificar se o gene repórter estaria interferindo na replicação dos vírus recuperados dos clones, avaliou-se a cinética de replicação, utilizando uma m.o.i. de 0,3 (Fig.5A). Nenhuma alteração foi observada na curva de replicação. O pico de amplificação ocorreu ao redor de 48 h pós-inoculação, depois se manteve num platô de replicação característico de vírus ncp, assim como para o vírus IBSP4-ncp parental.



Esses mesmos vírus foram utilizados para avaliar a curva de atividade da Gluc conforme a replicação dos clones (Fig.5B). Dezesesseis horas pós-inoculação, a atividade da Gluc foi inicialmente observada (ao redor de 15.000) e coincidindo com o primeiro pico de replicação observado na curva de replicação. Após as 16 h, a atividade da Gluc foi crescente e tem seu pico às 72 h (média de 415.000), não correlacionando com o pico viral às 48 h. Isso se deve provavelmente ao fato da Gluc ser secretada no sobrenadante do cultivo celular, acumular-se e manter-se estável. Assim, a cada mensuração a sua atividade se mostrava aumentada. Às 72 h pós-inoculação, a curva de replicação apresentou uma sensível diminuição no título viral para ambos os clones, interessante nessas mesmas amostras a atividade de Gluc tem um aumento ao redor 100.000 às 64 h (ao redor de 310.000). Possivelmente isso ocorreu devido ao estresse apresentado pelas células, o que levou à diminuição no título viral e ao aumento na atividade de Gluc. Esse aumento da atividade da Gluc foi observado durante a realização dos experimentos quando as células MDBK demonstravam sinais de estresse (vacuolização). Porém, isso em nada interferiu na replicação dos vírus/clones ou na atividade da Gluc nas passagens seguintes.

Depois avaliou-se a morfologia de focos virais dos clones, por ensaio de placa (Fig.6). A introdução do gene repórter Gluc aparentemente não interferiu no fenótipo dos focos virais do vírus IBSP4-ncp. Provavelmente, o gene inserido não alterou significativamente a estrutura secundária do genoma viral, mantendo-o estável, sem comprometimento da replicação ou do processamento das proteínas. Assim, o uso deste vírus como vetor ou mesmo na construção de vírus quiméricos com finalidade vacinal, permitiria com segurança a introdução de um gene de até 555 pb entre os genes da N<sup>pro</sup> e Core. Como caracterização final, os plasmídeos construídos em levedura foram transformados em células *E. coli* para se obter uma maior quantidade de DNA e verificar sua estabilidade em células procariotas. Os mesmos dois clones recuperados em levedura foram transcritos *in vitro* a partir do DNA

plasmideal extraído de bactérias e transfectados em células MDBK. Depois de recuperados, os vírus foram submetidos a cinco passagens em cultivo celular para avaliação da infectividade viral (Fig.7A) e da atividade de Gluc (Fig.7B). As construções dos vírus recombinantes expressando o gene repórter recuperados a partir do DNA amplificado em bactéria foram estáveis quando recuperados em *E. coli* por pelo menos cinco passagens, replicando eficientemente e mantendo a atividade do gene repórter em níveis semelhantes aqueles dos vírus recuperados em levedura. Conclui-se que as construções contendo o gene repórter são estáveis em *E. coli*, podendo ser amplificadas sem prejuízo neste hospedeiro. O uso do sistema procarioto permite a obtenção de grandes quantidades de DNA plasmideal, com melhor qualidade para manipulação, facilitando o uso em grande escala, no caso de utilização do vírus como vetor vacinal ou vírus vacinal quimérico.

Como demonstrado pelos resultados, não houve alterações nas características fenotípicas dos dois vírus recombinantes. No entanto, o sequenciamento do genoma do vírus IBSP4-ncpGluc#3 revelou mutações em nove nucleotídeos, porém somente em uma (NS2) isso ocasionou troca de aminoácidos, mas por outro de mesmo grupo químico (Ser1187Pro). Todas as outras mutações foram silenciosas e distribuídas ao longo do genoma: uma em E2, duas em NS3, duas em NS4B e três em NS5A. Nenhuma mutação foi observada no gene inserido ou mesmo na sequência ligante ou na FMDV2A<sup>pro</sup>. Possivelmente as mutações ocorreram para adaptação estrutural do genoma em termos de estrutura secundária ao gene inserido, tornando possível a estabilidade de ambos (inserto e vírus) além do que, não interferiram na capacidade replicativa do vírus IBSP4-ncp.

Nessa estratégia de construção, o gene repórter Gluc apresentava 7 aa N-terminais e 16 aa C-terminais heterólogos em sua proteína após o processamento. Porém, pelos resultados obtidos, não houve alterações em seu processamento ou mesmo em sua atividade enzimática, da mesma forma que em outras estratégias em que Gluc também apresentava 16 aa C-

terminais a mais. Assim como taxas de atividade também foram semelhantes à construções utilizando genomas repórteres do vírus da Hepatite C (HCV) (Jones et al. 2007, Dentzer et al. 2009). A proteína viral Core também ganhou também uma prolina N-terminal extra como resultado da autoclivagem de FMDV2A<sup>pro</sup> e diferentemente do que foi suspeitado anteriormente (Fan & Bird 2008, Fan et al. 2008) que poderia causar alguma mudança na replicação viral, nenhuma alteração foi observada em nossos dois vírus recombinantes recuperados. Portanto, concluiu-se que esse vírus recombinante pode ser útil para análises quantitativas e funcionais do genoma do BVDV. Essas análises são facilitadas pela mensuração da atividade da enzima Gluc liberada no sobrenadante celular. No entanto, ainda é desconhecido se o gene inserido altera as propriedades do vírus como patógeno. Essa questão só poderá ser respondida por infecções experimentais com o vírus parental e o vírus repórter.

## REFERÊNCIAS

- Ansari I.H., Chen L.M., Liang D., Gil L.H., Zhong W. & Donis R.O. 2004. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol.* 78(18):9612-9623.
- Benders G.A., Noskov V.N., Denisova E.A., Lartigue C., Gibson D.G., Garcia N.A., Chuang R.-Y., Carrera W., Moodie M., Algire M.A., Phan Q., Alperovich N., Vashee S., Merryman C., Venter J.C., Smith H.O., Glass J.I. & Hutchinson C.A. 2010. Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Res.* 38(8):2558-2569.
- Bolin S.R. & Grooms D.L. 2004. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet. Clin. North Am.* 20:51-68.
- Dentzer T.G., Lorenz I.C. Evans M.J. & Rice C.M. 2009. Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J. Virol.* 83(24):12702-12713.
- Doceul V., Charleston B., Crooke H., Reid E., Powel P.P. & Seago J. 2008. The N<sup>pro</sup> product of classical swine fever virus interacts with IκBα, the NF-κB inhibitor. *J. Gen. Virol.* 89:1881-1889.
- Donis R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am.* 11(3):393-423.

- Fan Z.-C. & Bird R.C. 2008. Generation and characterization of an N<sup>pro</sup>-disrupted marker bovine viral diarrhea virus from a BAC cDNA. *J. Virol. Met.* 151:257-263.
- Fan Z.-C., Dennis J.C. & Bird R.C. 2008. Bovine viral diarrhea virus is a suitable viral vector for stable expression of heterologous gene when inserted in between N<sup>pro</sup> and C genes. *Virus Res.* 138:97-104.
- Fan Z.-C. & Bird R.C. 2011. Development of a reporter bovine viral diarrhea virus and initial evaluation of its application for high throughput antiviral drug screening. *J. Virol. Met.* (In publication)
- Finley R.L. & Jr. Brent R. 1994. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *PNAS.* 91(26):12980-12984.
- Gibson D.G., Benders G.A., Axelrod K.C., Zaveri J., Algire M.A., Moodie M., Montague M.G., Venter J.C., Smith H.O. & Hutchinson C.A. 2008. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic genome. *PNAS.* 105(51):20404-20409.
- Gil L.H.V.G., Ansari I.H., Vassilev V.B., Liang D., Lai V.C.H., Zhong W., Hong Z., Dubovi E.J. & Donis R.O. 2006. The amino terminal domain of bovine viral diarrhea virus N<sup>pro</sup> protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J. Virol.* 80(2):900-911.
- Henningson J.N., Topliff C.L., Gil L.H.V., Donis R.O., Steffen D.J., Charleston B., Eskridge K.M. & Kelling C. 2009. Effect of the viral protein N<sup>pro</sup> on virulence of bovine viral diarrhea virus and induction of interferon type I in calves. *Am. J. Vet. Res.* 70(9):1117-1123.
- Hilton L., Moganeradj K., Zhang G., Chen Y.-H., Randall R.E., McCauley J.W. & Goodbourn S. 2006. The N<sup>pro</sup> product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J. Virol.* 80(23):11723-11732.
- Iqbal M., Poole E., Goodbourn S. & McCauley J.W. 2004. Role for bovine viral diarrhea virus E<sup>gns</sup> glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J. Virol.* 78(1):136-145.
- Jones C.T., Murray C.L., Eastman D.K., Tassello J. & Rice C.M. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81(16):8374-8383.
- Liang D., Chen L., Ansari I.H., Gil L.H.V.G., Topliff C., Kelling C.L. & Donis R.O. 2009. A replicon *trans*-packing system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhea virus (BVDV) virion. *Virology.* 387:331-340.
- Kreutz L.C., Donis R.O., Gil L.H.V., Lima M., Hoffman A.N., Garcez D.C., Flores E.F. & Weiblen R. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(12):1459-1466.

- Kümmerer B.M. & Meyers G. 2000. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 74(1):390-400.
- Magkouras I., Mätzner P., Rümenapf T., Peterhans E. & Schweizer M. 2008. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E<sup>rns</sup> of pestiviuses. *J. General Virol.* 89:2501-2506.
- Marukian S., Jones C.T., Andrus L. Evans M.J., Ritola K.D., Charles E.D., Rice C.M. & Dustin L.B. 2008. Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology.* 48(6):1843-1850.
- Meyers G., Ege A., Fetzer C., von Freyburg M., Elbers K., Carr V., Prentice H., Charleston B. & Schürmann E.-M. 2007. Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E<sup>rns</sup> RNase and N<sup>pro</sup> protease. *J. Virol.* 81(7):3327-3338.
- McCurkin A.W., Littledike E.T., Cutlip R.C., Frank G.H., Coria M.F. & Bolin S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Can. J. Comp. Med.* 48:156-161.
- Polo S., Ketner G., Levis R. & Falgout B. Gary. 1997. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J. Virol.* 71(7):5366-5374.
- Puri B., Polo S., Hayes C.G. & Falgout B. 2000. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific, 74 strain. *Virus Genes.* 20(1):57-63.
- Qu L., MacMullan L.K. & Rice C.M. 2001. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein ns4b in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 75(22):10651-10662.
- Ridpath J.F. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* 72(1/2):17-30.
- Roda A., Guardigli M., Michelini E. & Mirasoli M. 2009. Bioluminescence in analytical chemistry and *in vivo* imaging. *Trends Anal. Chem.* 28(3):307-322.
- Ryan M.D. & Drew J. 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13(4):928-933.
- Ruggli N., Summerfield A., Fiebach A.R., Guzylack-Piriou L., Bauhofer O., Lamm C.G., Waltersperger S., Matsuno K., Liu L., Gerber M., Choi K.H., Hofmann M.A., Sakoda Y. & Tratschin J.-D. 2009. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of N<sup>pro</sup>. *J. Virol.* 83(2):817-829.
- Rümenapf T., Stark R., Heimann M. & Thie H.-J. 1998. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* 72(3):2544-2547.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Shustov A.V., Mason P.W. & Frolov I. 2007. Production of pseudoinfectious yellow fever virus with a two-component genome. *J. Virol.* 81(21):11737-11748.
- Stark R., Meyers G., Rumenapf T. & Thiel H.-J. 1993. Processing of pestiviruses polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67(12):7088-7095.
- Suzuki R., Fayzulin R., Frolov I. & Mason P.W. 2008. Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of west nile virus genomes: use in safer propagation of a novel vaccine candidate. *J. Virol.* 82(14):6942-6951.
- Szymanski M.R., Fiebach A.R., Tratschin J.-D., Gut M., Ramanujam V.M., Gottipati K., Patel P., Ye M., Ruggli N. & Choi K.H. 2009. Zinc binding in pestivirus N<sup>pro</sup> is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation. *J. Mol. Biol.* 391:438-449.
- Tannous B.A., Kim D.-E., Fernandez J.L., Weissleder R. & Breakefield X.O. 2004. Codon optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol. Therapy.* 11(3):435-443.
- Tautz N., Thiel H.-J., Dubovi E.J. & Meyers G. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 68(5):3289-329.

**Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na construção do vírus recombinante IBSP-4ncp expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase**

Oligonucleotídeo	Sequência
BVDVqm 5'UTR_NADL_IBSP-4-F <sup>a</sup>	CTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGATTGCAAATG AAC
IBSP-4/Npro_linker_Gluc-R <sup>b,c</sup>	CCAT <u>TCCCTCGGCGTTGGTATCACTGCAGCTT</u> GAAACCCATAGGG
Linker_Gluc-F <sup>c</sup>	CTGCAGTGATACCAACGCCGAGGGAATGGGAGTCAAAGTTCTGTT TG
FMDV2A_GLuc-R <sup>d</sup>	<b>GGCCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGAAG GTCAAATTGTCACCACCGGCCCT</b>
FMDV2A_IBSP4/Core-F <sup>d</sup>	<b>AGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCTCCGACACAAATGCAGAA GG</b>
BVDV-Osloss-4458R	TGAGGGGCAAGAGTATGCTGACATT

Os oligonucleotídeos estão identificados de acordo com as sequências que amplificam e/ou possuem. <sup>a</sup>F- senso, polaridade positiva. <sup>b</sup>R- antisenso, polaridade negativa. <sup>c</sup>Sequência ligante inserida pelos oligonucleotídeos sublinhados. <sup>d</sup>Sequência da protease FMDV2A<sup>pro</sup> inserida pelos oligonucleotídeos em negrito.

**Quadro 2. Análise das sequências do vírus recombinante expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase comparada com o vírus parental IBSP4-ncp**

Região no genoma	Posição na ORF <sup>a</sup>	CI-pBSC_IBSP4-ncp#2		CI-pBSC_IBSP4-ncpGluc#3	
		Nucleotídeo	Aminoácido	Nucleotídeo	Aminoácido
E2	2221	G	Cis	A <sup>b</sup>	Cis
NS2	3559	T	Ser <sup>c</sup>	C	Pro <sup>c</sup>
NS3	4066	A	Gli	G <sup>b</sup>	Gli
NS3	6111	A	Lis	G <sup>b</sup>	Lis
NS4B	7908	T	Tir	C <sup>b</sup>	Tir
NS4B	8229	T	Glu	C <sup>b</sup>	Glu
NS5A	8982	T	Tre	C <sup>b</sup>	Tre
NS5A	8988	G	Lis	A <sup>b</sup>	Lis
NS5A	9582	C	Tre	T <sup>b</sup>	Tre

<sup>a</sup> Posição na open reading frame em nucleotídeos, com base no genoma do vírus IBSP4-ncp.

<sup>b</sup> Mutação silenciosa.

<sup>c</sup> Aminoácidos de mesmos grupos químicos.



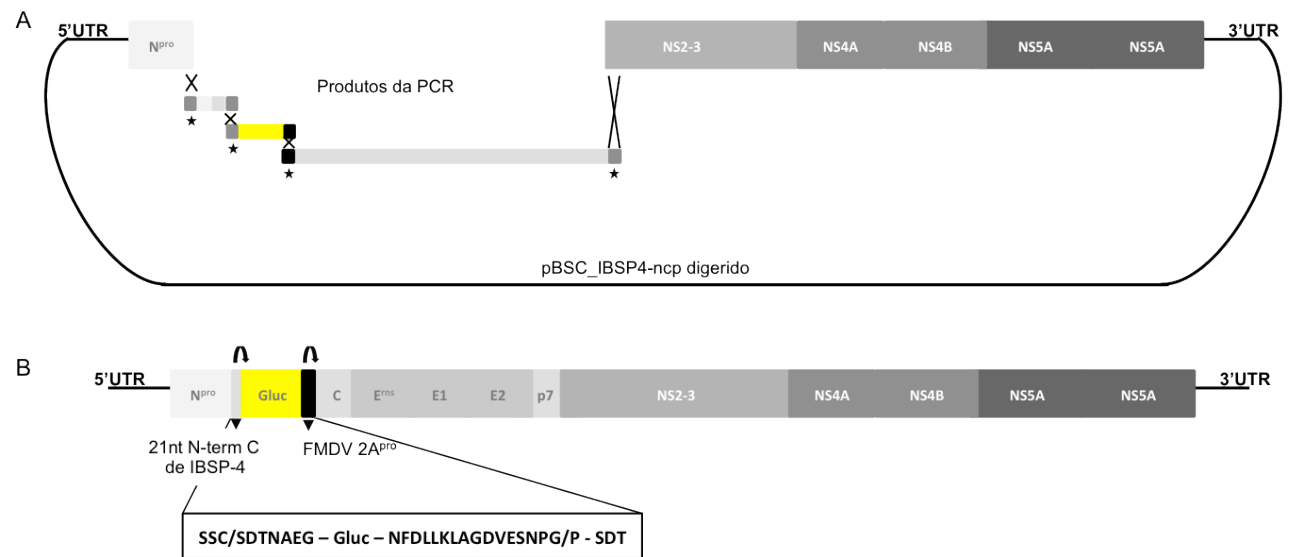


Fig.1. Representação esquemática da estratégia de construção do vírus recombinante IBSP-4ncp expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase. (A) Recombinação homóloga em levedura entre três produtos da PCR e o vetor pBSC\_IBSP-4ncp digerido pela enzima *SacI*. Os produtos da PCR estão representados com a indicação das sequências que os mesmos contém. (B) Organização do genoma quimérico do vírus IBSP-4ncpGluc. \*Sequências homólogas para a recombinação.

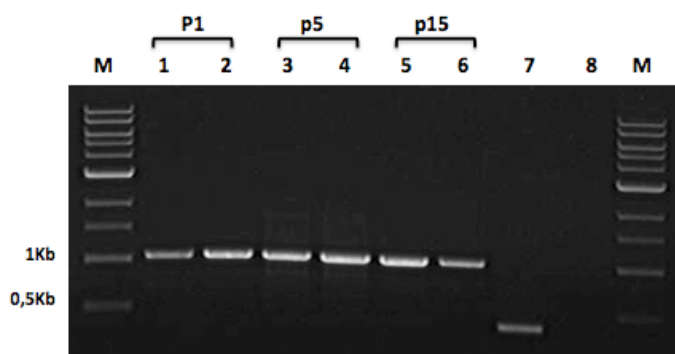


Fig.2. Avaliação da estabilidade dos vírus recombinantes CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4 em diferentes passagens. Resultado da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando os oligonucleotídeos 757F e 1137R. As colunas de 1, 3 e 5 correspondem ao CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3. As colunas 2, 4 e 6 ao pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4. A coluna 7 ao CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e a coluna 8 corresponde ao controle negativo de células não infectadas. M corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs).

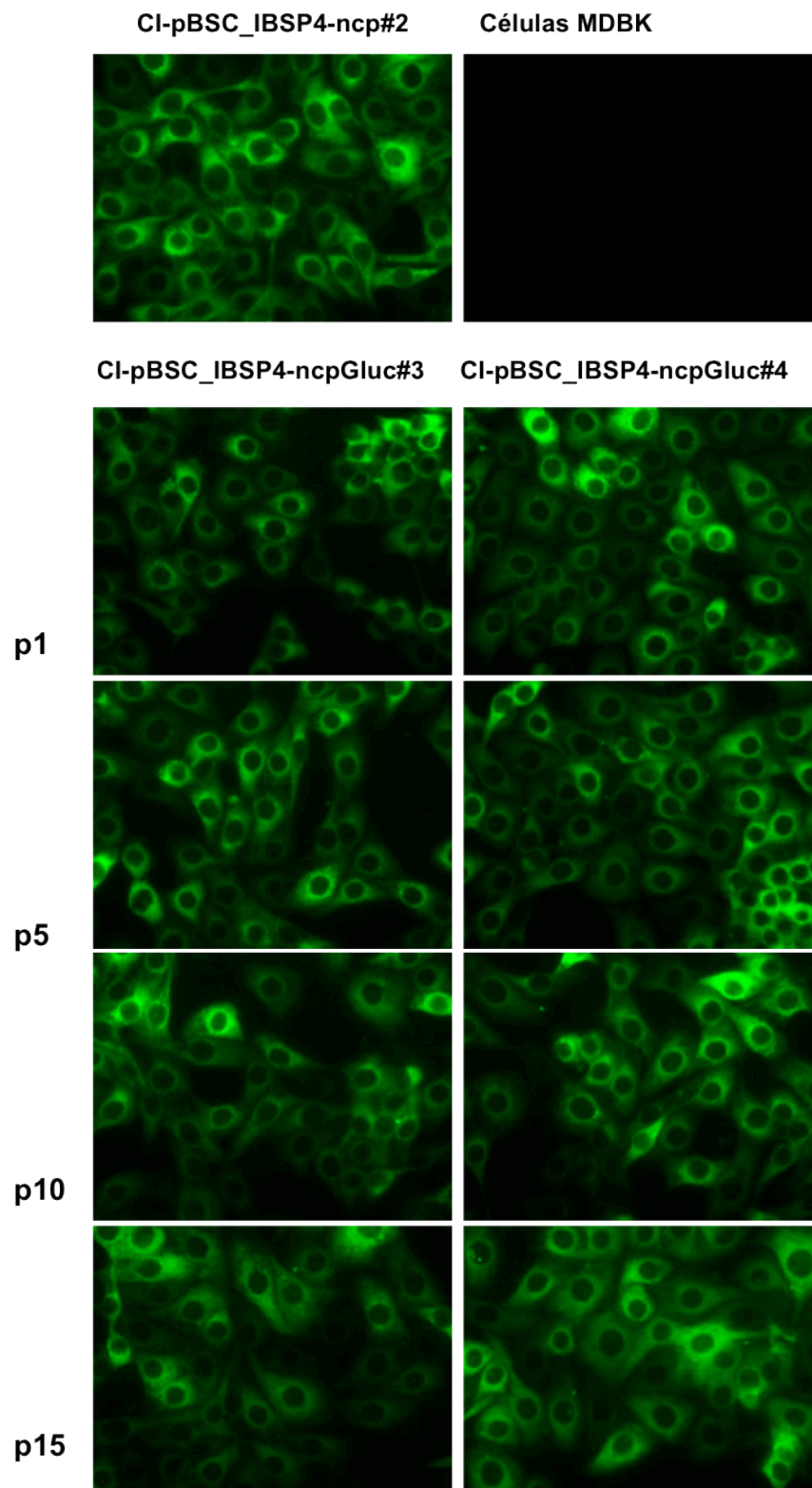


Fig.3. Infectividade viral dos vírus recombinantes por imunofluorescência indireta (IFI) em células MDBK inoculadas com o clone CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2 e os clones construídos CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4 em diferentes passagens. As passagens são indicadas pela letra p seguida pelo número correspondente. Imagens coletadas em um aumento 630x.

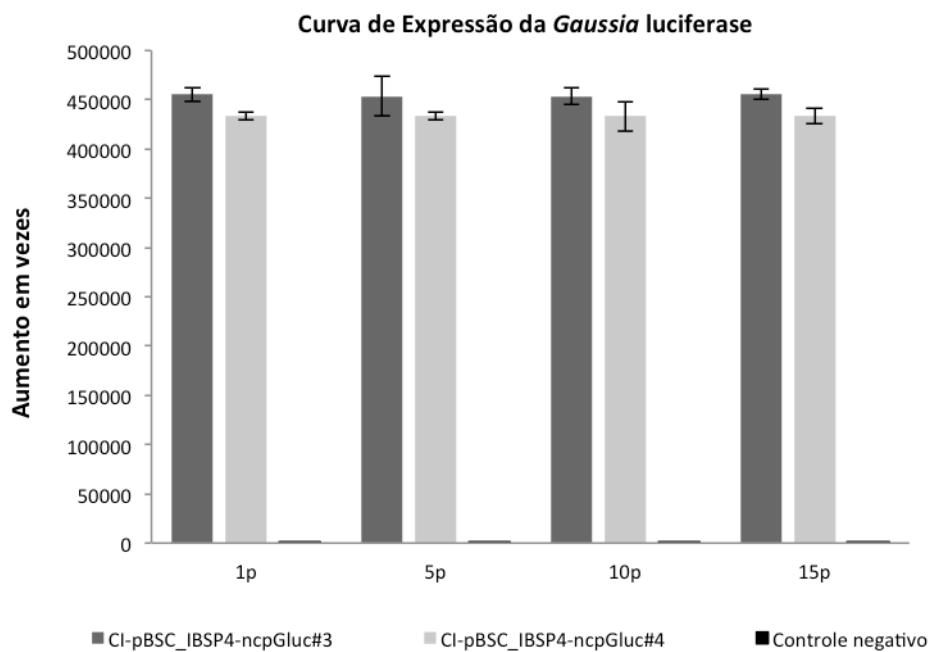


Fig.4. Atividade do gene repórter *Gaussia* luciferase no sobrenadante de células MDBK inoculadas com os clones recombinantes construídos em diferentes passagens (p1, p5, p10 e p15). A atividade da luciferase está representada no aumento do número de vezes da expressão em relação ao controle negativo (sobrenadante de células MDBK não inoculadas). Cada valor representa a média de dois experimentos independentes.

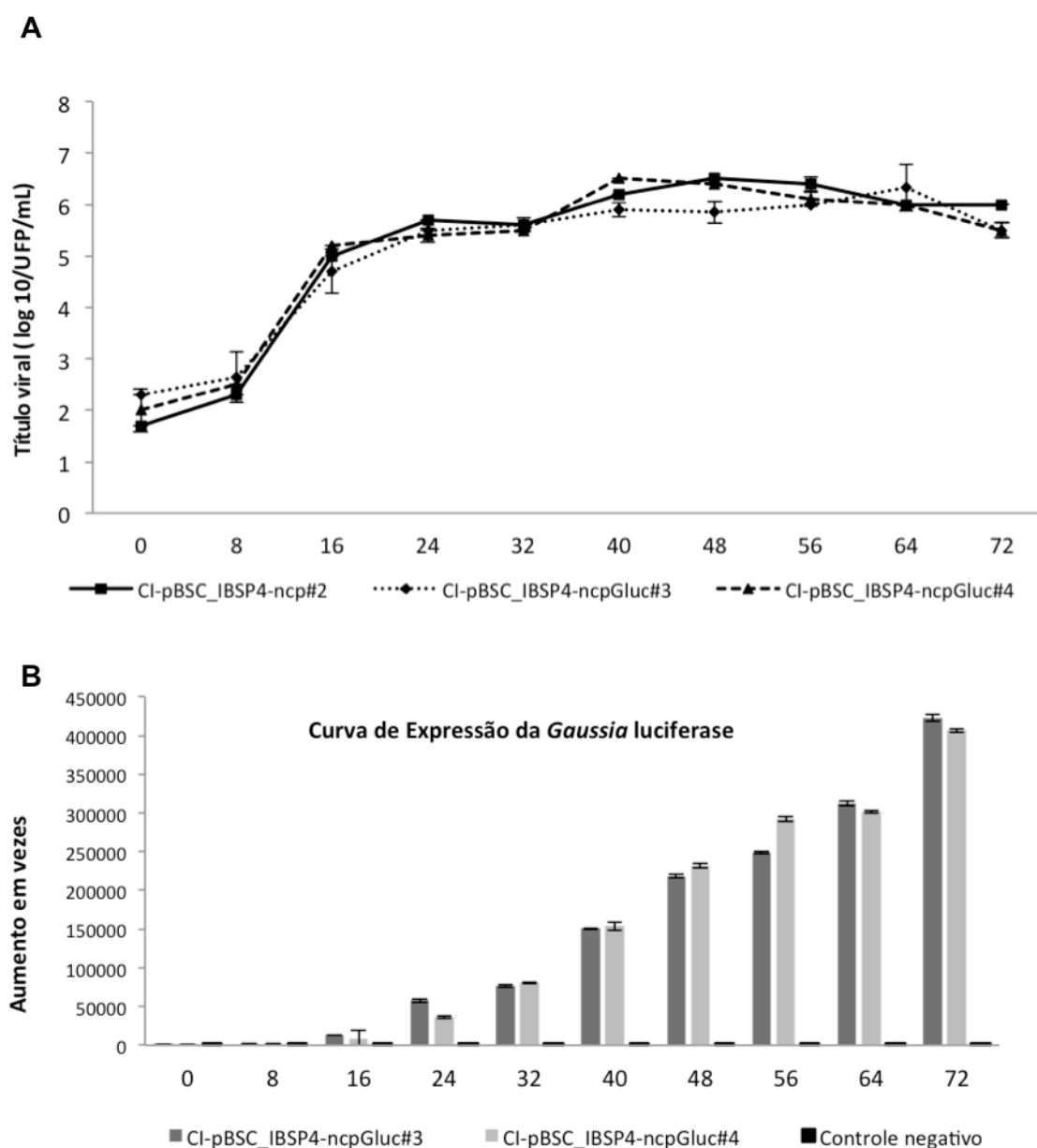


Fig.5. Gráfico A, curva de replicação dos vírus construídos CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4 e do clone infeccioso parental CI-pBSC\_IBSP4-ncp#2. Células MDBK foram inoculadas com uma multiplicidade de infecção de 0,03UFP/mL. Nos tempos indicados, os sobrenadantes foram coletados e os títulos virais quantificados por ensaio de placa e coloração de imunoperoxidase. Gráfico B, curva da atividade do gene repórter *Gaussia* luciferase no sobrenadante de células MDBK inoculadas com os clones recombinantes construídos (mesmas amostras do gráfico A). Nos tempos indicados, os sobrenadantes foram coletados e a atividade da enzima mensurada em luminômetro. A atividade da luciferase está representada no aumento do números de vezes da expressão em relação ao controle negativo (sobrenadante de células MDBK não inoculadas). Cada valor representa a média de dois experimentos independentes.

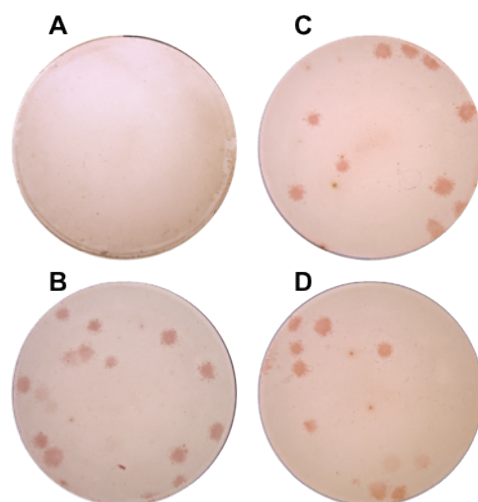


Fig.6. Morfologia de focos dos vírus recombinantes construídos avaliados na passagem 5 (p5). (A) Controle negativo (células MDBK não inoculadas). (B) Controle positivo (células MDBK inoculadas com o vírus parental IBSP4-ncp). (C e D) Células MDBK inoculadas com os clones CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4, respectivamente. Monocamadas de MDBK foram inoculadas com diluições seriadas de cada vírus ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ), cobertas com agarose 1%, fixadas 72 horas depois e reveladas pela coloração de imunoperoxidase.

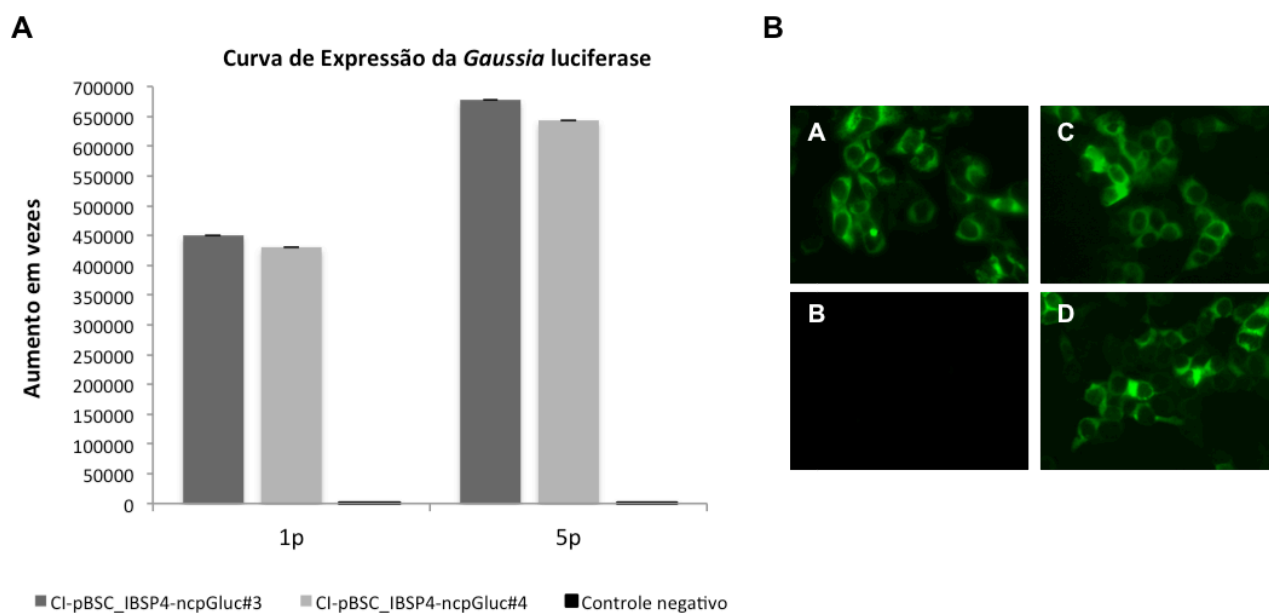


Fig.7. Estabilidade dos vírus recombinantes recuperados a partir do DNA plasmideal extraído de *E. coli*. (A) Atividade do gene repórter *Gaussia* luciferase no sobrenadante de células MDBK inoculadas com os clones recombinantes em diferentes passagens (p1 e p5). A atividade da luciferase está representada no aumento do número de vezes da expressão em relação ao controle negativo (sobrenadante de células MDBK não inoculadas). Cada valor representa a média de dois experimentos independentes. (B) Infectividade viral dos clones inoculados em células MDBK e avaliados por imunofluorescência. (A) Controle positivo, células inoculadas com o vírus parental IBSP4-ncp. (B) Controle negativo, células MDBK não infectadas. (C e D) Clones infecciosos CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#3 e CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc#4, respectivamente, na p5. Imagens coletadas em um aumento de 630x.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a construção e caracterização de um clone infeccioso do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) a partir de uma cepa brasileira (IBSP4) biotipo não-citopático (ncp). Esse clone (CI-pBSC\_IBSP4-ncp) foi primeiro clone infeccioso de BVDV construído pela técnica de recombinação homóloga em levedura. O vírus recuperado a partir do clone infeccioso construído manteve as características fenotípicas similares ao vírus parental, mesmo contendo sua regiões não traduzidas 5' e 3'(UTR) quiméricas. Os resultados obtidos também demonstram o alto grau de conservação entre as UTRs dos BVDVs, mesmo de subgenótipos diferentes; aparentemente nem a tradução e nem a replicação foram afetadas.

Clones infecciosos são ferramentas poderosas para estudos do agente e suas interações com o hospedeiro. Os estudos realizados com clones infecciosos são feitos a partir da manipulação direta do seu DNA, os quais para isso devem permitir tal manipulação. Essa capacidade do uso do CI-pBSC\_IBSP4-ncp como ferramenta foi demonstrada pela inserção de um gene heterólogo *Gaussia* luciferase (Gluc) entre seus genes N<sup>pro</sup> e Core (CI-pBSC\_IBSP4-ncpGluc). A inserção do gene Gluc não interferiu nas características fenotípicas do vírus IBSP4. Além disso o gene repórter foi corretamente expresso e processado como indicado pela atividade da Gluc no sobrenadante do cultivo celular. Esse vírus recombinante contendo o gene repórter também demonstra a capacidade do vírus IBSP4 na sua utilização como vetor viral estável de um gene com até 555pb. Isso poderá ser muito útil na construção de vírus quiméricos vacinais e também na construção de vírus para vacinas diferenciais.

Todos esses resultados foram avaliados *in vitro*. Resta saber se características parentais serão mantidas *in vivo*. A genética reversa já permitiu a elucidação de diversos aspectos da biologia do BVDV e de suas interações com o hospedeiro, no entanto uma gama de aplicações tanto no âmbito de estudos da patogenia viral quanto desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes ainda são necessárias.



## 6. REFERÊNCIAS

ADLER, B. et al. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor (s) capable of priming uninfected macrophages for activation induced apoptosis. **Journal of Virology**, v. 71, n. 4, p. 3255-3258, 1997.

ADLER, H. et al. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. **Journal of Virology**, v. 70, n. 4, p. 2650-2653, 1996.

AGAPOV, E. V. et al. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v.78, n. 5, p. 2414-2425, 2004.

ANSARI, I. H. et al. Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 9612-9623, 2004.

BAIGENT, S. J.; GOODBOURN, S.; McCAULEY, J. W. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 135-44, 2004.

BAIGENT, S. J. et al. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic Bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. **Journal of Virology**, v. 76, n. 18, p. 8979-8988, 2002.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 425-446, 1995.

BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96-104, 2003.

BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.-J. Mutations in the 5'UTR nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. **Journal of virology**, v. 74, n. 17, p. 7884-7894, 2000.

BEHRENS, S.-E. et al. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. **Journal of Virology**. v. 71, n. 3, p. 2364-2372, 1998.

BENDFELDT, S.; GRUMMER, B.; GREISER-WILKE, I. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea

virus. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 313-326, 2003.

BOLIN, S. Control of bovine viral diarrhoea virus infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n. 3, p. 615-626, 1995.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 20, p. 51-68, 2004.

BOYD, B. L. et al. Cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes affect fluid phase uptake and mannose receptor-mediated endocytosis in bovine monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, p. 53-65, 2004.

BRACKENBURY, L. S. et al. Identification of a cell population that produces alpha / beta interferon *in vitro* and *in vivo* in response to noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7738-7744, 2005.

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 20, p. 1-3, 2004.

CHARLESTON, B. et al. Alpha / beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea virus *in vivo*. **Journal of Virology**, v. 76. n. 2, p. 923-927, 2002.

CHARLESTON, B. et al. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1893-1897, 2001.

CHEN, Z. et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by N<sup>pro</sup> from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 277-292, 2007.

CHOI, K. H. et al. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. **PNAS**, v. 101, n. 13, p. 4425-4430, 2004.

COLLEN, T. et al. Analysis of the repertoire of cattle CD4<sup>+</sup> T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n, p. 235-238, 2002.

COLLEN, T. et al. Single amino acid differences are sufficient for CD4<sup>+</sup> T-cell recognition of

a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 276, p. 70-82, 2000.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 9, p. 1388-1394, 1990.

CORAPI, W. V.; FRENCH, T. W.; DUBOVI, E. J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 62, p. 2823-2827, 1989.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DEHAN, P. et al. Point mutations in an infectious bovine viral diarrhoea virus type 2 cDNA transcript that yields an attenuated and protective viral progeny. **Vaccine**, v. 23, p. 4236-4246, 2005.

DENG R.; BROCK, K. V. 5' and 3' untranslated region of pestivirus genome: primary and secondary structure analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1949-1957, 1993.

DEREGT, D. et al. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 13-22, 2005.

DIEGUEZ, F. J. et al. Effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on dairy calf rearing. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 39-40, 2009.

DONIS R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, p. 393-423, 1995.

ELBERS, K. et al. Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2-p7. **Journal of Virology**, v. 70, n. 6, p. 4131-4135, 1996.

FAN, Z. C.; BIRD, R. C. Generation and characterization of an N<sup>pro</sup>-disrupted marker bovine viral diarrhoea virus derived from a BAC cDNA. **Journal of Virological Methods**, v. 152, p. 257-263, 2008b.

FAN, Z.-C.; BIRD, R. C. An improved reverse genetics system for generation of bovine viral diarrhoea virus as a BAC cDNA. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 309-315, 2008a.

FAN, Z. C.; WANG, H. H. Regeneration and characterization of a recombinant bovine viral diarrhoea virus and determination of its efficacy to cross the bovine placenta. **Virus Genes**, v. 38, p. 129-135, 2009.

FERREIRA, L. C. L, et al. Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 285-292, 2008.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25. p. 25-134, 2005.

FULTON, R. et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 181-90, 2002.

FULTON, R. et al. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 467-477, 2009.

GAMLEN, T. et al. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 133-44, 2010.

GANÉE, A. et al. Nucleic Acid sequence-based amplification to detect bovine viral diarrhoea virus on individual and pooled plasma, sera and ear notch samples. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 162, n. 5, p. 252-257, 2011.

GIBSON, A. et al. Identification of a lineage negative cell population in bovine peripheral blood with the ability to mount a strong type I interferon response. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, p. 332-341, 2012.

GIBSON, D. G. et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic genome. **PNAS**, v. 105, n. 51, p. 20404-20409, 2008.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 20, p. 6984-6990, 2009.

GILLESPIE, J.; BAKER, L.; McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. **Cornell Veterinary**, v. 50, p. 73-79, 1960.

GIL, L. H. V. G. et al. Modulation of PKR activities in cells infected by bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**, v. 116, p. 69-77, 2006a.

GIL, L. H. V. G. et al. The amino terminal domain of bovine viral diarrhea virus N<sup>pro</sup> protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 900-911, 2006b.

GLEW, E. J. et al. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1771-1780, 2003.

GLEW, E. J.; HOWARD, C. J. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the Flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1677-85, 2001.

GONG, Y. et al. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhea virus. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2729-2736, 1996.

GRASSMANN, C. W.; ISKEN, O.; TAUTZ, N. Genetic analysis of the Pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 7791-7802, 2001.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.

GRUMMER, B. et al. Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. **Virus Research**, v. 90, p. 143-53, 2002.

GRUMMER, B.; GROTHA, S.; GREISER-WILKE, I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 427-32, 2004.

GU, B. et al. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. **Journal of Virology**, v. 74. n. 4, p. 1979-1800, 2000.

HAFEZ, S. M.; LIESS, B. Studies on bovine viral diarrhea virus. II. Stability and some physical-chemical properties. **Acta Virology**, v. 16, p. 399-408, 1971.

HARADA, T.; TAUTZ, N.; THIEL, H. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. **Journal of Virology**, v. 74, n. 20, p. 9498-9506, 2000.

HENNINGSON J. N. et al. Effect of the viral protein N<sup>pro</sup> on virulence of bovine viral diarrhea virus and induction of interferon type I in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 9, p. 1117-1123, 2009.

HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; TISDALL, D. J. Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 87-89, 2010.

HILTON L. et al. The N<sup>pro</sup> product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11723-11732, 2006.

HOFF, H. S.; DONIS, R. O. Induction of apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. **Virus Research**, v. 49, p. 101-113, 1997.

HOKANSON, C. A. et al. Hybrid yeast-bacteria cloning system used to capture and modify adenoviral and nonviral genomes. **Human Gene Therapy**, v. 14, p. 329-339, 2003.

HORSCROFT, N. et al. Establishment of a subgenomic replicon for bovine viral diarrhea virus in Huh-7 cells and modulation of interferon-regulated factor 3-mediated antiviral response. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5, 2005.

HORZINEK, M.; MAESS, J.; LAUFS, R. Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea, and hog cholera viruses. **Arch Gesamte Virusforsch**, v. 33, p. 306-318, 1971.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11. n. 3, p. 521-548, 1995.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNING, V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 427-436, 2006.

HOWARD, C. J. et al. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 32, n. 3-4, p. 303-314, 1992.

IVANYI-NAGY, R. et al. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of *Flaviviridae*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 712-725, 2008.

IQBAL, M. et al. Role for Bovine Viral Diarrhea virus E<sup>rns</sup> glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-Stranded RNA. **Journal of Virology**, v. 78, n.1, p. 136-145, 2004.

IQBAL, M.; FLICK-SMITH, H.; MCCAULEY, J. W. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E<sup>rns</sup> with cell surface glycosaminoglycans. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 451-459, 2000.

JENSEN, J.; SCHULTZ, R. D. Effect of infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 29, n. 3-4, p. 251-265, 1991.

JOHNSON, C. M. et al. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the  $\alpha$  subunit of translation elongation factor-1. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2935-2943, 2001.

JORDAN, R. et al. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 9588-9599, 2002.

KALAYCIOGLU, A. T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 60-67, 2007.

KAMEYAMA, K.-I. et al. Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. **Microbiology and Immunology**, v. 52, p. 277-82, 2008.

KAPIL, S. et al. Immunity and immunosuppression. In: GOYAL, S.M; RIDPATH, J.F. (Org.) *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 9, p. 157-170.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America**, v. 20, p. 115-129, 2004.

KREUTZ, L. C. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 12, p. 1459-1466, 2000.

KÜMMERER, B. M.; STOLL, D.; MEYERS, G. Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 4127-4138 1998.

KÜMMERER, B. M.; MEYERS, G. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. **Journal of Virology**, v. 74, n. 1, p. 390-400, 2000.

KUPFERMANN, H. et al. Bovine viral diarrhoea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 8175-8181, 1996.

LACKNER, T. et al. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9746-9755, 2005.

LACKNER, T. et al. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for random pathogenicity of an RNA Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10765-10775, 2004.

LAMBOT, M. et al. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1041-1047, 1997.

LAMBOT, M. et al. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1745-1749, 1998a.

LAMBOT, M. et al. Evidence for biotype-specific effects of bovine viral diarrhoea virus on biological responses in acutely infected calves. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 27-30, 1998b.

LARSON, R. L. Management systems and control programs. In: GOYAK, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis, Management and Control**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 223-238.



LAUREYNS, J.; RIBBENS, S.; KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, v.184, n. 1, p. 21-26, 2010

LEE, S.-R. et al. Bovine viral diarrhoea viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 403-418, 2008.

LINDBERG, A. L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 25, n.1, p. 1-16, 2003.

LINDENBACH, B. D. & RICE, C. M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. et al. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincot Williams & Williams, 2001. p. 991-1042.

LIU, L. et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, p. 351-357, 2009.

McCLURKIN, A. W. et al. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 156-161, 1984.

MAGKOURAS, I. et al. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E<sup>ms</sup> of pestiviruses. **The Journal of General Virology**, v. 89, n. 10, p. 2501-2506, 2008.

MAROZSAN, A.; ARTS, E. J. Development of a yeast-based recombination cloning/system for the analysis of gene products from diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates. **Journal of Virological Methods**, v. 111, n. 2, p. 111-120, 2003.

MÄTZENER, P. et al. The viral RNase E<sup>ms</sup> prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. **Virus Research**, v. 140, p. 15-23, 2009.

MAURER, K. et al. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 1792-1799, 2004.

McCLURKIN, A.W. et al. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.48, p.156-161, 1984.

MENDEZ, E. et al. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. **Journal of**

**Virology**, v. 72, n. 6, p 4737-4745, 1998.

MEYER, C. et al. Recovery of a virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 8494-8503, 2002.

MEYERS, G. et al. Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E<sup>ms</sup> RNase and N<sup>pro</sup> protease. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3327-3338, 2007.

MEYERS, G. et al. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. **Virology**, v. 191, p. 368-386, 1992.

MEYERS, G. et al. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. **Journal of Virology**, v. 70, n. 12, p. 8606-8613, 1996.

MINAMI, F. et al. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, p. 35039, 2011.

MISCHKALE, K. et al. Characterization of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 3-12, 2010.

MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 63-74, 2005.

MOORMANN, R. J. M. et al. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion a diagnosis test. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p. 209-219, 2000.

MOORMANN, R. J. et al. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. **Journal of Virology**, v. 70, p. 763-770, 1996.

MÜLLER-DOBLIES, D. et al. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 302-312, 2004.

NAKAMURA, S. et al. Enhanced replication of orbiviruses in bovine testicle cells infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 4, p. 677-

681.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinary**, v. 36, p. 205-213, 1946.

OLDENBURG, K. R. et al. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 2, p. 451-452, 1997.

PEDRERA, M. et al. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 30-39, 2012.

PEDRERA, M. et al. Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 11, p. 2650-2659, 2009.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.

PERLER, L. et al. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 881-887, 2000.

PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, v. 31, p. 107-111, 2003.

POLO, S. et al. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 5366-5374, 1997.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C (Org.). **Infectious Diseases of Livestock**. 2. ed. Cape Town: Oxford University, 2004, v. 2, p. 946-969.

PURI, B. et al. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific , 74 strain. **Virus Genes**, v. 20, n. 1, p. 57-63, 2000.

QI, F. et al. Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. **Virology**, v. 189, p. 285-292, 1992.

QU, L.; McMULLAN L. K., RICE, C. M. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 106-51-10662, 2001.

RASMUSSEN, T. B. et al. Direct recovery of infectious *Pestivirus* from a full-length RT-PCR amplicon. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 330-333, 2008.

RASMUSSEN, T. B. et al. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 13-17, 2010.

RHODES, S. G. et al. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1673-1679, 1999.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J. F. Classification and Molecular Biology. In: GOYAK, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management and Control**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 65-80.

RIDPATH, J. F. et al. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F.; FULTON, R. W. Knowledge gaps impacting the development of bovine viral diarrhea virus control programs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 10, p. 1171-1179, 2009.

RONECKER, S. et al. Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2114-2121, 2008.

RÜMENAPF, T. et al. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. **Journal of Virology**, v. 67, n. 6, p. 3288-3294, 1993.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, 2001.

SCHWEIZER, M; PETERHANS, E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1147-1155, 1999.

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 289-299, 2005.

SHANKS, R. M. Q. e al. New yeast recombineering tools for bacteria. **Plasmid**, v. 62, n. 2, p. 88-97, 2009.

SHOEMAKER, M. L. et al. Differential expression of the type I interferon pathway during persistent and transient bovine viral diarrhoea virus infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 1, p. 23-35, 2009.

SMIRNOVA, N. P. et al. Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. **Virus Research**, v. 132, p. 49-58, 2008.

STAHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical “Hobi”- like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v. 38, p. 517-523, 2007.

STARK, R. et al. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. **Processing**, v. 67, n. 12, p. 7088-7095, 1993.

St-LOUIS, M.-C.; ASSIEB, B. M.; RCHAMBAULTA, D. The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. **Veterinary Research**, v. 36, p. 213-227, 2005.

SZYMANSKI, M. R. et al. Zinc binding in pestivirus N<sup>pro</sup> is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation. **Journal of Molecular Biology**, v. 391, n. 2, p. 438-449, 2009.

TAUTZ, N. et al. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7851-8, 1996.

TAUTZ, N.; MEYERS, G.; THIEL, H. J. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.10, p.121– 127, 1998.

TAUTZ, N. et al. Pathogenesis of Mucosal Disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. **Journal of Virology**, v. 68, n. 5, p. 3289-3297, 1994.

TAUTZ, N.; KAISER, A.; THIEL, H. J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. **Virology**, v. 273, p. 351-363, 2000.

THIEL, H. J. et al. Pestiviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Org.) **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Co., 1996. p. 1059-1074.

VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. 2009. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 94-98, 2010.

VAN OIRSCHOT, J. T. BRUSCHKE, C. J. M., VAN RIJN, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.169-183, 1999.

VASSILEV, V. B.; DONIS, R. O. Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. **Virus Research**, v. 69, p. 95-107, 2000.

VASSILEV, V. B.; COLLET, M. S.; DONIS, R. O. Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 471-478, 1997.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 5, p. 51-58, 1974.

WEGELT, A. et al. New insights into processing of bovine viral diarrhea virus glycoproteins E<sup>ms</sup> and E1. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2462-2467, 2009.

WEILAND, F. et al. Localization of pestiviral envelope proteins E<sup>ms</sup> and E2 at the cell surface and on isolated particles. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1157-1165, 1999.

WELSH, M. D.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, p. 195-210, 1995.

YAMANE, D. et al. The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. **Journal of General**

**Virology**, v. 87, p. 2961-2970, 2006.

YU, H.; GRASSMANN, C. W. BEHRENS, S.-E. Sequence and structural Elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3638-3648, 1999.

XIA, H. et al. Molecular phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus: a Bayesian approach. **Virus Research**, v. 130, n. 1-2, p. 53-62, 2007.

ZEMKE, J. et al. Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 69-80, 2010.

ZEZAFOUN, H.; DECREUX, A.; DESMECHT, D. Genetic and splice variations of *Bos taurus* CD46 shift cell permissivity to BVDV, the bovine pestivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 3-4, p. 315-327, 2011.

ZHANG, G. et al. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1677-1681, 1996.

ZHONG, W.; GUTSHALL, L. L.; VECCHIO, A. M. DEL. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 9365-9369, 1998.