

## INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA RECOMBINAÇÃO GÊNICA ENTRE ESTIRPES DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS (VBI).

Igor Leonardo Santos, Hélio José Montassier, Daniel Gomes da Conceição, Maria de Fátima Silva Montassier. – Biológicas – Medicina Veterinária - Departamento de Patologia - Laboratório de Imunologia e Virologia- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal.

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e está classificado no gênero *Coronavírus*. Quanto à morfologia, o VBIG é pleomórfico, apesar da predominância de partículas esféricas, com aproximadamente 120 nm de diâmetro (RESENDE, 2003). O genoma do VBI é formado por RNA fita simples cauda de poli-adenosina e não é segmentado com polaridade positiva e tem aproximadamente 27,6 Kb, codificando 3 proteínas estruturais mais importantes: a nucleoproteína (N), uma proteína fosforilada do nucleocapsídeo interno e externamente, pelas glicoproteínas da matriz (M) e da espícula (S), sendo essa última é clivada após ser traduzida em duas subunidades, S1 e S2. Salienta-se que o glicopolipeptídeo S1 é responsável pela infectividade viral e que possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. A variação na composição de aminoácidos de algumas regiões da glicoproteína S é a principal estratégia do VBIG para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH *et al.*, 1992; COOK *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 1999). A glicoproteína S possui um papel biológico de elevada relevância para o patógeno viral por ser a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo VBI, sendo por isto, de fundamental importância na imunoprofilaxia para a BIG e, em segundo lugar, ela é a base dos testes de diagnósticos que têm sido utilizados para identificar e caracterizar as diferentes amostras desse vírus (COOK *et al.*, 1999; ROCHA, 2000; RESENDE, 2003).

Várias amostras de VBIG isoladas em plantéis vacinados no Estado de São Paulo, durante 1987 a 1991, apresentaram pouca relação sorológica com o sorotipo *Massachusetts*, especialmente a estirpe M41 (ROCHA, 2000). RESENDE (2003), avaliando 15 isolados de VBIG oriundos de surtos de BIG que ocorreram em diferentes granjas do Estado de Minas Gerais, entre 1972 a 1989, através da técnica de RT-PCR/RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição), tendo classificado os isolados em 3 grupos, sendo que nove desses isolados foram reunidos no genótipo *Massachusetts* e os outros 2 genótipos agruparam seis isolados considerados variantes por esse estudo. Nesse trabalho de genotipificação, nenhum dos 15 isolados foi classificado no genótipo/sorotipo *Connecticut* ou *Arkansas*. Como descrito anteriormente o uso da técnica RT-PCR no gene S1 (KWON *et al* 1993) e da RT-PCR/RFLP no gene S1 (LIN *et al* 1991) são métodos comumente utilizados no diagnóstico laboratorial do VBI.

Ainda dentro do contexto da variabilidade genética desenvolvida pelo VBIG, que possui um extenso genoma, sabe-se que ela ocorre principalmente através de mutação e recombinação gênica. Essa variabilidade confere a esse agente viral uma vantagem evolutiva considerável uma vez que esse vírus além de manter a sua estabilidade genética, é capaz de gerar uma progênie com grande diversidade antigênica superficial, que favorece esse patógeno a contornar mais facilmente as defesas do hospedeiro (MURPHY *et al.*, 1999; RESENDE, 2003). A pressão seletiva induzida pelo "status imunitário" de uma região pode contribuir significativamente para o surgimento de amostras variantes (MARTINS, 1992) e, pequenas variações nas regiões hipervariáveis podem resultar em diferenças detectáveis em teste de vírus-neutralização (VN). Algumas amostras que foram consideradas sorotipos diferentes nesses testes, mostraram diferença de apenas 2% a 3 % na sequência de aminoácidos da subunidade S1 (CAVANAGH *et al.*, 1992).

Em vista desses fatos que evidenciam a importância do fenômeno de variabilidade genética entre estirpes do VBIG, foi realizado o presente estudo, tanto em aves como em ovos embrionados SPF, com o objetivo principal de se induzir experimentalmente e estudar a recombinação gênica entre uma estirpe de referência (M41) e outra isolada de campo desse mesmo vírus, como por exemplo as estirpes VBISP01, VBIPR06, VBISP02 e VBIPR02, sendo para tanto utilizada as técnicas de RT-PCR e de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), seguido pela análise dos mapas de restrição do gene S

das estirpes geradas por co-infecção em comparação com as estirpes de referência do VBI, interpretando os resultados da RFLP e do processo de indução de estirpes recombinantes do VBI, possibilitando que o fenômeno da recombinação entre diferentes estirpes do VBI seja evidenciado.

Na tentativa de induzir recombinação gênica no VBI, foram realizados diversos protocolos de co-infecções com estirpes de campo (VBIPR06 e VBISP02) e outra de referência (M41) em aves mantidas em isoladores com pressão positiva e fornecimento de ar purificado por filtração absoluta. Como o título da estirpe M41 era igual a  $10^{9.74}$  DIE<sub>50</sub> /ml, este vírus foi ressuspensionado na razão 1:550.000, de forma que fossem inoculados  $10^4$  DIE<sub>50</sub> /ml. Na estirpe VBIPR02 cujo título infectante era igual a  $10^{7.86}$  DIE<sub>50</sub> / ml, foram preparadas duas diluições (I e II), sendo que a diluição I correspondeu a razão 1:72 enquanto que a diluição II correspondeu a razão 1:7200. No isolador 1 foram co-infectadas 4 aves contendo a suspensão com a diluição final da estirpe M41 juntamente com a diluição I da estirpe VBIPR06 e as outras 4 aves foram co-infectadas com a mesma estirpe de referência (M41), porém este vírus foi reunido a diluição II da estirpe VBISP02. Em ambas combinações foram inoculados 100 µl dessa mistura por ave. Procedimentos similares foram realizados para se fazer a co-infecção da estirpe de referência M41 com duas outras isoladas de campo, como a VBIPR06 e VBISP02. Foi feito também uma tentativa de co-infecção de contato, na qual colocou-se 2 aves dentro do isolador onde havia aves infectadas separadamente com uma dessas três estirpes. Em todos os grupos experimentais de co-infecção descritos acima foi sacrificada metade das aves no terceiro dia pós-infecção (dpi) e a outra metade foi sacrificada no quinto dia pós-infecção por deslocamento cervical, uma vez que os tecidos que servem para análise da patogenicidade viral (traquéia, pulmão e rim) não podem sofrer qualquer modificação durante a eutanásia. Amostras teciduais foram colhidas para serem processadas nas técnicas de biologia molecular (extração de RNA, RT-PCR) e tentativa de re-isolamento, por meio da inoculação em ovos embrionados SPF.

A inoculação da estirpe de referência M41 juntamente com as estirpes de campo (VBISP01, VBIPR06, VBISP02 e VBIPR02), com o objetivo de se obter uma estirpe recombinante do VBI, foi feita em ovos SPF com 9-11 dias de incubação em uma única passagem. Passados 36hs da inoculação metade dos ovos foram colocados à temperatura de 4-10°C o que possibilitou uma colheita de LCA mais límpido, para ser usado como suspensão viral, a qual foi submetida aos demais procedimentos neste estudo. A outra metade dos ovos foi mantida na incubadora para analisar as alterações morfológicas que porventura ocorressem no embrião, como: nanismo, enrolamento, depósito de urato nos mesonéfrons e mortalidade embrionária dentro de no máximo sete dias após a inoculação, segundo as recomendam OWEN et al. (1991).

Em um primeiro procedimento a estirpe de referência M41 foi diluída em Meio Eagle com antibiótico e anti-fúngico na razão 1: 550.000 e inoculou-se 200µl/ovo em 5 ovos, uma vez que a estirpe M41 estava com título  $10^{9.74}$  DIE50%/ml. Aguardou-se meia hora e em seguida a suspensão viral contendo a estirpe de campo VBISP01 com título  $10^{8.008}$  DIE50%/ml foi pré-diluída na razão 1:10.000 e, em seguida, inoculou-se na cavidade alantóide de 5 ovos embrionados, sendo 200µl/ovo e, estes ovos foram denominados controle estirpe VBISP01. O último passo foi adicionar em um tubo de penicilina estéril, 200µl da suspensão viral da estirpe M41 e 200µl da suspensão viral da estirpe VBISP01. Tal mistura foi diluída na razão 1: 10 em Meio Eagle e inoculadas em 10 ovos embrionados (200µl/ovo).

Outro procedimento utilizado foi a co-infecção em ovos entre as estirpes M41 e VBIPR06. Nesse procedimento, a estirpe de referência M41 foi diluída conforme padrão adotado na co-infecção em ovos descrita logo acima (diluição padronizada da estirpe M41 para todas as co-infecções deste experimento), enquanto que a estirpe VBIPR06 com título  $10^{7.86}$ /ml (DIE50%) foi diluída em duas etapas (I e II). A diluição I na razão 1:72 e a diluição II na razão 1:7200, essa última diluição foi inoculada na cavidade córion-alantóide de 5 ovos, sendo 200ul/ovo, considerados ovos controle da estirpe VBIPR06. O último passo foi adicionar em um tubo de penicilina esteril 200µl da suspensão viral da estirpe M41 e 200ul de cada suspensão viral da estirpe VBIPR06 (I e II), inoculando cada mistura em 6 ovos (200ul/ovo), sendo denominados co-infecção M41+ VBIPR06 diluição I e M41+ VBIPR06 diluição II.

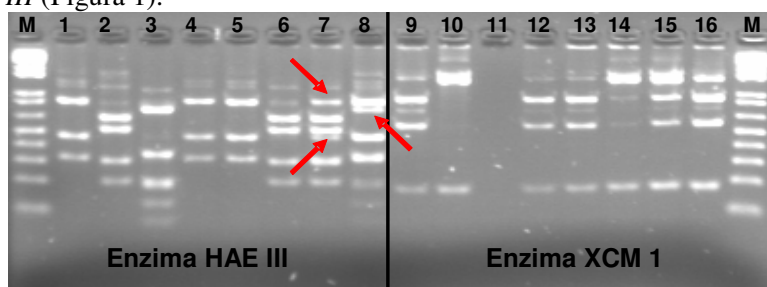
Seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, foram preparadas duas suspensões da estirpe VBISP02 cujo título é  $10^{7.5}$  DIE50%/ml em duas diluições (I e II), na qual a diluição I ela foi diluída na razão 1:32 e na diluição II foi diluída na razão 1:3200, essa última diluição foi inoculada na

cavidade córion-alantóide de 5 ovos, sendo 200µl/ovo, estes ovos foram denominados ovos controle estirpe VBISP02. O último passo foi adicionar em um tubo de penicilina esterilizado, 200ul da suspensão da estirpe M41 e 200ul de cada uma das diluições da suspensão do isolado VBISP02 (I e II), inoculando-se cada uma dessas misturas em 6 ovos embrionados SPF (200ul/ovo), sendo que os líquidos córion-alantóides colhidos desses ovos assim inoculados, foram denominados co-infecção M41+ VBISP02 / diluição I e co-infecção M41+ VBISP02 / diluição II.

Protocolo semelhante foi utilizado na co-infecção com as estirpes M41 e VBIPR02. Dessa forma, a estirpe VBIPR02 cuja  $DIE_{50\%} = 10^{9.5}/ml$  na razão 1:100000, inoculando na cavidade cório-alantóide de 5 ovos, sendo 200ul/ovo, tais ovos foram denominados ovos controle estirpe da estirpe VBIPR02. Em seguida adicionou-se 200uL da suspensão da estirpe M41 e 200uL da suspensão diluída da VBIPR02, sendo que as amostras de LCA colhidas foram denominadas de produtos da co-infecção M41+ VBIPR02.

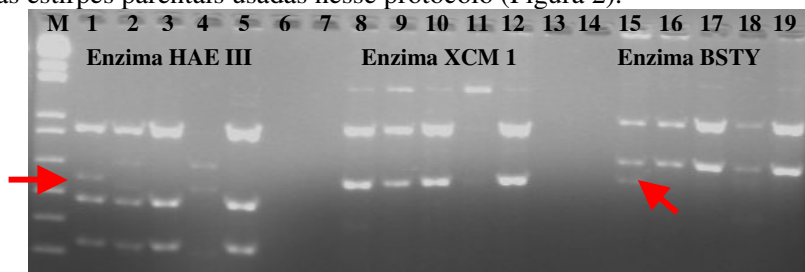
A partir das amostras (traquéia das aves infectadas e de líquido córion-alantóide dos ovos embrionados inoculados) foram re-isoladas progênies de vírus e feita extração do RNA genômico viral com o uso do kit Trizol (Invitrogen) para amostras teciduais e Trizol LS (Invitrogen) nas amostras de LCA, ambos seguindo-se recomendações do fabricante. Em seguida foi processada a reação de transcrição reversa (RT) em um Termociclador TECHNE PROGENE®. Após a obtenção do cDNA (RT) foi realizada a amplificação por PCR do gene de proteína estrutural S1 do VBI, utilizando os primers descritos por Kwon et al. (1993) resultando na amplificação de um fragmento com cerca de 1720 pb, que posteriormente foi purificado através do kit de extração GFX (Amersham, Biosciences). Após a purificação, o material amplificado foi submetido à análise por ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’- RFLP (enzimas de restrição Hae III, Bst I e Xcm I), tendo sido analisado o perfil de fragmentos do DNA clivado para se determinar o grau de identidade com os perfis obtidos com este mesmo gene proveniente das estirpes ou de referência (M41) ou de cada um dos isolados de campo do VBI utilizados para a indução da co-infecção.

Os resultados mostraram, para algumas estirpes obtidas em protocolos de co-infecção em ovos embrionados SPF, diferenças marcantes nos mapas de RFLP com relação aos mapas observados para as estirpes parentais usadas, revelando que tais estirpes virais devem ser recombinantes, pois delas foram gerados fragmentos de clivagem do DNA do gene S1 diferentes do que eram esperados para as estirpes parentais dentro dos quais ocorreram fortes evidências da recombinação gênica. Assim, tais evidências foram observadas analisando-se os mapas de restrição do gene S1 das estirpes geradas pelas co-infecções envolvendo as estirpes de referência M41 e a estirpe de campo VBIPR06 (diluição II), bem como quando se analisou o produto da co-infecção da estirpe de referência M41 com a estirpe isolada em campo VBISP02, principalmente quando se considera o mapa de restrição a digestão gerado pela enzima de restrição *Hae III* (Figura 1).



**Figura 1.** Gel de agarose 1 %, da reação de RFLP do produto PCR purificado proveniente de co-infecções em ovos. Legenda: (M) Marcador 1Kb plus, canaletas (1) e (9) Estirpe M41; canaletas (2) e (10) Produto Amplificado do isolado VBIPR06; canaletas (3) e (11) Produto Amplificado do isolado VBIPR02; canaletas (4) e (12) Produto Amplificado do protocolo I da co-infecção em ovos embrionados (M41 + VBISP02); canaletas (5) e (13) Produto Amplificado do protocolo II da co-infecção em ovos embrionados (M41 + VBISP02); canaletas (6) e (14) Produto Amplificado do protocolo I da co-infecção em ovos embrionados (M41 + VBIPR06; canaletas (7) e (15) Produto Amplificado do protocolo II da co-infecção em ovos embrionados (M41 + VBIPR06); canaletas (8) e (16) Produto Amplificado do protocolo I da co-infecção em ovos embrionados (M41 + VBISP02). ( → ) Fragmentos novos contendo possíveis regiões de recombinação.

Tais indícios de recombinação gênica foram verificados também na co-infecção de aves envolvendo principalmente a ave na qual nenhum tipo de vírus foi inoculado, mas ela apenas esteve exposta ao contato direto com aves previamente infectadas individualmente com uma das estirpes virais de campo VBIPR06, VBISP02 e também com a estirpe de referência M41, sendo que analisando-se o mapa de restrição, foram encontrados fragmentos genômicos de tamanhos diferentes daqueles observados na digestão das estirpes parentais usadas nesse protocolo (Figura 2).



**Figura 2.** Gel de agarose 1 %, da reação de RFLP do produto PCR purificado proveniente de co-infecções em aves. Legenda: (M) Marcador 1Kb plus, (1)(8)(15) Amostra tecidual de ave contato / co-infecção (M41 + VBISP02 + VBIPR06); (2)(9)(16) Ave co-infectada com M41 + VBIPR06; (3)(10)(17) Ave co-infectada com M41 + VBISP02 I; (4)(11)(18) Ave co-infectada com M41 + VBISP02 II; (5)(12)(19) Ave co-infectada com M41 + VBISP02 II; (6)(7)(13)(14) Amostra Controle. (→) Fragmentos novos contendo possíveis regiões de recombinação.

Ademais sendo, ficou comprovado, que com a utilização das diluições descritas anteriormente, o fenômeno da recombinação foi induzido, podendo-se concluir que as estirpes virais tiveram nesse caso, uma maior facilidade de interação e de fazer trocas de sequências gênicas (recombinação), uma vez que a digestão com as enzimas de restrição demonstraram cortes em diferentes regiões daquelas originalmente clivadas nas estirpes parentais. Para confirmar a ocorrência do fenômeno da recombinação gênica no atual projeto, pode-se fazer o sequenciamento genético das estirpes parentais comparando com as estirpes recombinantes e determinando-se, inclusive, os pontos nos quais ocorreram efetivamente as trocas de nucleotídeos nas sequências do gene S1 das estirpes recombinantes do VBI.

#### Referências Bibliográficas:

- 1) Cavanagh, D.; D Avis, P.J.; Cook, J.K.A. Infectious bronchitis vírus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathology*, v.21, p.401- 408, 1992.
- 2) Cook, J.K.A; Sarah, J.O.; Martyn, A.W.; Michael, B.H. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, v.28, p.477-485, 1999.
- 3) Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Gelb, J. Jr. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Length Polymorphism Analysis. *Avian Disease*, 37, 194-202, 1993.
- 4) Lin, Z. *et al.* A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch. Virol.*, 116, p. 19-31, 1991.
- 5) Martins, N.R.S. Alguns aspectos da etiopatogenia de bronquite infecciosa. In: CONF. APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. *Anais. Santos: FACTA*, 1992. p.145-150.
- 6) Murphy, F.H.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C.; Studdert, M.J. *Veterinary virology*. 3.ed. New York: Academic Press, 1999. p.495-509.
- 7) Owen R.L. *et al.* Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. *Avian Pathol.*, 20, 663-73, 1991.
- 8) Resende, J.S. *Genotipificação e filogenia de isolados de vírus oriundos de surtos de bronquite infecciosa das galinhas na avicultura industrial do Estado de Minas gerais, Brasil, no período entre 1972 e 1989*. 2003. 163p. Tese (Doutorado) - UFMG, Belo Horizonte, 2003.
- 9) Rocha, F.R.T. *Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas*. 2000. 31p. Dissertação (Mestrado) – UFMG, 2000.

**Bolsa:** CNPq/ PIBIC