

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU



1000220651

**Caracterização do Perfil Antigênico do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa
de Fabrício por meio da Tecnologia de Apresentação de Antígenos
Recombinantes em Fagos**

Fausto Emílio Capparelli

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

UBERLÂNDIA-MG
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
619:636.5
C247C
TES/men

**Caracterização do Perfil Antigênico do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa
de Fabrício por meio da Tecnologia de Apresentação de Antígenos
Recombinantes em Fagos**

Aluno: Fausto Emílio Capparelli

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Genética)

UBERLÂNDIA-MG
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização do Perfil Antigênico do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa
de Fabrício por meio da Tecnologia de Apresentação de Antígenos
Recombinantes em Fagos**

Aluno: Fausto Emílio Capparelli

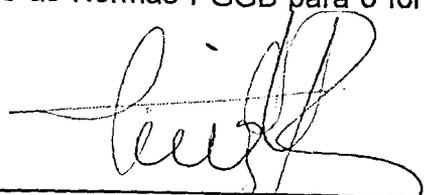
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Grantant (Orientador)

Examinadores: Marcelo de Macedo Brígido
Maria Gracilda de Souza

Data da Defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas



(Orientador)

Uberlândia, 14, 04, 05

Aos meus pais, dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a meus pais pelos conselhos sempre nas horas exatas, por nunca me deixarem cair e, quando caía, por me ajudarem sempre a levantar; agradeço meu irmão e a Julia por cuidarem dos dois para mim e também agradeço a Rose por cuidar do meu irmão e da minha sobrinha por mim. A todos eles e meus amigos “irmãos” Gustavo, Getulio (tia Isaura e Getulio, Patrícia e Priscila), Geraldo, Oduvaldo, Marcelo, Jorge, João Neto, Cristiano, Lenissa, Evelin, Larissa, Aline e Ligia, desculpem a ausência. Minhas tias Helena, Nancy e Lazara, obrigado... eu sei que vocês também rezaram por mim.

Meu orientador Luiz Ricardo Goulart, obrigado pela espera, paciência com as correções e mais uma vez pela oportunidade de aprendizado.

Ao grupo phage agradeço: ao Carlos e ao Guilherme pelas dicas sempre de grande valor, ao Rone pela prestatividade, a Ana Paula pelo aprendizado em conjunto, a Renata e a Andréia pelas insistentes ajudas que sempre me eram oferecidas e que me desculpem por quase sempre recusar, a Paula por me permitir auxiliar e, desta forma aprender mais e, em especial, pela Juliana que foi, sem dúvida, fundamental na realização deste trabalho... não sei se conseguiria sem a ajuda dela.

Agradeço ao pessoal da Granja Planalto: Daniel, Andréia, Ricardo (“grilo”), Guilherme, Carlos Roberto e Celso.

A minha nova grande amiga Cynara e aos meus velhos e grandes amigos do Laboratório de Genética Marcolino, Narcisa, Luciana e Flaviá que me ajudaram em outros projetos dentro e principalmente fora do Laboratório.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG, CAPES.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e aminoácidos.....	3
Resumo geral.....	5
General abstract.....	6
Introdução geral.....	7
→ Doença Infecciosa da Bursa (Gumboro)	7
→ Caracterização estrutural do vírus.....	7
Descrição molecular e imunogênica de <i>IBDV</i>	9
→ Epidemiologia.....	12
→ Diagnóstico e controle da doença.....	17
→ Controle de <i>vvIBDV</i>	18
<i>Phage display</i>	20
Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo único.....	33
Introdução.....	34
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Material e Métodos.....	39
Aves.....	39
→ Vacinação.....	39
Soroneutralização.....	40
Purificação de anticorpo em coluna de IgY.....	41
Diálise (Concentração de anticorpos)	41
Eletroforese por SDS-PAGE.....	42
<i>Biopanning</i> (seleção de fagos)	42
Titulação.....	45
Amplificação de fagos em <i>Deepwell</i>	46
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	47
Extração de DNA.....	48
Sequenciamento.....	48
Análise de dados pela Bioinformática.....	51
Resultados.....	52
Vacinação/Soroneutralização.....	52

Purificação de IgY em coluna.....	52
Diálise /Quantificação de IgY.....	53
Ciclos de Seleção dos Fagos.....	54
Amplificação em <i>Deepwell</i> //ELISA.....	56
Sequenciamento/Bioinformática.....	57
Antigenicidade.....	62
Predição de estrutura e acesso a solvente.....	68
Discussão.....	71
Referências Bibliográficas.....	80
Conclusão.....	85
ANEXO 1.....	86
ANEXO 2.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
aa	Aminoácido
BSA	Soroalbumina bovina
DNA	Ácido Desoribonucleico
OD	Densidade ótica
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	immunosorbent assay Enzyme linked
g	Gramas
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
l	Litro
M	Molar
ng	Nanogramas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
bp	Par de bases
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20 0.5%
PEG	Polietileno glycol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display</i> New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligants Contents
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
pfu	Unidades formadoras de colônias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α-D-galactosideo

IBD	Infectious Bursal Disease
IBDV	Infectious Bursal Disease Virus
vIBDV	very virulent Infectious Bursal Disease Virus
ORF	Open Reading Frame
RdRp	Rna dependente de RNA-polimerase
VP1	Proteína viral 1
VP2	Proteína viral 2
VP3	Proteína viral 3
VP4	Proteína viral 4
VP5	Proteína viral 5
VP2-3-4	Poliproteína 2-3-4
pVP2	Precursor de proteína viral 2
dsRNA	Double stranded RNA
mRNAs	RNA mensageiro
Ser	Serina
Lis	Lisina
VLP	vírus-like particles
BW	Body weight
VN	virus neutralização
IgG	Imunoglobulina tipo G
ST	<i>Salmonella typhimurium</i>
PIV	Proteína 4
PVI	Proteína 6
PVIII	Proteína 8
scFv	single chain fragment variable
EAV	virus da arterite eqüina
SPF	Specific pathogen free
IgY	Imunoglobulina tipo Y

Lista de aminoácidos

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

RESUMO GERAL

Doença infecciosa altamente contagiosa que acomete aves em idades iniciais, a Doença de Gumboro é causada por um vírus com capsídeo de simetria icosaédrica com tamanho médio de 60 nm e material genético não envolto, pertencente à família *Birnaviridae* e gênero *Avibirnavirus*, devido ao seu genoma ser composto de RNA de fita dupla. Esse material genético é subdividido em dois (A e B). Uma parte do segmento A codifica uma poliproteína que posteriormente é autoclivada em VP2, VP3 E VP4 e, a outra parte codifica uma proteína VP5. O segmento B codifica a RdRp VP1. Pela imunização de galos SPF, foi possível obter anticorpos em quantidade suficiente para realização do *biopanning* e subsequente teste ELISA para verificar a especificidade dos clones isolados antes do sequenciamento e análise dos dados das mesmas por bioinformática utilizando como parâmetro o genoma da cepa vvIBDV europeia UK661. Pelo uso da tecnologia de *phage display* foi possível isolar peptídeos que apresentaram homologia com resíduos de regiões imunogênicas da proteína VP2, além de algumas regiões importantes das proteínas restantes de IBDV.

Palavras-chave: Gumboro, IBDV, Phage display.

GENERAL ABSTRACT

Highly contagious and infectious disease that take hold of young chickens, the Gumboro Disease is caused by a virus with icosahedral capsid of approximately 60nm and non-enveloped genetic material, belonging to family *Birnaviridae* and genus *Avibirnavirus*, because of its genome composition of double-stranded RNA. This genetic material is bisegmented (A and B). One part of the A segment encodes a polyprotein which is autoclived into *VP2*, *VP3* and *VP4* and the other part encodes the protein *VP5*. The B segment encodes the RdRp *VP1*. By immunizing SPF chickens, we have obtained sufficient antibody for phage *biopanning*, followed by a subsequent ELISA immunoassay, in order to verify clone specificity, before sequencing and bioinformatics analysis, using as the genomic and proteomic parameters the European *vvIBDV* strain UK661. The *phage display* has allowed us isolating specific peptides, which presented homology with the *VP2* protein antigenic regions as well as to other important regions of the remaining viral proteins.

Key-words: Gumboro, *IBDV*, *Phage display*

INTRODUÇÃO GERAL

1. Doença Infecciosa da Bursa (Gumboro)

Foi inicialmente descrita por Cosgrove, 1962, próxima a uma localidade chamada Gumboro/Delaware/EUA, e foi caracterizada por depressão, anorexia, diarreia mucóide, alta morbidade, e mortalidade também relativamente alta. Foi denominada de nefrose aviária, substituída por Doença de Gumboro e atualmente é conhecida por Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício (*IBD*) (Fundação Apinco, 2000).

Doença infecciosa altamente contagiosa das aves, causada por um vírus (*IBDV-infectious bursal disease vírus*) que acomete principalmente a Bolsa de Fabrício de aves jovens. Células do tecido linfóide da bolsa, do tipo B, são as primeiras a serem atacadas (Fundação Apinco, 2000).

1.1 Caracterização estrutural do vírus

Existem muitos estudos contraditórios sobre características estruturais e biológicas do agente causador da doença infecciosa da bursa (*IBD*) (Doença de Gumboro) em galinhas e também sobre a posição taxonômica do vírus (Nick et al., 1976).

Descobriu-se que o RNA do vírus é apenas parcialmente resistente ao tratamento com RNase pancreática (RNA A), e tem sido proposto que ele possa ser composto principalmente de fita simples com algumas regiões conformacionais (dobras e pareamentos internos formando fitas duplas) (Müller et al., 1979).

Desde que a possibilidade de que o RNA do *IBDV* é fita dupla e que o material sensível à RNase representaria contaminação celular ainda permanece, estudos adicionais foram feitos levando em conta cuidadosos processos de purificação e critérios extras em relação à fita-dupla (Müller et al., 1979).

Fica claro por comparação entre 10 segmentos de RNA de fita dupla de um verdadeiro reovírus que a estrutura do RNA do *IBDV* é totalmente diferente do RNA de um reovírus (Nick et al., 1976).

Além do mais, estrutura antigênica, características de crescimento e patogenicidade distinguem *IBDV* de reovírus aviários. Tudo isso significa que é extremamente difícil poder classificar *IBDV* em um grupo taxonômico já estabelecido (Nick et al., 1976).

É possível que o genoma do *IBDV*, por ser RNA de fita dupla, possa tolerar um alto grau de sua estrutura secundária sem afetar a transcrição e replicação (Hudson et al., 1986).

Baseado nos três critérios de resistência a RNase, comportamento em relação à temperatura e composição de nucleotídeos, é possível firmemente estabelecer que RNA de *IBDV* é de fita-dupla (Müller et al., 1979).

As propriedades biofísicas e bioquímicas de *IBDV* não permitem que ele seja incluído em nenhum dos gêneros de vírus existentes. Sugere-se que ele deva ser considerado como um novo grupo a ser chamado coletivamente birnavírus. O sufixo "bi" significa duplicidade de fita, assim como a natureza bissegmentada do genoma do vírus, ao passo que "rna" indica a natureza do ácido nucléico do vírus (Dobos et al., 1979).

Dai o nome da família *Birnaviridae*, gênero *Avibirnavirus* (Dobos et al., 1979; Leong et al., 2000; Brown, 1986).

Existem dois sorotipos distintos de *IBDV*. As cepas do sorotipo 1 causam imunossupressão assim como a fase aguda da doença de animais jovens enquanto que as cepas do sorotipo 2 são avirulentas para galinhas comerciais. Sorotipo 1 representa a categoria de cepas virulentas clássicas, variantes antigênicas e cepas muito virulentas (*vvIBDV*) dependendo de suas patogenicidades e/ou antigenicidades (Islam et al., 2001; McFerran, et al 1980).

Os sorotipos são distinguidos por provas laboratoriais, diretas, que permitem a tipificação do vírus, e indiretas, que são úteis para comprovação da presença de anticorpos ou de antígeno específico. Uma cepa de vírus que induz à imunidade contra outra cepa, em determinada espécie animal, pode ser descrita como pertencente ao mesmo grupo imunológico. Distintos sorotipos diferem quanto a sua capacidade antigênica e imunogênica. O *IBDV* apresenta alta antigenicidade e alta imunogenicidade. A infectividade é elevada, pois pequenas doses do vírus são suficientes para a instalação da infecção na ave, sendo que a virulência varia com a cepa. Aves infectadas com uma cepa de vírus produzem anticorpos dirigidos para esta cepa homóloga. Os sorotipos

possuem grupos antigênicos comuns detectados por provas de ELISA ou por imunofluorescência indireta e, portanto, por sorologia não é possível distinguir sorotipos (Fundação Apinco, 2000).

Eletromicrografias mostraram partículas não-envoltas de simetria icosaédrica com um tamanho médio de 60nm (Nick et al., 1976).

Seu material genético possui no maior segmento do genoma (segmento A) uma *ORF* (*open reading frame*) que codifica uma poliproteína a qual é autocataliticamente clivada durante a tradução em duas proteínas estruturais *VP2* e *VP3* e em uma protease viral (Hudson et al., 1986; Azad et al, 1985). Uma segunda *ORF* ainda no segmento A, codifica uma proteína não-estrutural *VP5* (Muller and Becht, 1982). O segmento B codifica *VP1*, a qual é uma RNA polimerase dependente de RNA-RdRp (Spies et al, 1987).

As proteínas maiores são a *VP2* e *VP3*, representando respectivamente 51% e 40% do peso total, e as menores são a *VP1* e *VP4*, representando respectivamente 3% e 6%. As cepas ou tipos de cada sorotipo são resultantes de mutação genética, que ocorre nos aminoácidos localizados principalmente na proteína maior *VP2*, responsável pela resposta imune protetora contra *IBD*. Em 1999, foi descrito o ponto de mutação que afeta o aminoácido 222 da proteína *VP2* e que pode ser empregado para diferenciar as variantes ou cepas do *IBDV*. A maioria das cepas clássicas possui prolina, que nas variantes é substituída por serina ou treonina ou glutamina na posição 222 (Fundação Apinco, 2000).

1.2 Descrição molecular e imunogênica de *IBDV*

A porta de entrada mais comum do *IBDV* é a mucosa oral e, excepcionalmente, as vias respiratória ou ocular. Quatro a cinco horas após a entrada no organismo do animal, o vírus pode ser detectado em macrófagos e células linfóides do ceco, duodeno e jejuno, bem como nas células de Kupfer do fígado. Ao alcançar a corrente sanguínea, o vírus infecta outros tecidos incluindo a Bursa. A viremia prossegue e o vírus infecta outros órgãos como o baço, a glândula de Harder e o timo. Os linfócitos B e seus precursores parecem ser as principais células-alvo, embora os vírus possam ser

encontrados em macrófagos. Antígenos virais podem ser encontrados na bursa até nove dias após a infecção (Fundação Apinco, 2000).

Durante a infecção viral, a poliproteína *VP2-3-4* é clivada pela auto-protease *VP4* em *pVP2* (um precursor de *VP2*), proteínas *VP4* e *VP3* e, *pVP2* é subsequentemente clivada por um fator celular para a forma madura *VP2* que é encontrada dentro do interior do núcleo do capsídeo (Peters et al., 2004).

A presença, em células infectadas, de formas clivadas de *VP2* com maior mobilidade que *pVP2* em gel de eletroforese sugere que a tramitação de *pVP2* para *VP2* seja direcional e envolva uma cascata de clivagens proteolíticas começando na terminação COOH da *pVP2* progredindo através do sítio de clivagem de maturação final na posição 441-442. Quatro sítios alvo de clivagem estão envolvidos no processo de maturação da *pVP2* (Da Costa et al., 2002).

Os resultados revelaram que *pVP2* possui múltiplos domínios de interação, consistente com a informação estrutural disponível sobre esta proteína do capsídeo externo. Interações *VP3-VP3* foram mapeadas na parte amino-terminal do peptídeo. Interessante que este domínio é distinto de dois outros domínios de interação que ocorrem internamente na proteína do capsídeo: enquanto a ligação com *VP1* tem sido mapeada na região carboxi-terminal final da proteína, a interação com os segmentos de *dsRNA* (*double stranded RNA*) genômico tem sido postulada ocorrer exatamente desta região para a extremidade 5'. Nenhum sítio de interação pode ser associado com a proteína *VP4*; qualquer deleção aplicada abolia a auto-interação. Por fim, um domínio de interação foi detectado na região central mais hidrofóbica da *VP5*, sustentando a idéia que essa virulência determinante pode funcionar como uma proteína formadora de poros na membrana em células infectadas (Tacken et al., 2003).

A *VP2*, e não a *VP3*, está envolvida no reconhecimento de receptores, o que implica que no mínimo parte de *VP2* deve estar presente na superfície do virion. Além disso, anticorpos neutralizadores são induzidos somente por *VP2* e não por *VP3*, o qual é também um indicativo da exposição de *VP2* na superfície (Boot et al., 2001).

Uma consideração adicional que deve ser mantida em mente é ao passo que *VP2* é amplamente aceita como sendo um dos genes chave na determinação da virulência para *IBDV*, ela não parece ser o único determinante do fenótipo de *vvIBDV* porque um vírus recombinante contendo a seqüência da *VP2* da cepa de *vvIBDV* mostrou-se falha na indução de morbidade e mortalidade (Boot et al., 2000).

VP1 é considerada como polimerase RNA-dependente de RNA (RdRp) responsável pela replicação do genoma e síntese de mRNAs (Lombardo et al, 1999).

Com exceção da *VP1*, a qual interage fracamente, todas as outras proteínas parecem auto-interagir fortemente (Tacken et al., 2003).

Além disso, a polimerase (*VP1*) de *IBDV* virulento carrega o determinante para a replicação viral célula-específica. Foi demonstrado também que esta mesma proteína carrega determinantes para replicação célula-específica de *IBDV* (Brandt et al., 2001).

Formação do complexo *VP3-VP1* deve ser um passo crítico para a geração de *IBDV* infectivo. Por esta razão, parece possível que bloqueando esta interação poderia interferir no processo de replicação viral. A caracterização desta interação pode indicar novas formas de controle da disseminação de *IBDV* (Lombardo et al, 1999).

Testes com imunofluorescência, rastreamento microscópico com laser confocal e análises de imunoprecipitação conclusivamente mostraram que *VP1* formam complexos com o polipeptídeo estrutural *VP3*. A formação de complexos *VP1-VP3* parece ser um passo chave para a morfogênese das partículas de *IBDV* (Lombardo et al, 1999).

Não se pode esquecer que no caso dos vírus menos patogênicos, estes não vão demonstrar na maioria das vezes, os sinais clínicos clássicos da Doença de Gumboro, mas irão causar o processo de imunossupressão e através do mesmo, os problemas secundários intercorrentes ganham força e se manifestam, causando grandes perdas econômicas para os produtores avícolas, o que leva as aves a uma maior susceptibilidade a outras doenças secundárias, como Dermatite Gangrenosa, Artrite Bacteriana e mesmo a Doença de Marek. Há uma marcante susceptibilidade ligada à idade, sendo

que só as aves jovens, mais suscetíveis que adultos, as únicas a desenvolver doença com lesões de diferentes intensidades (Fundação Apinco, 2000).

Do ponto de vista epidemiológico, isolados de VDIB que afetam outras aves que não as comerciais podem representar peças do quebra-cabeça a respeito do entendimento da epidemiologia da *IBD* (Tan et al., 2004).

1.3 Epidemiologia

A infecção com *IBDV* muitas vezes resulta em imunossupressão. Os efeitos imunossupressivos parecem ser os mais pronunciados se a exposição ao vírus ocorrer dentro das 2-3 primeiras semanas de eclosão dos ovos (Allen et al., 1972). Em bandos aviários comerciais, a imunossupressão pode ser clinicamente manifestada de varias formas. Em geral, a performance do bando é reduzida. Especificamente, bandos imunossuprimidos, tendem a apresentar uma alta incidência de infecções secundárias, pobre conversão alimentar, redução de resposta protetora a vacinas usadas comumente e um aumento na reprovação de carcaça no processamento de indústrias (Sharma et al., 2000).

Durante a fase aguda da infecção com *IBDV*, macrófagos do baço exibem um notável aumento na expressão de um número de genes de citocinas (Sharma et al., 2000).

As lesões detectadas são de natureza hemorrágica, nos músculos das pernas, coxas e proventrículo, e a Bolsa de Fabrício é edematosa e aumentada de volume e/ou hemorrágica (Fundação Apinco, 2000).

Lesões microscópicas e macroscópicas no timo são superadas e este retorna ao seu estado normal em poucos dias de infecção viral (Sharma et al., 2000).

Verificou-se que a fluorescência específica positiva foi detectada primeiramente em intestinos, e em seguida no fígado e baço, depois na M.C.A. e por último na bolsa de Fabrício. Diante disso aventou-se a hipótese de que os intestinos correspondem ao local de multiplicação primária do *IBDV*, mesmo quando se utilizou da M.C.A. como via de inoculação do vírus. Acredita-se que a distribuição do *IBDV* para os outros órgãos só ocorra após a primeira viremia. Esta viremia depende da chegada dos macrófagos e células linfóides

intestinais, com o vírus na veia porta. Através desta veia, as partículas virais atingirão os demais órgãos (Lima et al., 1996).

Células linfóides na Bursa de Fabrício são as células alvo de cepas do sorotipo 1 de *IBDV*. Entre 3 e 6 semanas após entrar em contato, quando a Bursa de Fabrício atinge seu desenvolvimento máximo, as galinhas estão altamente susceptíveis ao vírus. A infecção resulta em depleção linfóide e a final destruição da Bursa como característica predominante da patogênese IBD. Na forma clássica do surto, a taxa de mortalidade pode alcançar de 1 a 50%. Nas aves destinadas ao abate (produção de carne), infecções podem resultar em até 50% de morbidez, mas mortalidade é raramente superior a 3% em bandos com idade de 3 a 6 semanas. Em Leghorns comerciais híbridos de postura, as perdas podem alcançar 20% em bandos susceptíveis. Depressão na produção de ovos, deterioração de suas cascas e queda da qualidade interna em bandos de galinhas do tipo poedeiras também é observado. Em adição à mortalidade, *IBDV* é imunossupressivo. Nas aves de abate, essa imunossupressão é denotada por uma alta prevalência de infecções respiratórias virais e elevada mortalidade devido à airsacculitis e colisepticemia durante a o terço terminal do ciclo de crescimento de 6-8 semanas. Tanto bandos de aves para abate quanto poedeiras podem se tornar refratários às vacinas vivas atenuadas contra doenças respiratórias tais como bronquite infecciosa e Newcastle (Muller et al., 2003).

Com sete dias PI (pós-infecção), quando se espera que a maioria dos linfócitos da Bursa de Fabrício tenha se tornado células T, uma suspensão de células individuais do tecido da Bursa foi preparada e as células foram analisadas através de inúmeros ensaios. Os resultados revelaram que: células T da bursa apresentavam em sua superfície elevada expressão de receptores para *MHC* de classe II e receptores *IL-2*; células da bursa tinham expressão elevada de citoquinas tais como *IFN-γ* e fatores tipo *IL-6*; células T da bursa de galinhas infectadas com *IBDV* proliferaram quando estimuladas *in vitro* com *IBDV* purificado e; células T da bursa inibiram resposta mitogênica de splenócitos normais e histocompatíveis de uma maneira dose-dependente. A inibição mitogênica foi mediada por células $CD4^+$ (Sharma et al., 2000).

As características de um isolado denominado 94268 foram consistentes com de cepas de *vvIBDV*, por isso ela pode causar alta mortalidade, lesões

histológicas visíveis e severas e, ainda possui todos os marcadores moleculares de *vIBDV* (Tan et al., 2004).

Vasconcelos and Lam, 1994, sugeriram que o efeito imunossupressor de alguns isolados de *IBDV* pode estar relacionado com sua habilidade de desencadear apoptose de precursores de linfócitos B infectados. A infecção com estes vírus destruiria a bursa de Fabrício na ausência de resposta inflamatória levando à imunossupressão de galinhas infectadas.

Estudos prévios examinando o efeito da expressão de *VP2* em linhagens de células têm gerado resultados conflitantes assim como no papel da *VP2* na indução de apoptose. No presente estudo, não houve evidência de toxicidade ou crescimento reduzido de células expressando a proteína *VP2* (Peters et al., 2004).

A descoberta de que *VP2* é um indutor apoptótico pode gerar alguma idéia na busca por fatores envolvidos na patogenicidade do vírus (Fernandez-Arias et al., 1997).

Transfecção de cultura de células com vetor de expressão contendo a região codificante da *VP2* sobre o controle da região *enhancer*-promotora do citomegalovírus humano também desencadeia morte celular programada. O efeito apoptótico da *VP2* é neutralizado por coexpressão do proto-oncogene *bcl-2* (Fernandez-Arias et al., 1997).

Foi mostrado que dois longos peptídeos de 7 aminoácidos não são essenciais para viabilidade viral, em contraste com dois peptídeos localizados nos finais do domínio característico da *VP2*. Estes peptídeos essenciais parecem desenvolver um importante papel no ciclo do vírus. Foram identificados no mínimo três (mais provavelmente quatro) peptídeos derivados do domínio específico *VP2* e mostrou-se que esses peptídeos estão associados com as partículas virais. Suas presenças nas partículas virais foram reveladas usando diferentes estudos bioquímicos, incluindo sequenciamento N-terminal e espectrometria de massa. Estes peptídeos são constituídos de diferentes trechos de aminoácidos, 442 a 487, 488 a 494, 495 a 501, e 502 a 512, e juntos, eles definem o domínio associado à clivagem para maturação da *pVP2*. Deleções nos trechos de aminoácidos de 488 a 494 e de 495 a 501 permite a produção de vírus infeccioso, mesmo esse clone parecer replicar menos eficientemente que o tipo selvagem. Substituições em diferentes

posições nestes dois peptídeos pareceram ser permissivas à replicação do vírus. Estes resultados mostraram que esses dois peptídeos com seqüências praticamente idênticas têm a mesma, mas acessória, função no ciclo viral. Em contraste, deleções dos trechos de aminoácidos de 442 a 487 e de 502 a 512 não permitia o resgate de vírus infecciosos. Cada um dos 6 resíduos do trecho de aminoácido de 504 a 509 foi demonstrado ser essencial para recuperação do vírus (Da Costa et al., 2002).

Resultados indicam que a *VP2* carrega o principal determinante para o tropismo celular em *IBDV*. Células bursíticas possuem receptores virais, o que é observado em células de cultura de tecidos, os quais interagem com *VP2*. Ainda, foi demonstrado que *VP2* contem os determinantes para o fenótipo de virulência e patogenicidade do *IBDV* (Brandt et al., 2001).

Outros resultados contrastam tal fato na medida em que postulam que *VP2* não é o único determinante para o fenótipo de alta virulência, devido ao fato de que seus vírus recombinantes contendo *VP2* de cepas de alta virulência, não induziram morbidez ou mortalidade (Boot et al., 2000).

Interações das proteínas virais entre si e entre proteínas virais e hospedeiras desempenham um papel central no processo de infecção. Dentre estas interações incluem as transitórias e as associações de vida longa. Ainda, essas interações estabelecem complexos funcionais essenciais responsáveis por processos como replicação viral do genoma, transcrição e tradução do RNA, montagem e liberação do vírus. Identificação de tais interações proteína-proteína é, portanto de vital importância para um melhor entendimento da dinâmica de multiplicação viral (Tacken et al., 2003).

Utilizando ensaios com leveduras, não foi possível detectar interações entre as duas proteínas do capsídeo *pVP2* e *VP3*, mas, interação entre a última e *VP1*, presumivelmente responsável por moldar a polimerase em partículas virais montadas, foi claramente demonstrada (Tacken et al., 2003).

Estas interações homotípicas encontradas para *pVP2*, *VP3*, *VP4* e *VP5* foram confirmadas por coimunoprecipitação de formas de proteínas marcadas e não marcadas. Subsequentemente foram realizados estudos de deleções para mapear os domínios de auto-interação em cada uma destas proteínas. Aparentemente as diferentes proteínas interagem através de diferentes domínios dos quais para a proteína *VP3* foi encontrado um domínio em adição

aos outros demais que esta envolvido na associação com *VP1* e com o dsRNA genômico de ambos os segmentos A e B (Tacken et al., 2003).

Ambas as metades amino-terminal e carboxi-terminal da proteína *pVP2* foram capazes de interagir entre si com o polipeptídeo inteiro, sugerindo que as interações homotípicas entre moléculas de *pVP2* são baseadas em mais de um sitio de contato. Para a *VP3* os domínios críticos para interação estão localizados na parte amino-terminal. Interação *VP4-VP4* parece ser extremamente sensível à modificações. Qualquer deleção que se aplica parece ser invariavelmente letal. No entanto, a interação *VP5-VP5* se mostra tolerante à deleções (Tacken et al., 2003).

Foi proposto que a protease *VP4* contém no seu sitio ativo Lis-674, a qual age como base geral na ativação de Ser-633 nucleofílica. Estes dois resíduos são conservados nas seqüências de *VP4* de todas as cepas de *IBDV*. Neste estudo, primeiramente foi utilizado mutagênese sitio-direcionada para determinar a importância de dois resíduos homólogos de *VP4* de *IBDV* para sua atividade de protease. Ser-652 e Lis-692 foram de crítica importância para sua função. É provável que Ser-652 represente o resíduo nucleofílico porque sua substituição por treonina ou alanina aboliu completamente a atividade de auto-clivagem da poliproteína, ao passo que sua substituição por cisteína, a qual pode agir como nucleofílica em diversas proteases virais (Babé and Craick, 1997), deu origem a uma proteína mutante com boa atividade. Por fim, todas as substituições de Lis-692 resultaram em completa inativação da atividade de protease, podendo sugerir fortemente que este resíduo age como base geral do sitio catalítico (Lejal et al., 2000).

Foi demonstrado que adição de uma proteína no núcleo da proteína *VP3* do capsídeo de *IBDV* desencadeia a montagem de VLP (vírus-like particles) em um sistema recombinante de expressão. Uma forte correlação entre a formação eficiente de VLP e a maturação de *pVP2* e *VP2* foi demonstrada, sugerindo que a clivagem de *pVP2* para *VP2* é direcionada por uma pré-montagem inicial de *pVP2* nos virions prematuros (Chevalier et al., 2002).

Um estudo determinou por quanto tempo níveis diferentes de anticorpos derivados maternalmente poderia proteger filhotes em experimentos de prova com *IBDV*. Os resultados deste trabalho indicaram que o decaimento de anticorpos derivados maternalmente é aproximadamente linear. Filhotes sem

anticorpos maternos foram susceptíveis ao vírus em diversas idades testadas, como foi demonstrado na queda da proporção bursa/peso corporal e na atrofia difusa de todos os folículos bursíticos. Filhotes com níveis médios de anticorpos maternos foram refratários à infecção em 1-2 semanas de idade, que pôde ser demonstrado pelos níveis da proporção bursa/BW, os quais foram similares com os controles, pelas imagens microscópicas de tecidos da bursa, e os declínios de títulos da VN (vírus neutralização) após cinco dias de desafio posterior. Filhotes com altos níveis de anticorpos maternos foram resistentes ao vírus quando desfiados com 1, 2 e 4 semanas de idade, como demonstrado pela ausência da atrofia da bursa, histologia normal de tecidos da bursa e um contínuo declínio nos títulos da VN com cinco dias de desafio posterior. Em conclusão, estes resultados demonstraram o importante papel de anticorpos derivados maternalmente e seus títulos na proteção de filhotes recém-chocados contra *IBDV* quando expostos ao vírus em diferentes idades. Os níveis de anticorpos maternos por VN é uma ferramenta conveniente para o prognóstico de quando os filhotes estarão suscetíveis à doença para planejar uma estratégia de vacinação apropriada. Optou-se por usar VN neste estudo porque os resultados deste teste são mais confiáveis do que o ELISA, além de ser específico para o tipo de vírus usado no teste, ao passo que os vírus usados em ELISA podem não ser distinguidos entre os sorotipos deste vírus (Al-Natour et al., 2004).

Coinfecção da variante *E-IBDV* pode causar patologias significantes à bursa de Fabrício resultando em falha na resposta de anticorpos contra ST (*Salmonella typhimurium*), especialmente do isotipo IgG (Bautista and Elankumaran, 2004).

1.4 Diagnóstico e controle da doença

Um portador ou vetor seja mecânico ou biológico, pode desenvolver um papel na epidemiologia de *IBD*. Funcionários descuidados de algumas granjas, por exemplo, podem inadvertidamente se tornar portadores mecânicos de objetos infecciosos e espalharem o vírus para o ambiente. Outra rota plausível para a transmissão seria então os pássaros selvagens, os quais são mais prontamente aptos para alcançarem as dependências comerciais das propriedades (Tan et al., 2004).

A biossegurança é uma importante medida na prevenção de doenças aviárias; no entanto, *IBDV* é altamente resistente a condições adversas do meio ambiente, resultando na sua persistência nas granjas; por isso, o controle dessa doença é baseado principalmente na vacinação (Al-Natour et al., 2004).

No Japão, foi demonstrado que pássaros sedentários eram soropositivos para *IBD* e, sugeriu-se que ainda desenvolviam um papel na disseminação do *IBDV*. Além do mais, pássaros migratórios podem espalhar o vírus de um país para outro (Ogawa et al., 1998).

O controle desta doença é realizado através de programas de vacinação, sendo que um dos fatores preponderantes para sua eficiência está relacionado com as diferenças antigênicas (principalmente da proteína *VP2*) entre os *IBDVs* de campo e as cepas vacinais. (Conferência Apinco, 1998).

Para o diagnóstico de infecções pelo *IBDV*, utilizam-se metodologias variadas, contudo recomendam-se o isolamento e identificação do agente viral como técnica mais segura de diagnóstico (Lima et al., 1996).

Em 1985 foram desenvolvidas e empregadas vacinas vivas e inativadas contra as diferentes variantes antigênicas. Novamente, os vírus de campo suplantaram o nível de imunidade conferido pelas vacinas intermediárias concomitantemente com outros fatores concorrentes de imunossupressão. Com o aparecimento das cepas *vvIBDV*, passou-se a exigir o desenvolvimento de vacinas do tipo intermediária plus (Fundação Apinco, 2000).

1.4.1 Controle de *vvIBDV*

O *vvIBDV* é um vírus mais patogênico que consegue vencer a barreira dos anticorpos maternos antes que as vacinas intermediárias convencionais o façam, logicamente que está na dependência da concentração do mesmo no ambiente. Baseado nisto viu-se que em alguns poucos lugares, no início do problema em 1998, foi possível contornar a doença com as vacinas intermediárias convencionais, pois se deu grande atenção aos processos de limpeza, desinfecção, troca de cama, vaso sanitário, etc., o que reduziu a contaminação local. Mas na grande maioria só se conseguiu sucesso após a introdução das vacinas mais invasivas, e em outros poucos, com o uso de amostras fortes que são mais invasivas que as intermediárias convencionais e

plus e que conseguem vencer mais cedo a barreira dos anticorpos maternos e chegar à bolsa estimulando a proteção (Fundação Apinco, 2000).

As características clínicas e patológicas dos surtos de *vvIBDV* na América Latina têm sido similares às reportadas na Europa, Ásia e África. Esta forma severa da doença de Gumboro representa um problema sério de saúde para a indústria de granjas da América Latina e eventualmente pode representar uma ameaça para a indústria avícola dos EUA. Desta maneira, é importante estudar a situação do *vvIBDV* nas Américas (Banda and Villegas, 2004).

As cepas de *IBDV* associadas com severos surtos clínicos de IBD no Brasil, República Dominicana e Venezuela exibiram características, em relação a nucleotídeos e aminoácidos, que também estão presentes na maioria das cepas de *vvIBDV* detectadas na Europa, Ásia e África. Estes resultados poderiam sugerir que cepas de *vvIBDV* detectadas na América Latina podem ter sido originadas de cepas de *vvIBDV* que foram prevalentes em outras partes do mundo, especialmente Europa ou Ásia. No entanto, como estas cepas alcançaram as Américas ainda é desconhecido (Banda and Villegas, 2004).

Estudos contínuos de características genéticas de novos vírus emergentes e o estabelecimento de suas relações genéticas são fatos chave para o entendimento da epidemiologia desta doença (Banda and Villegas, 2004).

Repetidas vacinações com cepas vacinais intermediárias e intermediárias plus têm-se revelado de eficiência variável, pois a implementação de cepas vacinais somente, não garante o controle. Devem-se associar medidas bem mais amplas de biossegurança. Há indicações de instalações contaminadas por longo tempo, pois a renovação de aves conduziu à repetição de casos (Fundação Apinco, 2000).

Posições críticas de aminoácidos nos picos hidrofílicos centrais da *VP2* são de superior importância para antigenicidade de *vvIBDV* (Etteradossi et al., 1998).

De acordo com as características genéticas do gene da região hipervariável *VP2*, os *vvIBDV* detectados na América Latina podem ter

emergido de cepas *vVBDV* de outras partes do mundo especialmente Europa e Ásia (Banda and Villegas, 2004).

2. *Phage display*

Esforços em determinar funções de novos produtos gênicos identificados por sequenciamento de genomas têm se tornado um importante desafio científico. Identificar proteínas que interajam com estes novos produtos gênicos pode ajudar na dedução de sua ação, regulação e potencial papel em doenças (Benhar, 2001).

Anticorpos representam uma intrigante classe de proteínas, não somente por causa da sua inerente capacidade de reconhecer um excesso de epítopos com alta afinidade e especificidade, mas também por causa de sua estabilidade e a possibilidades de se montarem (Kretzschmar and von Ruden, 2002).

O advento da genética molecular tem potencializado o estudo de interações proteína-ligante propiciando meios de produzir moléculas raras em grandes quantidades via sistemas de expressão gênica e focando em regiões específicas ou resíduos de proteínas usando mutagênese sitio dirigida. No entanto as tecnologias mais comumente usadas na identificação de interações ligante-proteína são laboratorialmente intensivas e muitas vezes não receptivas em avaliações para alta capacidade de processamento de múltiplos produtos gênicos (Benhar, 2001).

A produção de novas drogas há muito tempo está envolvida na busca, entre centenas de milhares de componentes usando testes de screening *in vitro* muito bem definidos, do rendimento do que havia sido escolhido para mimetizar o mais próximo possível, a atividade *in vivo* da nova droga. Hoje, novas metodologias com bibliotecas oferecem muitas alternativas e no mínimo ótimos direcionamentos, combinando a geração de bilhões de componentes com um rápido screening ou procedimentos de seleção para identificar os candidatos de maior interesse. *Phage display* tem provado ser uma técnica muito poderosa na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões de diferentes peptídeos ou proteínas. A metodologia de bibliotecas mais amplamente utilizada é baseada no uso de fago filamentosos (Smith 1985),

um bacteriófago que infecta *Escherichia coli* do gênero masculino (Benhar, 2001).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando *pili* como receptores. Partículas de fagos filamentosos (Ff-cepas M13, f1 e fd) que infectam *E. coli* via F *pili*, consiste em uma fita simples de DNA que é envolvida em uma cápsula protéica. Um fago viável expressa 3 a 5 cópias do gene III (g-3) que codifica a proteína de adsorção pIII composta de 406 aminoácidos, a qual é uma das menores proteínas capsidiais de fago filamentosos, na sua ponta/extremidade (Azzazy and Highsmith, 2002).

Phage display é baseado em clonagem de fragmentos de DNA codificante de milhares de variantes de certos ligantes (ex: peptídeos, proteínas ou fragmentos destas) no interior do genoma de fagos, fusionado ao gene codificante de uma das proteínas do capsídeo deste fago (geralmente PIII, como dito anteriormente, mas também PIV, PVI ou PVIII). A respeito de expressão, a fusão com a proteína do capsídeo é incorporada à novas partículas de fago que são montadas no espaço periplasmático da bactéria. Expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético reside no interior do fago (Benhar, 2001).

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da g3p do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* do gênero masculino. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriana em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como template para expressão das proteínas de fago gp3 e gp8. A progênie de fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsos através da membrana bacteriana no meio (Azzazy and Highsmith, 2002).

Esta conexão entre genótipo e fenótipo permite o enriquecimento de fagos específicos como, por exemplo, ao usar um alvo imobilizado numa placa

de microtitulação. O fago que apresentar na sua superfície um ligante relevante é retido em virtude da sua ligação com este alvo, ao passo que fagos não ligados são lavados/descartados. Fagos ligados são recuperados da superfície, usado para reinfetar bactérias que se reproduzem para enriquecimento adicional e para eventual análise da ligação. O sucesso da ligação por *phage display* depende da combinação da exposição e do método de enriquecimento juntamente com a síntese de grandes repertórios combinatoriais em fagos (Benhar, 2001).

Pesquisas na literatura mostram que bacteriófago filamentosos tal como M13 e sua proteína capsidial III (pIII) são mais normalmente usados para exposição de anticorpos, apesar de que mostrou-se que bacteriófagos T7 também podem ser usados na exposição de anticorpos (Rosenberg et al., 1996).

Bibliotecas de anticorpos em fagos são efetivas em pequenas concentrações, o que permite uma miniaturização do processo. Desde que muitos protocolos estão receptivos a padronização e automação de processos, sistemas de alto rendimento têm sido inventados para uma rápida e robusta produção de anticorpos (Krebs et al., 2001).

Anticorpos selecionados de bibliotecas de fagos nem sempre se encaixam para uma direta aplicação como terapia ou reagentes biotecnológicos. Para alguns casos, manipulação de afinidade, valência, especificidade ou estabilidade de anticorpos era requerida. Para tais casos, *phage display* foi aplicado de maneira similar ao processo de produção de bibliotecas sintéticas e selecionar os melhores ligantes através delas (Benhar, 2001).

Phage display tem sido usado para desenvolvimento de vacinas, mas seu uso maior está envolvido na identificação de epítomos imunogênicos ou mimetopos em peptídeos expostos. Estas poderão ser as moléculas de maior destaque no desenvolvimento de novas vacinas. Em somente um apanhado de casos, estão sendo usados os fagos ligados a peptídeos de interesse para imunização (Benhar, 2001).

Willis et al. (1993) usaram determinantes antigênicos da proteína de esporozoítos circulante do parasita da malária, *P. falciparum*, em múltiplas cópias de pVIII de fagos Fd.

Recentemente, Zuercher et al. (2000) testaram o efeito da exposição de fagos em fluido gástrico. Este teste foi examinado, pelo fato de que a condição essencial para vacinas orais é a habilidade de sobreviver nas condições inóspitas do meio estomacal, mantendo sua estrutura intacta.

Epítomos ou mimetopos isolados por *phage display* pode emergir como uma ferramenta útil no desenvolvimento de vacinas ou servir como próprio vetor no transporte da vacina. Para aplicação de *phage display* como vacina, uma exposição polivalente ao invés de uma monovalente parece que elucidaria melhor uma eficiente resposta imune, já que a administração oral é a rota mais efetiva para imunização e o adjuvante neste caso não é requerido (Benhar, 2001).

Tais protocolos de imunização podem ser mais baratos e efetivos do que métodos convencionais de síntese e acoplamento de ligantes de peptídeos a carreadores sintéticos para imunização (Benhar, 2001).

Alem do mais, um estudo recente implicou que bibliotecas universais são fontes mais ricas de anticorpos contra marcadores em superfícies celulares quando comparadas às bibliotecas de imunização, pelo fato de que mecanismos de tolerância *in vivo* poderiam deletar clones de anticorpos reativos contra antígeno de superfície celular do repertório imune (Roovers et al., 2001).

Durante os últimos 10 anos, exposição de anticorpos em fagos (*phage display*) tem se transformado em uma técnica bem aceita e, num pequeno espaço de tempo tem gerado anticorpos de altíssima qualidade. Anticorpos derivados por *phage display* têm provado sua segurança e eficácia em testes clínicos. Processos de seleção adaptados à técnica, em combinação com anticorpos de fácil montagem, abrem amplamente as portas para desenvolvimento sofisticado de anticorpos como medicamentos. Em adição, estes anticorpos selecionados por *phage display* oferecem maiores vantagens em termos de velocidade e rendimento para pesquisa e identificação/validação de alvos. *Phage display* já é parte de uma moderna forma de descoberta de novas drogas (Kretzschmar and von Ruden, 2002).

A seleção de bibliotecas *in vivo* permite o resgate de fagos que se direcionam seletivamente ao órgão alvo por exposição de peptídeos em

superfície se ligando a receptores vasculares tecido-específicos (Trepel et al., 2002).

No método de seleção *in vivo*, os repertórios de fagos são diretamente injetados em animais e depois os tecidos são coletados e examinados na busca por ligações de fagos a marcadores celulares endoteliais tecido-específicos como foi dito para peptídeos em fagos (Pasqualini and Ruoslahti, 1996).

Biopanning in vivo tem muitas vantagens: (i) os peptídeos isolados se direcionam seletivamente para alvos de interesse "intactos"; (ii) um passo inerente de bloqueio é incluído onde muitos dos peptídeos expostos no fago que reconhecem plasma e proteínas generalizadas de superfícies celulares são eliminados; (iii) estes peptídeos podem ser úteis para análises funcionais de novos receptores e para uma potencial identificação de novos alvos candidatos para medicamentos, porque alguns dos peptídeos isolados parecem ter se ligado a receptores endoteliais expressos no sistema vascular de alguns tecidos específicos (Azzazy and Highsmith, 2002).

Apesar da técnica de *phage display* ter sido primeiramente introduzida há aproximadamente 15 anos, as aplicações e desenvolvimento desta tecnologia estão apenas começando a ser exploradas. Essa exploração da tecnologia de *phage display* irá levar à produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades predefinidas. Além disso, tecnologias emergentes baseadas em *phage display* irá beneficiar diagnósticos através da produção de moléculas que de outras formas seria impossível obter por métodos tradicionais. Especificamente, anticorpos recombinantes contra antígenos tóxicos ou seqüências conservadas e carboidratos podem ser isolados (Soderlind et al., 2000).

Certas estratégias de seleção empregadas por *phage display* tais como seleção *in vivo* e seleção em células permite o isolamento de anticorpos recombinantes que unicamente reconhecem epítomos conformacionais ao invés de seqüências primárias. Finalmente, um moderno planejamento de diagnóstico seria um anticorpo recombinante fusionado na superfície de um biossensor capaz de gerar detecção em tempo real de antígenos-alvo (Azzazy and Highsmith, 2002).

Peptídeos obtidos pela tecnologia de *phage display* podem exercer um efeito anticancerígeno por inibição de angiogênese, decréscimo na atividade metastática do tumor ou inibindo enzimas importantes para disseminação de células neoplásicas. Eles também podem ser usados como componentes de vacinas antitumor ou veículos para carrear citocinas, quimioterápicos ou oligonucleotídeos anti-senso para tumor. Essa tecnologia permitiu ainda o desenvolvimento de anticorpos recombinantes anticâncer, mais comumente usados como moléculas *scFv* (*single chain fragment variable*), as quais podem ser modificadas para aumentar sua afinidade e avidéz. Eles podem ainda ser conjugados com moléculas que induzem diferentes efeitos antigênicos (Borysowski and Gorski, 2004).

A tecnologia de *phage display* tem apresentado o maior impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e outros fármacos, e tem ganhado importância no estudo de plantas (Willats, 2002).

Com anticorpos de *phage display*, as seqüências que codificam as proteínas expostas são derivadas de genes que codificam elementos chave de anticorpos naturais que determinam a ligação (Willats, 2002).

Esta técnica será bastante útil na seleção de fagos ligantes apresentando as regiões antigênicas originais de outros vírus no intuito de definir resíduos cruciais de aminoácidos dos seus epítomos conformacionais, principalmente vírus que não se desenvolvem em cultura celular (Cui et al., 2003^a).

Os trabalhos com o uso da técnica *phage display* abrangem desde soluções de problemas agropecuários, como é o caso do presente estudo, como os mais diversos estudos a respeito de enfermidades humanas como o estudo do vírus da Dengue (Wu et al., 2001), do vírus da AIDS (Guardiola et al., 2001), hepatite E (Gu et al., 2004), hepatite B (Lu et al., 2004; Zhang et al., 2004), hepatite A (Kim et al., 2004^a), hepatite C (Cao et al., 2003; Zhang et al., 2003; Houshmand and Bergqvist, 2003; Petit et al., 2003) e até mesmo ao mal de Parkinson (Gearhart et al., 2002).

Este trabalho tem como objetivo isolar peptídeos específicos contra o vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício pelo uso de biblioteca randômica de peptídeos recombinantes (*phage display*) para a identificação e caracterização de prováveis epítomos funcionais das proteínas virais que

possam ser utilizados no desenvolvimento de novas vacinas ou diagnósticos para o controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Al-Natour, M.Q., Ward, L.A., Saif, Y.M., Stewart-Brown, B., D. Keck, L., 2004. Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on Protection Against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 48, 177-182.
- Allen, W.H., Faragher, J.T., Cullen, G.A., 1972. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chicken immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 90, 511-2.
- Azad, A.A., Jagadish, M.N., Brown, M.A., Hudson, P.J., 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a Birnavirus. *Virology* 161, 145-152.
- Azzazy, H.M., Highsmith, W.E. Jr., 2002. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.* 35, 425-45.
- Babé, L.M., Craik, C.S., 1997. Viral proteases : evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell* 91, 427-430.
- Banda, A., Villegas, P., 2004. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48, 540-9.
- Bautista, D.A., Elankumaran, S., 2004. Heckert, R.A. Effect of a Variant Infectious Bursal Disease Virus (E/Del) on *Salmonella typhimurium* Infection in Commercial Broiler Chickens. *Avian Dis.* 48, 361-369.
- Benhar, I., 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv.* 19, 1-33.
- Boot, H.J., ter Huurne, A.A.M. Hoekman, A.J. Peeters, B.P.H., Gielkens, A.L.J., 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.* 74, 6701-6711.
- Boot, H.J., ter Huurne, A.A., Vastenhouw, S.A., Kant, A., Peeters, B.P., Gielkens, A.L., 2001. Rescue of infectious bursal disease virus from mosaic full-length clones composed of serotype I and II cDNA. *Arch. Virol.* 146, 1991-2007.
- Borysowski, J., Gorski, A., 2004. Phage-display technology and its application to experimental oncological therapy. *Postepy Hig. Méd. Dosw. (Online)* 58, 100-7.

- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., Vakharia, V.N., 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75, 11974–11982.
- Brown, F., 1986. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. *Intervirology* 25, 141–143.
- Cao, J., Zhao, P., Miao, X.H., Zhao, L.J., Xue, L.J., Qi Zt, Z., 2003. *Phage display* selection on whole cells yields a small peptide specific for HCV receptor human CD81. *Cell Res.* 13, 473-9.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B., Delmas, B., 2002. The maturation process of *pVP2* requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76, 2384–2392.
- Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas., 1998. *Trabalhos de Pesquisa.* Campinas – SP, 48
- Cosgrove, A.S., 1962. An apparently new disease of chickens—avian nephrosis. *Avian Dis.* 6, 385–389.
- Cui, X., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 2003^a. Identification of crucial residues of conformational epitopes on *VP2* protein of infectious bursal disease virus by *phage display*. *J. Virol. Methods.* 109, 75-83.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., Delmas, B., 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of *pVP2*. *J. Virol.* 76, 2393–2402.
- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T., Becht, H., Teninges, D., 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32, 593–605.
- Etteradossi, N., Arnauld, C., Toquin, D., Rivallan, G., 1998. Critical amino acid changes in *VP2* variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 143, 1627–1636.
- Fernandez-Arias, A., Martinez, S., Rodriguez, J.F., 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, *VP2*, is an apoptotic inducer. *J. Virol.* 71, 8014–8018.

- Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas., 2000. Doenças das Aves. Campinas – SP 200, 301-313.
- Gearhart, D.A., Toole, P.F., Warren Beach, J., 2002. Identification of brain proteins that interact with 2-methylnorharman. An analog of the parkinsonian-inducing toxin, MPP+. *Neurosci Res.* 44, 255-65.
- Gu, Y., Zhang, J., Wang, Y.B., Li S.W., Yang, H.J., Luo, W.X., Xia, N.S., 2004. Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. *World J. Gastroenterol.* 10, 1583-8.
- Guardiola, J., De Berardinis, P., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R.N., Del Pozzo, G., 2001. *Phage display* of epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses in vitro and in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495, 291-8.
- Houshmand, H., Bergqvist, A., 2003. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 *phage display*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 695-701.
- Hudson, P.J., McKern, N.M., Power, B.E., Azad, A.A., 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14, 5001–5012.
- Islam, M.R., Zierenberg, K., Müller, H., 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein *VP1* of very virulent infectious bursal disease virus (*IBDV*) is phylogenetically distinct from that of all other *IBDV* strains. *Arch. Virol.* 146, 2481–2492.
- Kim, S.J., Jang, M.H., Stapleton, J.T., Yoon, S.O., Kim, K.S., Jeon, E.S., Hong, H.J., 2004^a. Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by *phage display*. *Virology* 318, 598-607.
- Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Höss, A., 2001. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J. Immunol. Methods.* 254, 67-84.
- Kretzschmar, T., von Ruden, T., 2002. Antibody discovery: *phage display*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 598-602.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J.C., Delmas, B., 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus *VP4* and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81, 983–992.

- Leong, J.C., Brown, D., Dobos, P., Kibenge, F., Ludert, J.E., Müller, H., Mundt, E., Nicholson, B., 2000. Birnaviridae. In: M.H.V. Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (Eds.), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Academic Press, pp. 481–490, ISBN 0-12-370200-3.
- Lima, A.M.C., Santos, B.M., Silva, P.L., 1996. Distribuição do vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrício em embriões de galinha. *Conferência Apinco* 1, 95.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castán, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., Rodriguez, J.F. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973-83.
- Lu, X., Weiss, P., Block, T., 2004. A phage with high affinity for hepatitis B surface antigen for the detection of HBsAg. *J. Virol. Methods.* 119, 51-4.
- McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Conner, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., Allan, G.M., 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9, 395–404.
- Muller, H., Becht, H., 1982. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.* 44, 384–392.
- Muller, H., Islam, M.R., Rauea, R., 2003. Research on infectious bursal disease-the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97, 153-165.
- Müller, H., Scholtissek, C., Becht, H., 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.* 31, 584–589.
- Nick, H., Cursiefen, D., Becht, H., 1976. Structural and Growth Characteristics of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.* 18, 227-234.
- Ogawa, M., Wakuda, T., Yamaguchi, T., Murata, K., Setiyono, A., Fukushi, H., Hirai, H., 1998. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1277–1279.

- Pasqualini, R., Ruoslahti, E., 1996. Organ targeting *in vivo* using *phage display* peptide libraries. *Nature* 380, 364–6.
- Peters, M.A., Lin, T.L., Wu, C.C., 2004. Infectious bursal disease virus polyprotein expression arrests growth and mitogenic stimulation of B lymphocytes. *Arch. Virol.* 149, 2413-26.
- Petit, M.A., Jolivet-Reynaud, C., Peronnet, E., Michal, Y., Trepo, C., 2003. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J. Biol. Chem.* 278, 44385-92.
- Roovers, R.C., van der Linden, E., Zijlema, H., de Bruïne, A., Arends, J-W., Hoogenboom, H.R., 2001. Evidence for a bias toward intracellular antigens in the local humoral anti-tumor immune response of a colorectal cancer patient revealed by *phage display*. *Int. J. Câncer.* 93, 832-840.
- Rosenberg, A., Griffin, K., Studier, F.W., McCormick, M., Berg, J., Novy, R., Mierendorf, R., 1996. T7Select® *phage display* system: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations (Newsletter of Novagen, Inc.)* 6, 1-6.
- Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S., Yeh, H.Y., 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 223–235.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Soderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., 2000. Recombining germlinederived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 18, 852–6.
- Spies, U., Muller, H., Becht, H., 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* 8, 127–140.
- Tacken, M.G., Van Den Beuken, P.A., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., Boot, H.J., 2003. Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology* 312, 306–319.

- Tan, D.Y., Hair-Bejo, M., Omar, A.R., Aini, I., 2004. Pathogenicity and Molecular Analysis of an Infectious Bursal Disease Virus Isolated from Malaysian Village Chickens. *Avian Dis.* 48, 410-416.
- Trepel, M., Arap, W., Pasqualini, R., 2002. In vivo *phage display* and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 399-404.
- Vasconcelos, A.C., Lam, K.M., 1994. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1803-1806.
- Willats, W.G., 2002. *Phage display*: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol.* 50, 837-54.
- Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128, 79-83.
- Wu, H.C., Huang Y.L., Chao, T.T., Jan, J.T., Huang, J.L., Chiang, H.Y., King, C.C., Shaio, M.F., 2001. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J. Clin. Microbiol.* 39, 977-82.
- Zhang, X.X., Deng, Q., Zhang, S.Y., Liu, J., Cai, Q., Lu, Z.M., Wang, Y., 2003. Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by *phage display* library. *J. Méd. Virol.* 71, 511-7.
- Zhang, Z.C., Hu, X.J., Yang, Q., 2004. Generation of high affinity human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 3, 77-81.
- Zuercher, A.W., Miescher, S.M., Vogel, M., Rudolf, M.P., Stadler, M.B., Stadler, B.M., 2000. Oral anti-IgE immunization with epitope-displaying phage. *Eur. J. Immunol.* 30, 128-35.

CAPÍTULO ÚNICO

**Caracterização do Perfil Antigênico do Vírus da Doença
Infecciosa da Bursa de Fabrício por meio da Tecnologia
de Apresentação de Antígenos Recombinantes em
Fagos**

INTRODUÇÃO

O vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício (*IBDV*) é um vírus de formato icosaédrico com material genético não encapsulado que é endêmico na maioria das áreas de produção de aves domésticas do mundo. O vírus é altamente estável e tende a persistir no ambiente apesar de limpeza e desinfecção. Galinhas e frangos são as únicas espécies de aves conhecidas que são susceptíveis à doença clínica e lesões características de *IBDV*. Perus, patos e avestruzes são susceptíveis à infecção por *IBDV*, mas são resistentes à forma clínica da doença (Lukert and Saif, 1997; McNulty et al., 1979).

Seu material genético possui no maior segmento do genoma (segmento A) uma *ORF* (*open reading frame*) que codifica uma poliproteína a qual é autocataliticamente clivada durante a tradução em duas proteínas estruturais *VP2* e *VP3* e em uma protease virais (Hudson et al., 1986; Azad et al, 1985). Uma segunda *ORF* ainda no segmento A, codifica um proteína não-estrutural *VP5* (Muller and Becht, 1982). O segmento B codifica *VP1*, a qual é uma RNA polimerase dependente de RNA-RdRp (Spies et al, 1987).

Para o diagnostico de infecções pelo *IBDV*, utilizam-se metodologias variadas, contudo recomendam-se o isolamento e identificação do agente viral como técnica mais segura de diagnostico (Lima et al., 1996).

Em 1985 foram desenvolvidas e empregadas vacinas vivas e inativadas contra as diferentes variantes antigênicas. Novamente, os vírus de campo suplantaram o nível de imunidade conferido pelas vacinas intermediárias concomitantemente com outros fatores concorrentes de imunossupressão. Com o aparecimento das cepas *vvIBDV*, passou-se a exigir o desenvolvimento de vacinas do tipo intermediária plus (Fundação Apinco, 2000).

O *vvIBDV* é um vírus mais patogênico que consegue vencer a barreira dos anticorpos maternos antes que as vacinas intermediárias convencionais o façam, logicamente que está na dependência da concentração do mesmo no ambiente (Fundação Apinco, 2000).

As características clínicas e patológicas dos surtos de *vvIBDV* na América Latina têm sido similares às reportadas na Europa, Ásia e África. Esta forma severa da doença de Gumboro representa um problema sério de saúde

para a indústria de granjas da América Latina e eventualmente pode representar uma ameaça para a indústria avícola dos EUA. Desta maneira, é importante estudar a situação do *vIBDV* nas Américas (Banda and Villegas, 2004).

Descoberta e caracterização de interações moleculares é o alvo central da Biologia, e onde estão concentrados os maiores esforços dos cientistas biomoleculares. *Phage display*, amplamente desenvolvida desde os anos 90, tem começado a fazer críticas contribuições a esses esforços. O enfoque é baseado em dois conceitos principais. O primeiro é que bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, podem ser usados na ligação de reconhecimento de proteínas e replicação de DNA. A proteína (ou peptídeo) é apresentada/exposta na superfície da partícula viral e os genes que a codificam estão no interior da partícula. O segundo conceito é que grandes bibliotecas de seqüências de DNA que codificam essas proteínas ou peptídeos de interesse podem ser clonadas no fago. O bacteriófago individualmente pode ser isolado das bibliotecas em virtude da interação com a proteína apresentada com o ligante específico, e depois este fago pode ser amplificado infectando bactérias (Barbas et al., 2001)

A técnica foi desenvolvida inicialmente em Smith, 1985, o qual postulava que este “fago de fusão” poderia ser enriquecido mais de 100 vezes em relação a um fago comum por afinidade para com anticorpos direcionados contra a seqüência “estranha”. O “fago de fusão” pode fornecer uma forma simples de clonagem de gene quando um anticorpo contra o produto daquele gene estiver disponível.

De acordo com Brígido and Maranhão, (2002) “fagos de fusão” podem ser definidos como vírus, cujos genomas são manipulados de forma a apresentarem em seus capsídeos o polipeptídeo exógeno fusionado com uma de suas proteínas estruturais.

Existem alguns trabalhos de sucesso em relação ao isolamento de peptídeos interessantes de vírus que causam prejuízos no setor pecuário, como Iniguez et al., 1998 em *EAV* (vírus da arterite eqüina), Birch-Machin et al., 2000 em herpesvirus eqüino tipo 1, Oleksiewicz et al., 2001 em vírus da síndrome reprodutiva e respiratória em coccidiose aviária (*Eimeria*) (Kawazoe and da Silva Júnior, 2003), entre outros exemplos.

Os objetivos desta investigação foram:

1. Obter um soro purificado com alto título de anticorpos anti-IBDV, através da imunização de galos *SPF* com vacinas comerciais contra o vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício (IBDV),
2. Selecionar peptídeos específicos para o vírus a partir do soro purificado, pelo uso de uma biblioteca randômica de peptídeos recombinantes expostos na proteína capsidial pIII do bacteriófago do tipo M13 (*phage display*),
3. Testar a afinidade dos peptídeos selecionados com o vírus por meio do teste imunoenzimático ELISA e caracterizar molecularmente os clones positivos por sequenciamento, identificando prováveis regiões determinantes antigênicas das proteínas virais.

RESUMO

A doença de Gumboro provoca danos expressivos à produção de aves comerciais pela imunossupressão dos animais. É causada por um vírus pertencente à família *Birnaviridae*, do gênero *Avibirnavirus*. Seu material genético constituído de RNA codifica uma poliproteína VP2-3-4 e as proteínas VP5 e VP1. Neste estudo, imunizações foram realizadas em galos SPF com vacinas comerciais específicas para a doença de Gumboro. O soro dos animais foi purificado em coluna *HiTrap* para purificação de IgY e concentrado por diálise. As IgY purificadas foram utilizadas na realização dos ciclos de seleção contra bibliotecas de fagos com peptídeos randômicos, linear (PhD-12, 12 resíduos) e conformacional (PhD-7C, sete resíduos). As colônias do quarto ciclo de seleção foram amplificadas em placas *Deepwell*, e os fagos submetidos a testes ELISA. Clones imunorreativos para *IBDV* foram sequenciados e submetidos à análises de bioinformática utilizando como parâmetro o genoma da cepa *vIBDV* européia UK661. Foram descritos 8 clones distintos entre si. Entre eles destacaram-se dois motivos de relevância QXXXF e FXS. Esses motivos se repetiram em regiões mapeadas da poliproteína VP2-3-4 e também da proteína VP1. Na poliproteína, um motivo QQ (Gln) corresponde a um mesmo motivo que confere alta antigenicidade à *Staphylococcus aureus*. O presente estudo não obteve seqüências de epítomos conformacionais (com sete resíduos) de *IBDV*. Os seguintes peptídeos apresentaram homologias a diversas proteínas virais: HHSATLFSQFQN e QQQQQFYSTATNS, com a região hipervariável da VP2; NQLAHFFESASP, com uma região correspondente a um sítio de clivagem entre VP3-VP4; SNTASYFQQQQQ, com uma região do domínio de auto-interação da VP5; NFLSQQIQNSHS com a região da VP1, Lys13Thr, que pode ser responsável pela atenuação na virulência de cepas *IBDV*; e QQQQQFYSTATNS com uma outra mutação na proteína VP2 (S330R), que também pode estar relacionada com avirulência. Os motivos protéicos virais identificados e confirmados com o isolamento de peptídeos altamente imunogênicos pela técnica de *phage display* podem servir como antígenos tanto para na produção de novas vacinas como para o diagnóstico da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício.

Palavras-chave: Gumboro, *IBDV*, *Phage display*.

ABSTRACT

Gumboro disease causes important losses to the poultry commercial production due to animals' immunosuppression, and is caused by a virus of the *Birnaviridae* family, and the genus *Avibirnavirus*. Its genome constituted by RNA encodes a polyprotein VP2-3-4, and the proteins VP5 and VP1. The immunizations proceeded in SPF cocks with specific commercial vaccines for Gumboro disease. The animals serum was purified in IgY *Hitrap* purification column and submitted to dialysis for concentration. The antibodies were used in four selection cycles against linear (PhD-12; 12 residues) and conformational (PhD-7C; seven residues) randomic peptide phage libraries. The colonies of the fourth selection cycle were amplified in Deepwell plates and the phages were submitted to ELISA immunoassays from which positive reaction clones for *IBDV* were selected, sequenced and analysed by bioinformatics, using the European *vIBDV* strain UK661 as the genomic parameter. Eight distinct clones were characterized. Among them, two motifs were relevant, QXXXF and FXS. These motifs were repeated at mapped regions of the VP2-3-4 polyprotein and also at the VP1 protein. In the polyprotein, the motif QQ (Gln) corresponded to the same motif that confers high antigenicity in *Staphylococcus aureus*. This study was unable to obtain *IBDV* conformational epitope sequences from the seven peptide library. The following clones presented homology to several viral proteins: HHSATLFSQFQN and QQQQFYSATNS, with a hypervariable region of VP2; NQLAHFFESASP, with a region corresponding to a cleavage site between VP3-VP4; SNTASYFQQQQQ, with a region of the VP5 autointeraction domain; NFLSQQTQNSHS, with a VP1 protein region in which a Lys13Thr mutation may be responsible for virulence attenuation of *IBDV* strains; and QQQQFYSATNS, with a mutation at the VP2 protein (S330R), which may be related to *IBDV* avirulence. The identified viral protein motifs confirmed by the isolation of highly immunogenic peptides through *phage display* may be used as antigens for new vaccines and diagnostics for the Infectious Bursal Disease.

Key-words: Gumboro, *IBDV*, *Phage display*.

MATERIAL E MÉTODOS

Aves:

Utilizou-se de 3 galos *SPF* (*Specific Patogen Free*) de três semanas de idade, da raça *White-Leghorn* cedidos pela Granja Sadia de Uberlândia-MG.

Vacinação:

Antes do início da vacinação, coletou-se sangue dos animais retirado da parte interna da asa de cada um. As vacinas utilizadas foram Bursine-2 (**Fig. 1**) e Bursine K ACL (**Fig. 2**).

Seguiu-se o esquema de vacinação da Granja Planalto:

- 1º dia: Vacinação ocular-1 gota (~50µl) da Vacina Bursine 2 (**Fig. 1**) em cada olho dos dois animais.



Fig. 1: Vacina viva liofilizada contra a Doença de Gumboro. Produzida em embriões de ovos SPF. Contém a cepa intermediária Lukert, não clonada. Proporciona proteção contra cepas clássicas e variantes.

- 15º dia: Vacinação ocular (mesmas condições do 1º dia)
- 30º dia: Vacinação ocular (mesmas condições do 1º e 15º dias)
- 45º dia: Vacinação intramuscular com a vacina Bursine K ACL (**Fig. 2**) – 0,5ml da vacina em cada músculo peitoral.

- 60° dia: Vacinação intramuscular e coleta de sangue para avaliação por soro-neutralização do título de anticorpos contra gumboro.
- 65° dia: sacrifício dos animais com punção cardíaca e coleta de baço.

Armazenou-se o sangue coletado em estufa a 37°C por 1 hora e, logo após, em câmara fria a 4°C também por 1 hora, para obtenção de soro a ser purificado.



Fig. 2: Vacina inativada contra a Doença de Gumboro, produzida com a exclusiva tecnologia ACL, emulsionada em adjuvante oleoso. Contém a cepa intermediária Lukert de Bursine 2®.

Soroneutralização

A reação de soroneutralização é utilizada, para a dosagem de anticorpos em soros de animais (pesquisa de anticorpos ou sorologia). Na reação de neutralização utilizou-se microplacas de fundo chato utilizando sistema de cultura de célula. Pela reação dos soros dos animais com vírus padrões conhecidos, mantidos no laboratório de microbiologia da Granja Planalto, em Uberlândia, verificaram-se quais cepas virais seriam neutralizadas. Realizou-se

uma série de diluições do soro dos animais e posteriormente a reação de neutralização com cada diluição, dosando a quantidade de anticorpos no soro.

Purificação de anticorpo em coluna de IgY

A purificação de IgY realizou-se com o uso da coluna *HiTrap IgY Purification HP, 5ml da Amersham Biosciences*:

- Preencheu-se a seringa ou bomba com Tampão de Ligação (20mM Na_2HPO_4 , 0,5M K_2SO_4 pH 7,5). Conectou-se a coluna à seringa/bomba.
- Lavou-se a coluna com pelo menos 5 volumes da mesma (25ml) de cada tampão: Ligação (20mM Na_2HPO_4 , 0,5M K_2SO_4 pH 7,5), Eluição (20mM Na_2HPO_4 pH 7,5) e Limpeza (20mM Na_2HPO_4 pH 7,5 com 30% de Álcool isopropílico).
- Equilibrou-se a coluna com 5 volumes da mesma com Tampão de Ligação
- Aplicou-se a amostra (10ml de soro)
- Lavou-se com pelo menos 10 volumes (50ml) de tampão de ligação ou ate que não aparecesse material no efluente.
- Eluiu-se as IgY com 10 volumes da coluna (50ml) com Tampão de Eluição (20mM Na_2HPO_4 pH 7,5) coletando em tubos (19) para imediata quantificação no espectrofotômetro (280nm)
- Regenerou-se a coluna com 8 volumes da coluna com Tampão de Limpeza (20mM Na_2HPO_4 pH 7,5 com 30% de Álcool isopropílico)
- Reequilibrou-se a coluna com 5 volumes da mesma com Tampão de Ligação (20mM Na_2HPO_4 , 0,5M K_2SO_4 pH 7,5).

Diálise (Concentração de anticorpos)

Na diálise das amostras saídas da coluna de purificação, utilizou-se membrana de celulose *Fisherbrand® (regenerated cellulose-DYALYSIS tubing)*. Amarraram-se as extremidades inferiores de quatro pedaços da membrana

com barbantes e após aplicação do soro purificado (tubos 1, 2, - 3 e 4, - 5,6 e 7) amarrou-se a outra extremidade, enterrando-os em sacarose por 1 hora.

A quantidade de líquido é reduzida, sendo que os anticorpos ficam retidos na membrana. Por isso amarrou-se novamente a membrana, reduzindo seu tamanho, colocando-as em PBS1X por 12-16 horas, trocando o tampão periodicamente.

Retirou-se o purificado do interior das membranas armazenando-os em microtubos estéreis (tubos 1, 2, -3 e 4-, -5,6 e 7).

Eletroforese por SDS-PAGE

Para confirmar a purificação das IgY utilizou-se de *SDS PAGE* 16%. A corrida das amostras realizou-se por 3 horas numa voltagem de 120V utilizando o marcador *-SIGMAMARKER™, Wide Molecular Weight Range*. Para coloração do gel utilizou-se de uma solução de *Coomassie-blue R-250* como corante de proteínas e solução descolorante logo após.

Biopanning (seleção de fagos)

1º dia:

1. Preparou-se uma solução de 100µg/ml do anticorpo purificado (tubos 3 e 4) em 0,1M NaHCO₃ (pH 8,6).
2. Adicionou-se 150µl desta solução em um único poço de uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar® 3591*.
3. Incubou-se a placa num período de 12-16 horas (*overnight*) a 4°C sob agitação leve (para que estivesse completamente em contato com a solução) na própria embalagem da placa de microtitulação com papel toalha umedecido em torno da mesma e sele-a com adesivo.

2º dia:

1. Em 10ml de solução LB inoculou-se uma colônia de ER2738 (previamente crescida em placa de *petri* com meio LB-Tet) para titulação. Como o fago a ser eluído da placa fora amplificado no mesmo dia, inoculou-se outra colônia de ER2738 em 20ml de meio LB em um

- Erlenmeyer de 250ml. As duas culturas foram colocadas em um shaker sob vigorosa agitação à 37°C.
2. Descartou-se a solução presente no poço da placa e firmemente bateu-se com a abertura voltada para vários papéis-toalha para remoção de solução restante e, então preencheu-se o poço com Tampão de Bloqueio. Incubou-se por no mínimo 1 hora a 4°C.
 3. Descartou-se o Tampão de Bloqueio como no passo anterior. Lavou-se o poço com rapidamente 6 vezes com 150µl de TBST (TBS + 0,1% [v/v] Tween 20). Mexeu-se então bastante batendo de leve nas laterais da placa para que a solução entrasse em contato com toda superfície. Descartou-se a solução e bateu-se a placa com a abertura voltada para papéis-toalha (que eram trocados a cada lavagem). Realizou-se cada lavagem rapidamente para evitar ressecamento do poço.
 4. Diluiu-se 10µl de 3 tipos de biblioteca original (3,34 µl de cada uma – Ph.D.-12, Ph.D.-7 e Ph.D.-C7C da *NEW ENGLAND BioLabs® Inc.*) em 100µl de TBST. Pipetou-se a solução sobre o poço sensibilizado e mexeu-se gentilmente por 10-60 minutos à temperatura ambiente.
 5. Descartaram-se os fagos não ligantes na solução e bateu-se a placa com a abertura voltada para papéis-toalha.
 6. Lavou-se o poço como no passo 3 (2º dia) por 10 vezes e usou-se papéis-toalha novos a cada lavagem.
 7. Adicionou-se 100µl da solução 0,2M Glicina-HCl (pH 2.2), 1mg/ml BSA. Mexeu-se por não mais de 10 minutos. Pipetou-se o eluato em um tubo de microcentrífuga e neutralizou-se com 15 µl de 1M Tris-HCl (pH 9.1).
 8. Titulou-se (método mais abaixo) 1µl do eluato.
 9. Amplificou-se o restante foi amplificado: adicionou-se 20µl do eluato à cultura de 20ml de ER2738 (a qual estava em early-log – OD₆₀₀ ~ 0,3 – ate o presente momento) e incubou-se a 37°C por 4-5 horas no shaker sob forte agitação.
 10. Transferiu-se a cultura para um tubo de centrífuga para centrifugação por 10 minutos a 10000 RPM a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo esterilizado e centrifugou-se novamente.

11. Pipetou-se 80% do sobrenadante para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl. Deixou-se o fago precipitando por 12-16 horas a 4°C.

3º dia:

1. Centrifugou-se a solução precipitada com PEG por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se, brevemente, outra vez para remoção de sobrenadante residual com uma pipeta.
2. Suspendeu-se o precipitado em 1ml de TBS. Transferiu-se a suspensão para um microtubo de centrífuga para centrifugação por 5 minutos a 4°C a título de precipitar resíduos celulares.
3. Transferiu-se o sobrenadante para um microtubo novo e precipitou-se novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo por 1 hora. Centrifugou-se por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante e repetiu-se a centrifugação brevemente para remoção de sobrenadante residual com a pipeta.
4. Suspendeu-se o precipitado em 200µl TBS, 0.02% NaN₃ para recentrifugação por 1 minuto a fim de precipitar algum conteúdo insolúvel. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, obtendo-se então o eluato amplificado.
5. Titulou-se o eluato que fora armazenado a 4°C.
6. Sensibilizou-se outro poço da mesma placa para o 2º ciclo do *biopanning* (passos 1-3 do 1º dia).

4º e 5º dias:

1. Contaram-se as colônias azuis das placas para determinar o título dos fagos. Esse valor fora utilizado para calcular a quantidade de eluato a entrar correspondente a $1-2 \times 10^{11}$ pfu.
2. Realizou-se um segundo ciclo do *biopanning*: repetiu-se os passos 1-11 (2º dia) e 1-4 (3º dia) usando $1-2 \times 10^{11}$ pfu do eluato amplificado do 1º ciclo ao invés da biblioteca original de fagos, e ainda aumentando a concentração de Tween 20 nos passos de lavagem pra 0,05% [v/v].
3. Titulou-se o eluato amplificado resultante do 2º ciclo.

4. Sensibilizou-se outro poço da mesma placa para o 3º ciclo do *biopanning* (passos 1-3 do 1º dia).

6º e 7º dias:

1. Contaram-se as colônias azuis das placas para determinar o título dos fagos. Esse valor fora utilizado para calcular a quantidade de eluato a entrar correspondente a $1-2 \times 10^{11}$ pfu.
2. Realizou-se um segundo ciclo do *biopanning*: Repetiu-se os passos 1-11 (2º dia) e 1-4 (3º dia) usando $1-2 \times 10^{11}$ pfu do eluato amplificado do 2º ciclo ao invés do eluato amplificado do 1º ciclo, com a concentração de Tween 20 nos passos de lavagem ainda a 0,05% [v/v].
3. Titulou-se o eluato amplificado resultante do 3º ciclo.
4. Sensibilizou-se outro well da mesma placa para o 4º ciclo do *biopanning* (passos 1-3 do 1º dia).

8º dia:

1. Realizou-se um 4º ciclo do *biopanning* repetindo os passos 1-8 (2º dia) usando $1-2 \times 10^{11}$ pfu do eluato amplificado do 3º ciclo ao invés do eluato do 2º ciclo com a concentração de Tween 20 nos passos de lavagem novamente a 0,05% [v/v].
2. Titulou-se o eluato não amplificado do 4º ciclo como no passo 8 (2º dia).

Titulação

1. Para cada titulação inoculou-se em meio LB de 10ml (0,2 g LB +10ml de água destilada e autoclavagem) uma colônia de ER2738, com tetraciclina (1ml/1µl) e, incubou-se sob agitação em shaker a 37°C até a fase *mid-log* ($OD_{600} \sim 0,5$). Antes da inoculação 100µl de meio LB foi reservado em um microtubo para as diluições.
2. Enquanto as células cresciam, preparou-se a solução de Agarose Top para autoclavagem e posterior transferência de 3ml da mesma para tubos Falcon esterilizados. Colocaram-se os tubos em banho-maria a 55°C até o uso.

3. Autoclavou-se juntamente com Agarose Top, meio sólido para que fosse dispensado em placas de petri para a titulação. Antes, colocou-se tetraciclina no meio sólido (1ml/1µl).
4. Após solidificação, espalhou-se uma solução de IPTG/XGal (8/80µl) e esperou-se secar até o uso.
5. As diluições realizaram-se da seguinte forma: para sobrenadante de cultura de fagos amplificados - 10^8 a 10^{11} ; para eluatos de fagos não amplificados - 10^1 a 10^4 ; em microtubos (4 para não-amplificados e 11 para amplificados) de 500µl, foram colocados 9µl de meio LB com tetraciclina (reservado anteriormente) cada. 1 µl da solução de fago foi misturado ao primeiro microtubo e bastante homogeneizado com a pipeta; trocou-se a ponteira retirando 1µl da mistura para transferência para o próximo microtubo e assim sucessivamente até o último (10^4 ou 10^{11}), do qual 1µl era descartado (diluições seriais de 10 µl).
6. Uma vez que a cultura alcançou a fase *mid-log*, dispensou-se 200µl da mesma em cada microtubo das diluições.
7. Agitou-se vigorosamente cada microtubo e incubou-os por 5 minutos à temperatura ambiente.
8. Um de cada vez, transferiu-se as células infectadas para um tubo Falcon contendo Agarose Top a 55°C, misturou-se rapidamente de imediato despejou-se o conteúdo sobre uma placa de petri LB/IPTG/Xgal, balançando-a bastante para cobrir toda superfície.
9. Esperou-se o resfriamento das placas por 5 minutos e as incubaram por 12-16 horas a 37°C.
10. Contaram-se as colônias das placas que apresentavam 10^2 colônias. Multiplicou-se cada número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos nas pfu POR 10µl.

Amplificação de fagos em Deepwell

No dia anterior inoculou-se uma colônia de ER2738 em um meio LB de 20ml, incubada sob agitação a 37°C por 12-16 horas.

Em um meio LB de 120ml (autoclavado e com tetraciclina-1ml/1µl) diluiu-se 1ml da cultura do dia anterior. Em cada poço (um para cada clone a ser caracterizado) da *Deepwell* dispensou-se 1ml da cultura diluída.

Usando palitos de dente esterilizados, retirou-se colônias azuis da placa de *petri* (4º ciclo não-amplificado) e transferiu-se para um poço da *Deepwell* contendo cultura diluída. (Foi importante retirar colônias de placas que continham não mais de 100 colônias aproximadamente; isto assegurou que cada colônia continha uma única seqüência de DNA).

A placa *Deepwell* foi incubada, vedada com um adesivo próprio, por não mais que 4-5 horas no shaker a 37°C. Retirou-se 100µl de cada poço transferindo para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar®* 3591, como um *backup*. Incubou-se a *Deepwell* nas mesmas condições anteriores por mais 8 horas.

Centrifugou-se a *Deepwell* por 20 minutos a 3700 rpm transferindo, logo após, seu conteúdo para uma outra *Deepwell* estéril, por pipetagem, tentando retirar o máximo de sobrenadante possível. Adicionou-se então 1/6 do volume em PEG/NaCl incubando-a por mais 12-16 horas a 4°C. Centrifugou-se por 1 hora a 3700 rpm. Verteu-se a *Deepwell* dispensando todo sobrenadante secando sobre papel-toalha (trocado a todo o momento para evitar contaminação cruzada) e, suspendeu-se o precipitado em 200µl de PBS 1X.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

O teste ELISA realizou-se da seguinte forma:

1. Sensibilizou-se uma placa de microtitulação *NUNC* vedada com adesivo por 12-16 horas a 4°C com 1µg/poço do anticorpo purificado (IgY) contra gumboro em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M Na HCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro)-100µl/poço da solução.
2. Lavou-se a placa por 3 vezes com PBST 0,05%
3. Colocou-se 250µl de Solução de Bloqueio (PBST 0,05%-BSA 3%) incubando-a por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavou-se a placa 3 vezes com PBST 0,05%

5. 50µl dos fagos amplificados e purificados na *Deepwell* foram dispensados na placa de microtitulação e logo após adicionou-se mais 5µl de Solução de Bloqueio, incubando a placa por 1 hora a 37°C.
 6. Lavou-se a placa por 6 vezes com PBST 0,05%
 7. 100µl/poço de anticorpo *Anti-M13 Monoclonal Antibody da Amersham Biosciences* [1:5000] + Solução de Bloqueio foi colocado, incubando a placa por 1 hora a 37°C.
 8. Lavou-se por mais 6 vezes com PBST 0,05%.
 9. Revelou-se com (100µL/poço):
 - 10ml de Tampão citrato-fosfato (0,1M) + 100µl de OPD/Álcool Metílico (10mg/ml) + 1,0µl de H₂O₂ (30%).
 10. Interrompeu-se a reação com 4M H₂ SO₄ (10µL/poço).
- Repetiu-se esse experimento para 4 *Deepwells*.

Extração de DNA

1. No dia anterior inoculou-se uma colônia de ER2738 em um meio LB de 20ml, incubada sob agitação a 37°C por 12-16 horas.
2. Em um meio LB de 120ml (autoclavado e com tetraciclina-1ml/1µl) foi diluído 1ml da cultura do dia anterior. Dispensou-se 1ml da cultura diluída em tubos Falcon com subsequente infecção com 20ml de fagos purificados em *Deepwell* e, que deram sinal positivo para o teste ELISA; incubaram-se os tubos vedados com parafilme a 37°C sob agitação no shaker por 4-5 horas.
3. Transferiu-se a cultura para microtubos e centrifugou-os por 30 segundos transferindo o sobrenadante para outro microtubo estéril, centrifugando, brevemente, outra vez. Com auxílio de pipeta, transferiu-se 500µl do sobrenadante para outro microtubo estéril (sendo o restante armazenado com glicerol, numa diluição 1:1, a -20°C).
4. Adicionou-se 200µl de PEG/NaCl invertendo os microtubos varias vezes para misturar e incubando à temperatura ambiente por 10-20 minutos.
5. Centrifugou-se por 10 minutos a 14000rpm descartando o sobrenadante.

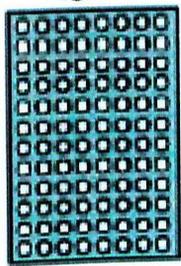
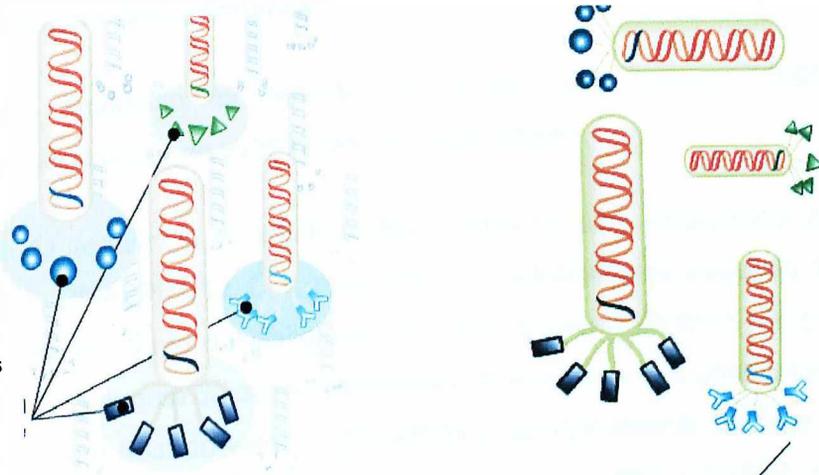
6. Suspendeu-se o precipitado minuciosamente com 100µl de Tampão Iodeto misturando bastante e adicionou-se 250µl de Álcool Etilico Absoluto. Incubou-se 10-20 minutos à temperatura ambiente.
7. Centrifugou-se 10 minutos a 14000 rpm descartando o sobrenadante.
8. Lavou-se o precipitado com 500µl de Álcool Etilico 70% centrifugando mais uma vez 10 minutos a 14000 rpm
9. Desprezou-se o sobrenadante e suspendendo o precipitado em 20µl de água MiliQ.

Sequenciamento

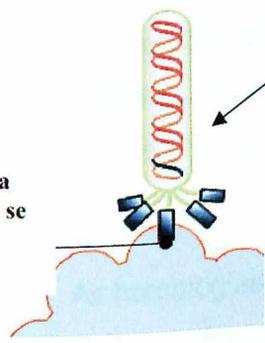
O seqüenciamento foi realizado utilizando o Kit *Big Dye Terminator* (*Pharmacia*) utilizando um seqüenciador automático *MegaBace 1000* (*Amersham Biosciences*) do laboratório de Genética Molecular (UFU). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o *primer* – 96 M13 – (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3' - *Amersham Biosciences*) o qual flanqueia a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionado nos fagos M13 recombinantes pela hibridação na região -96 pb *downstream*.

Esquema de uma etapa (round) do processo de Biopanning:

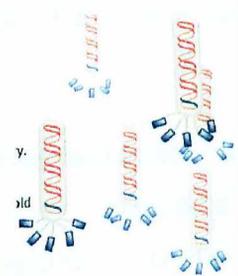
Diversidade de proteínas expressas na superfície dos fagos (Biblioteca)



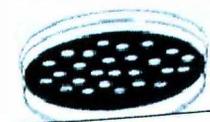
Proteína exposta se liga no alvo



Amplificação



Titulação



Análise de dados pela Bioinformática

O genoma analisado foi descrito por Brown and Skinner, 1996, pertencente à cepa europeia de *wIBDV* denominada UK661.

Tradução da seqüência de aminoácidos obtidas no sequenciamento se deu pelo programa **DNA2PRO12**. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs (Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM)* quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência do inserto (tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima) (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

Realizou-se o cálculo da freqüência de aminoácidos dentro da população de peptídeos pelo programa **AAFREGS** (<http://relic.bio.anl.gov/aafregs.aspx>).

Para determinar a importância dos resíduos ou motivos identificados, foi realizada a previsão da estrutura secundária das proteínas *VP2-3-4*, *VP1* e *VP5* por meio do servidor PredictProtein (<http://www.predictprotein.org>).

Para análise das propriedades bioquímicas dos peptídeos selecionados e das proteínas virais, tais como: antigenicidade, probabilidade de exposição e hidrofobicidade, fez-se o uso do programa DnaStar - Lasergene (subprograma Protean).

As homologias de cada peptídeo, individualmente ou não, com proteínas do *IBDV*, foram testadas utilizando o programa MATCH (<http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>) e pelo programa CLUSTAL W (18.1) (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cg>). O programa MATCH foi usado para parear uma seqüência específica da proteína viral com todas as seqüências peptídicas selecionadas, enquanto que o CLUSTAL W, inclui ainda na análise o pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados.

RESULTADOS

Vacinação/Soroneutralização:

Após a 4ª imunização, a soroneutralização foi realizada nos laboratórios da Granja Planalto obtendo títulos de 1:15000 e 1:7500 para os galos G1 e G2, respectivamente.

Purificação de IgY em coluna:

À medida que as amostras iam sendo filtradas na coluna de purificação (*HiTrap IgY Purification HP*), alíquotas eram imediatamente quantificadas por espectrofotometria (OD_{280nm}) (Tabela 1).

Tabela 1: Frações do soro total dos galos SPF coletados em coluna de purificação *HiTrap IgY Purification HP* e suas densidades óticas (280 nm) numa diluição de 50µl de amostra / 450 µl de TBS.

Nº Tubo	OD (280nm)
1*	1,320
2*	0,503
3*	0,316
4*	0,229
5*	0,165
6*	0,128
7*	0,102
8	0,085
9	0,078
10	0,066
11	0,054
12	0,050
13	0,049
14	0,054
15	0,049
16	0,049
17	0,064
18	0,058
19	0,047

* Amostras escolhidas para diálise

Diálise /Quantificação de IgY

Foram utilizadas as amostras dos tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (3 e 4 juntas e 5, 6 e 7 também juntas) para que passassem pelo processo de diálise e, mais uma vez analisadas por espectrofotometria (**Tabela 2**) para posterior visualização em gel SDS-PAGE a fim de verificar a pureza dos anticorpos (**Fig. 3**). Uma solução de anticorpos na concentração de 1mg/ml dá uma absorbância de 1,4 para IgY à 280nm.

Tabela 2: Quantificação de anticorpos já filtrados pela coluna de IgY

Nº TUBO	OD (280nm)
1	0,339
2	0,108
3, 4	0,047
5, 6, 7	0,024

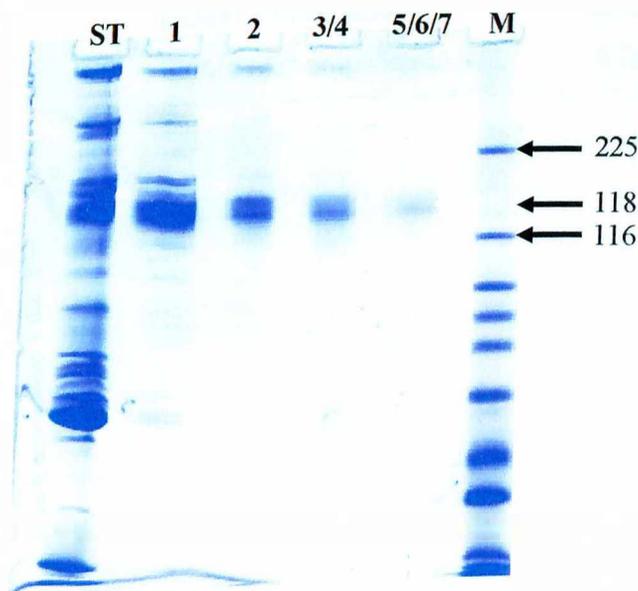


Fig. 3: SDS-PAGE (Gel 16%) de IgY de galos SPF obtidas através da purificação do soro total por coluna de IgY. A seta (118 kDa) indica a posição da Imunoglobulina Y de galos e as outras duas (205 e 116 kDa) padrões do marcador; ST – Soro Total, 1, 2, -3, 4, -5, 6,7- amostras purificadas em ordem crescente que saiam da coluna e diálise; M - Marcador.

Ciclos de Seleção dos Fagos:

Os eluatos (não-amplificado e amplificado) de cada ciclo foram titulados e os clones reativos foram selecionados pela coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas). Contava-se o rendimento das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias para calcular a quantidade de eluato a utilizar nas etapas subseqüentes. (Fig. 4). Os valores das titulações mostraram enriquecimento dos fagos específicos, que ficavam retidos na placa, durante os processos de seleção (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados das titulações de cada ciclo do *Biopanning*; pfu – unidades formadoras de colônias.

	ETAPAS	RESULTADO
1º Ciclo	Eluato não-amplificado	$7,6 \times 10^3$ pfu
	Eluato amplificado	$5,9 \times 10^{10}$ pfu
2º Ciclo	Eluato não-amplificado	$1,6 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$2,0 \times 10^{10}$ pfu
3º Ciclo	Eluato não-amplificado	$9,9 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$3,3 \times 10^{10}$ pfu
4º Ciclo	Eluato não-amplificado	$5,0 \times 10^5$ pfu

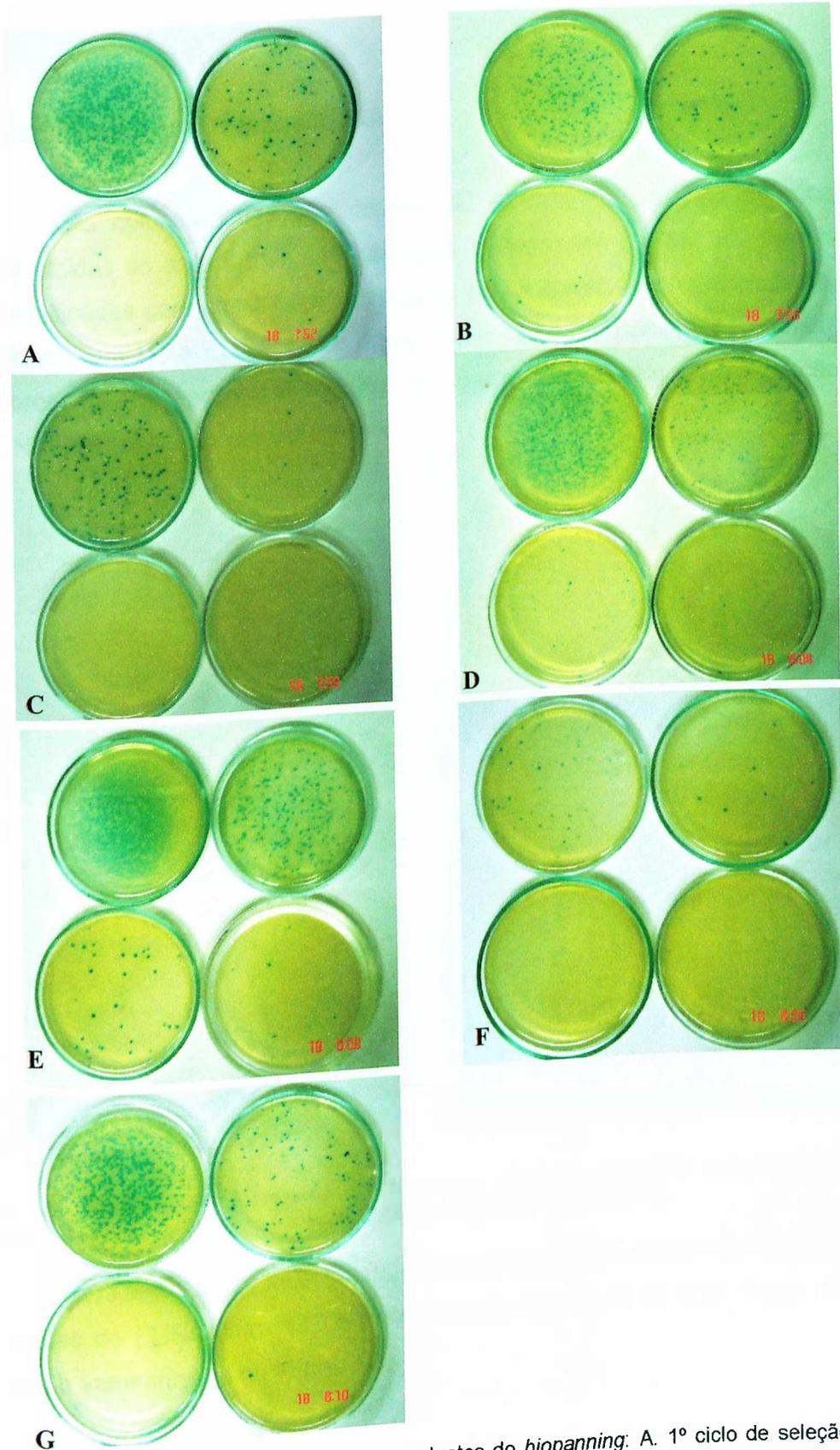


Fig. 4: Placas de titulação referentes aos eluatos do *biopanning*: A. 1º ciclo de seleção não amplificado; B. 1º ciclo de seleção amplificado; C. 2º ciclo de seleção não amplificado; D. 2º ciclo de seleção amplificado; E. 3º ciclo de seleção não amplificado; F. 3º ciclo de seleção amplificado; G. 4º ciclo de seleção não amplificado.

Amplificação em *Deepwell*//ELISA

As colônias azuis provenientes do 4º ciclo (eluato não-amplificado), escolhidas ao acaso, mas com formatos homogêneos e bem isoladas, foram amplificadas para amplificação dos fagos em *Deepwell*. Após amplificação dos clones, um teste ELISA foi realizado para cada *Deepwell* e os clones que apresentaram reação positiva (**Fig. 5**) foram selecionados para extração de DNA e conseqüente sequenciamento.

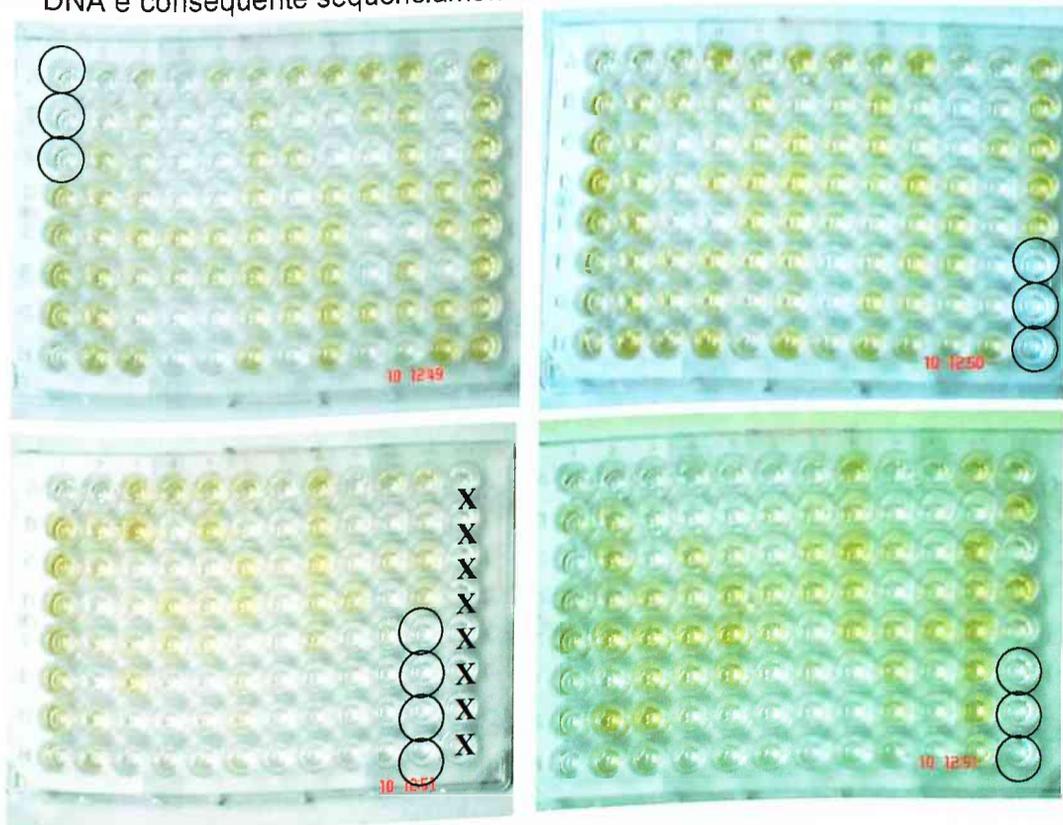


Fig. 5: Teste ELISA representando os clones positivos (amarelo) selecionados para sequenciamento; O – fago *helper* como controle negativo; X - poço vazio.

Os fagos foram selecionados de acordo com os valores das leituras das placas de ELISA (filtro 492nm) obedecendo ao cut-off de 1,27. Seus valores estão apresentados na **Fig. 6**.

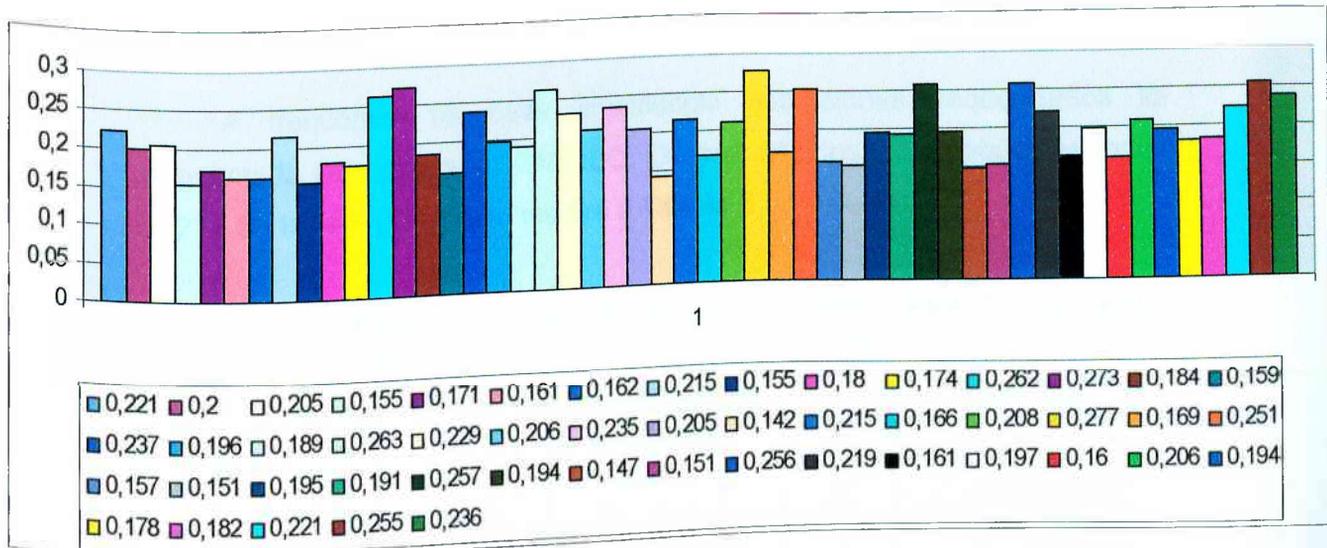


Fig. 6: Gráfico com os valores das leituras dos clones apresentou seqüências viáveis no sequenciamento com suas respectivas leituras para o teste ELISA

Sequenciamento/Bioinformática:

Para uma maximização na obtenção de seqüências viáveis para análise por bioinformática, o sequenciamento foi repetido três vezes utilizando a mesma placa, desta maneira alcançando um numero de 50 seqüências viáveis, incluindo as repetidas (Tabela 4).

Tabela 4: Seqüências de aminoácidos e freqüência, dos peptídeos expressos nos fagos selecionados por vacinação de galos SPF contra IBDV.

Clone	Freqüência
SHSNQTQQSAFY	5/50
NQFQSFLTASHH	2/50
VMTQSDVFYSRR	1/50
NQLAHFFESASP	6/50
FSQQQSFYSGPK	24/50
QQQQFYSATNS	8/50
SHSNQTQQSLFN	1/50
SWPQQQAFFHIM	3/50
Total de seqüências	50
Total de clones Distintos	8

A frequência de cada aminoácido dos clones seqüenciados foi apresentada pelo programa AAFREQ. Os aminoácidos mais freqüentes foram Q (21), S (18) e F (12), como mostra a **Tabela 5**.

Tabela 5: Frequência de aminoácidos dos clones seqüenciados. Em vermelho estão os aminoácidos com maior frequência dentre todos.

AA	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	Total	Frequência
A	0	0	0	1	0	0	1	0	2	2	0	0	6	0.0625
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
D	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.0104
E	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.0104
F	1	0	1	0	0	3	2	2	1	0	2	0	12	0.1250
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.0104
H	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	6	0.0625
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.0104
K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.0104
L	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0.0313
M	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0.0208
N	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	6	0.0625
P	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0.0313
Q	1	3	2	5	5	1	2	2	0	0	0	0	21	0.2188
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0.0208
S	3	1	2	0	2	1	0	1	4	2	1	1	18	0.1875
T	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0	5	0.0521
V	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.0208
W	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.0104
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
Y	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	4	0.0417

96

Os peptídeos foram alinhados, pelo programa **MATCH**, com as seqüências completas das proteínas específicas para *IBDV* (**Tabela 6**) na busca pela identificação de seqüências consensos entre ambos e, ainda, foi determinado a localização de cada domínio nas proteínas. No caso da proteína *VP5*, o programa não gerou homologia representativa, de acordo com os parâmetros do mesmo, que pudesse destacar como consenso entre os aminoácidos dos peptídeos. Quando foram alinhados pelo programa **CLUSTAL W** (18.1) eles apresentaram homologia entre todos através de um motivo QxxxF e entre 6 peptídeos o motivo FxS. (dado não mostrado).

Tabela 6: Alinhamento pelo programa MATCH, tendo as cores vermelha e azul representando homologia com a proteína e a cor verde, homologia entre os peptídeos.

PROTEÍNA	PEPTÍDEO	MATCH	REGIAO DA PROTEÍNA(aa)
VP1	QQQQY SATNS	VMTQSDV FY SRR	355 - 366
	SHSNQTQQS AFY	SHSNQTQQS AFY	423 - 434
	VMTQSDV FY SRR	QQQQY SATNS	567 - 578
	NQFQSFLTASHH	NQFQSFLTASHH	815 - 826
POLIPROTEÍNA 2-3-4	QQQQY SATNS	SHSNQTQQS AFY	3 - 14
	SHSNQTQQS AFY	SHSNQTQQS LFN	3 - 14
	SHSNQTQQS LFN	NQFQSFLTASHH	81 - 92
	NQFQSFLTASHH	QQQQY SATNS	321 - 332
	NQLAHFFESASP	NQLAHFFESASP	776 - 787
	NQFQSFLTASHH	NQFQSFLTASHH	780 - 791
VP1 (clones invertidos)	MIHFFAQQPWS	KPGYFSQQQSF	120 - 131
	NFLSQQTQNSHS	MIHFFAQQPWS	134 - 135
	KPGSYFSQQQSF	HHSATLFSQFQN	149 - 160
	HHSATLFSQFQN	SNTASYFQQQQQ	820 - 831
POLIPROTEÍNA 2-3-4 (clones invertidos)	YFASQQTQNSHS	HHSATLFSQFQN	108 - 119
	MIHFFAQQPWS	HHSATLFSQFQN	224 - 235
	NFLSQQTQNSHS	RRSYFVDSQTMV	422 - 433
	KPGSYFSQQQSF	HHSATLFSQFQN	553 - 564
	SNTASYFQQQQQ	PSASEFFHALQN	754 - 765
	PSASEFFHALQN	NFLSQQTQNSHS	816 - 827
	RRSYFVDSQTMV		
	HHSATLFSQFQN		
	HHSATLFSQFQN		
HHSATLFSQFQN			

Os alinhamentos pelo programa CLUSTAL W, estão representados na **Tabela 7**, o qual gerou homologias entre todos peptídeos com as seqüências das proteínas específicas de *IBDV*.

Tabela 7: Alinhamento pelo programa CLUSTAL W (18.1), onde a cor vermelha representa regiões de homologia entre o peptídeo e as proteínas virais, bem como sua localização na proteína.

PROTEÍNA	CLUSTAL W (18.1)	REGIAO DA PROTEÍNA (aa)
VP1	SHSN - QTQCSAFY	408-410/427-434
	SWPQQQAF F HIM	510 - 529
	SHSNQTQQS L FN	275 - 286
	FSQQQSFYSGPK	807 - 818
	QQQQQFY S ATNS	567 - 578
	NQLAHFFESASP	193 - 204
	VMTQSDV F YSRR	1 - 9
	NQFQSE L TASHH	279 - 290
	SHSNQTQCSAFY	132 - 143
	SWPQQQAF F HIM	934 - 945
	SHSNQTQQS L FN	132 - 143
	FSQQQSFYSGPK	593 - 604
	QQQQQFY S ATNS	321 - 332
	NQLAHFFESASP	816 - 827
POLIPROTEÍNA 2-3-4	VMTQSDV F YSRR	994 - 1005
	NQFQSE L TASHH	780 - 791
	YFASQQTQNSHS	82 - 93
	MIHFFAQ - QQPWS	134-140/219-223
	NFLSQQTQNSHS	4 - 15
	KPGSYFSQQQSF	523 - 534
	SNT - ASYFQQQQQ	409-411/422-430
	PSASEFFHALQN	667 - 678
	RRSYFVDSQTMV	402 - 413
	HHSATLFSQFQN	735 - 746
	YFASQQTQNSHS	425 - 436
	MIHFF - AQQQPWS	56-60/89-95
	NFLSQQTQNSHS	816 - 827
	KPGSYFSQQQSF	588 - 599
SNTASYFQQQQQ	913 - 924	
PSASEFFHALQN	809 - 820	
RRSYFVDSQTMV	103 - 114	
HHSATLFSQFQN	518 - 529	
VP5	SHSNQTQCSAFY	20 - 31
	SWPQQQAF F HIM	130 - 141
	SHSNQTQQS L FN	26 - 37
	FSQQQSFYSGPK	7 - 18
	QQQQQFY S ATNS	112 - 123
	NQLAHFFESASP	111 - 122
	VMTQSDV F YSRR	58 - 69
	NQFQSE L TASHH	82 - 93
	YFASQQTQNSHS	108 - 119
	MIHFFAQQPWS	120 - 131
	NFLSQQTQNSHS	112 - 123
	KPGSYFSQQQSF	107 - 118
	SNTASYFQQQQQ	87 - 98
	PSASEFFHALQN	120 - 131
RRSYFVDSQTMV	97 - 108	
HHSATLFSQFQN	53 - 64	
VP5 (INVERTIDOS)		

Com os resultados dos alinhamentos dos dois programas MATCH e CLUSTAL W (18.1), foi possível identificar a abrangência com que os peptídeos se pareavam nas proteínas (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Reunião de todas as regiões de homologias entre proteínas de *IBDV* e os peptídeos com suas seqüências diretas, conforme obtidas no sequenciamento.

Seqüências	Regiões de Homologia nas Proteínas (aa)		
	VP1	VP2-3-4	VP5
Diretas			
SHSNQTQQSAFY	423-434/408-410*/427-434*	3-14/132-143*	20-31*
SWPQQQAFFHIM	510-529*	934-945*	130-141*
SHSNQTQQSLFN	275-286*	3-14/132-143*	26-37*
FSQQQSFYSGPK	807-818*	593-604*	7-18*
QQQQQFYSATNS	567-578/567-578*	321-332/321-332*	112-123*
NQLAHFFESASP	193-204*	776-787/816-827*	11-122*
VMTQSDVFYSRR	355-366/1-9*	994-1005*	58-69*
NQFQSFLTASHH	815-826/279-290*	81-92/780-791/780-791*	82-93*
Abrangência	1 - 826	3 - 1005	7 - 141

*peptídeos alinhados por CLUSTAL W (18.1)

Tabela 9: Reunião de todas as regiões de homologias entre proteínas de *IBDV* e os peptídeos com seqüências invertidas em relação ao sequenciamento.

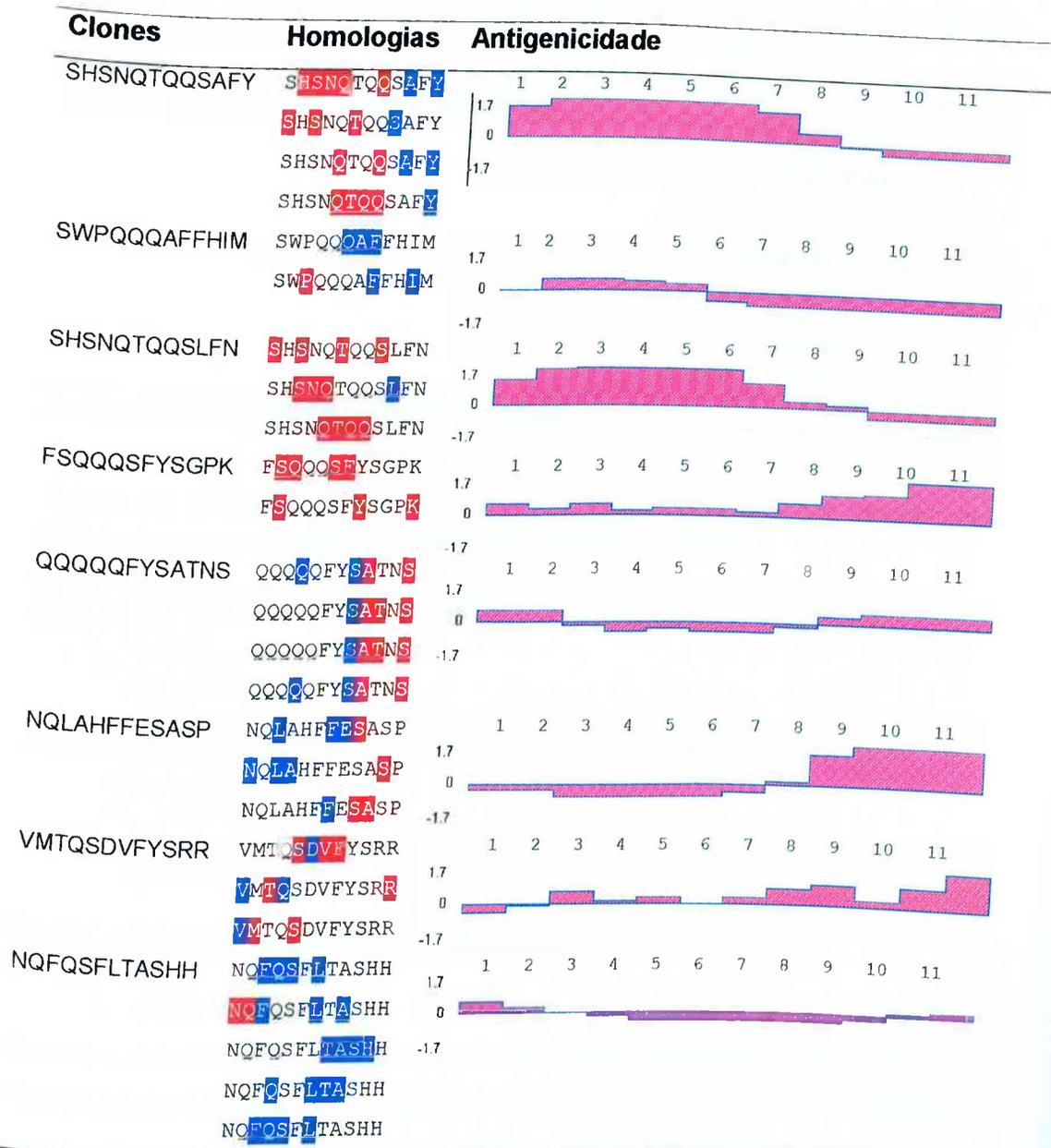
Seqüências	Regiões de Homologia nas Proteínas (aa)		
	VP1	VP2-3-4	VP5
Invertidas			
YFASQQTQNSHS	82-93*	425-436*	108-119*
MIHFFAQQQPWS	134-145/134-140*/219-223*	56-60*/89-95*	120-131*
NFLSQQTQNSHS	4-15*	816-827/816-827*	112-123*
KPGSYFSQQQSF	120-131/523-534*	588-599*	107-118*
SNTASYFQQQQQ	820-831/409-411*/422-430*	913-924*	87-99*
PSASEFFHALQN	667-678*	754-765/809-820*	120-131*
RRSYFVDSQTMV	402-413*	422-433/103-114*	97-108*
HHSATLFSQFQN	149-160/735-746*	108-119/224-235/553-564/518-529*	53-64*
Abrangência	4 - 831	56 - 924	53 - 119

*peptídeos alinhados por CLUSTAL W (18.1)

Antigenicidade:

O índice de antigenicidade de cada peptídeo (Tabela 10) varia na vertical esquerda, de -1,7 à +1,7, sendo cada aminoácido representado na horizontal superior. A cor azul representa os resíduos que apresentaram homologia com a proteína, mas não estão representados como possíveis sítios antigênicos, ao contrario dos resíduos representados em vermelho que apresentam homologia com a proteína e estão localizados em regiões de alto índice de antigenicidade.

Tabela 10: Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados por afinidade com proteínas de *IBDV* de acordo com o programa Protean (Lasergene softwares).



A cor azul representa homologia com proteína, mas não com o índice de antigenicidade.

Pelo programa CLUSTAL W (18.1), quando analisados todos ao mesmo tempo na busca por homologia entre cada proteína de *IBDV*, os peptídeos se agrupavam em uma única região consenso da mesma, sendo possível mapear uma região da cada proteína (Tabelas 11 e 12, 13 e 14, 15 e 16 para as proteínas VP2-3-4, VP1 e VP5, respectivamente) e posteriormente verificar o

índice de antigenicidade, variando na vertical esquerda de -1,7 à +1,7, pelo programa Protean (Lasergene softwares), das regiões mapeadas.

Tabela 11: Mapeamento de uma região da poliproteína VP2-3-4 através das seqüências invertidas dos peptídeos (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP2-3-4 com clones invertidos:

```

YFASQQTQNSHS
NFLSQQTQNSHS
KPGYFYSQQQSF
SNTASYFQQQQQ
PGFPGSIVGAHYTLQSNNGYKFDQMLLTAQNLPASYNRCRLV L L R S L PGGVYAL
RPSYFVLSCTMV
HHSATLFSQFQN
MIHFFAQQQPWS
PSASEFFHALQN
  
```

Região mapeada: 103-SRSXTVXSXT-112 (aa)

Tabela 12: Mapeamento de uma região da poliproteína VP2-3-4 através das seqüências dos peptídeos (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP2-3-4 com clones normais:

```

SHSNOTQOSAFY
SHSNOTQOSLFN
FSQQQSFYSGPK
QQQQFYSATNS
MTNLQDQTCCI P I LLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGLIVFF
SWPQQQAFEHIM
VMTQSDVYFYSRR
NQFQSELTASHH
NQLAHFFESASP
*
  
```

Região mapeada: 7-QTQQXVFXRS-17

A região mapeada da poliproteína pelos peptídeos em conjunto abrangeu parcialmente a região de antigenicidade, exposição na superfície e hidrofiliidade no caso dos clones com suas seqüências normais; no entanto através dos clones com suas seqüências invertidas, foi possível mapear uma região da poliproteína com boa antigenicidade, exposição de superfície e hidrofiliidade (**Fig. 7**).

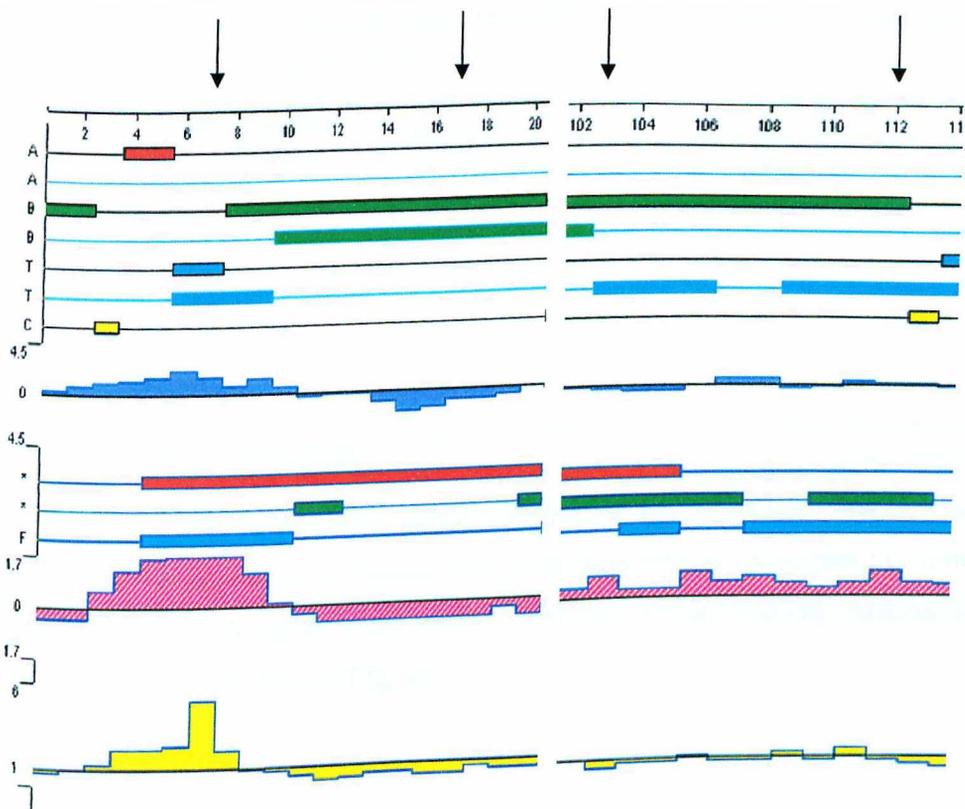


Fig. 7: Índice de antigenicidade (rosa), exposição na superfície (amarelo) e hidrofiliçidade (roxo) da Poliproteína VP2-3-4, abrangendo os aminoácidos 7 á 17 e 103 a 112 delimitados pelas setas.

Tabela 13: Mapeamento de uma região da proteína VP1 através das seqüências invertidas dos peptídeos (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP1 clones invertidos:

```

KPGSYRFSQQCSF
SNTASYRQQQQQ
  YRASQQTQNSHS
  NELSQQTQNSHS
  DVNIPARAKIAAFGIKPTAGQDVEELLI PKVWVPPEDPLASPSRLAKFLRENG
MIHFPAQQPWS
RRSYRVDSTMV
PSASEFHALON
HHSATLRSQFN
  *      *

```

Região mapeada: 1-MSXXFXSXQXXSXXS-15

Tabela 14: Mapeamento de uma região da proteína VP1 por meio da análise de clusters das seqüências dos peptídeos pelo software Clustal W 18.1 (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP1 clones normal:	
M	SDVFN
VP1	SPQARSKI SAAFGIKPTAGQDVEELLIPKVVWVPPEDPLASPSRLAKFL
V	MTQSDVFYSRR
SHSNQTQQSA	Y
SHSNQTQQSL	FN
FSQQQS	FYSGPK
QQQQQ	FYSATNS
NQFQS	FLTASHH
SWPQQQA	FHIM
NQLAH	FESASP

Região mapeada: 2-SDVFNS-7

As regiões mapeadas pelos peptídeos em conjunto, agora com a proteína VP1, seja com os clones com suas seqüências invertidas ou normais, coincidiram e abrangeram uma região com boa antigenicidade, exposição de superfície e hidroflicidade (Fig. 8).

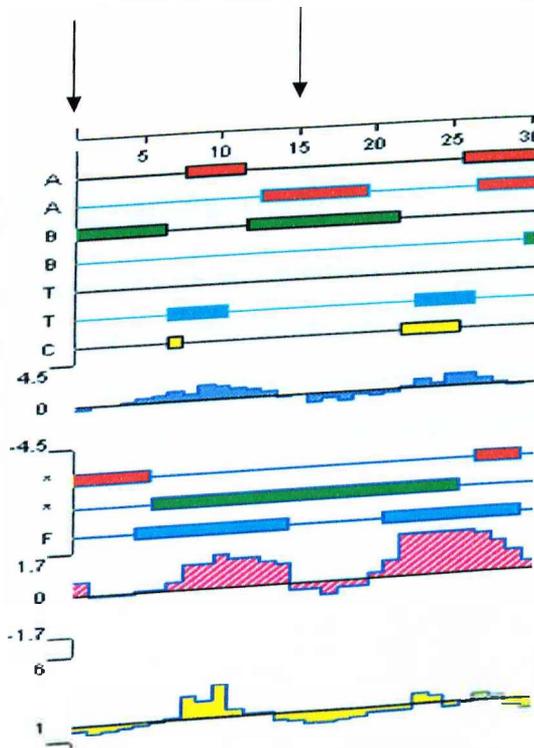


Fig. 8: Índice de antigenicidade (rosa), exposição na superfície (amarelo) e hidroflicidade (roxo) da Proteína VP1, abrangendo os aminoácidos 1 a (2 a 7) 15 limitados pelas setas.

Tabela 15: Mapeamento de uma região da proteína VP5 através das seqüências invertidas dos peptídeos (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP5 clones invertidos:

```

KPGSYFSQQQSF
SNTASYFQQQQQ
  YFASQQTQNSHS
  NFLSQQTQNSHS
MIHFFAQQQPWS
RRSYFVDSQTMV
HHSATLFSQFQN
  LSLMVSRLTNDRLDDKPARSNPTDCSVHTEPSDANNRTGVHSGRHPREAHSQVRDL
PSASEFFHALQN
  
```

Região mapeada: 1-MXSLXVSXXQXNXXS-15

Tabela 16: Mapeamento de uma região da proteína VP5 através das seqüências dos peptídeos (seqüência da proteína em azul).

Clustal VP5 clones normais:

```

QFDCGGHRVRANCLFPWLPWLNCGCSLHTAEQWELQVRS DAPDCPEPTGQL LQAS E E H
  NCAHFFSSASP
SHSNQTQQS AFY--
SHSNQTQQSLFN
  FSQQQSFYSGPK
  CQQQFY SATNS
SWPQQAFFHIM
  VMTQSDVFYSRR
  NQFSFLTASHH
  
```

Região mapeada: 112-QLXQAXESXS-121

As regiões mapeadas pelos peptídeos em conjunto, por fim da proteína VP5, seja com os clones com suas seqüências invertidas ou normais, coincidiram e abrangeram uma região com alta antigenicidade, exposição de superfície e hidrofiliçidade, especialmente nas extremidades direitas (Fig. 9).

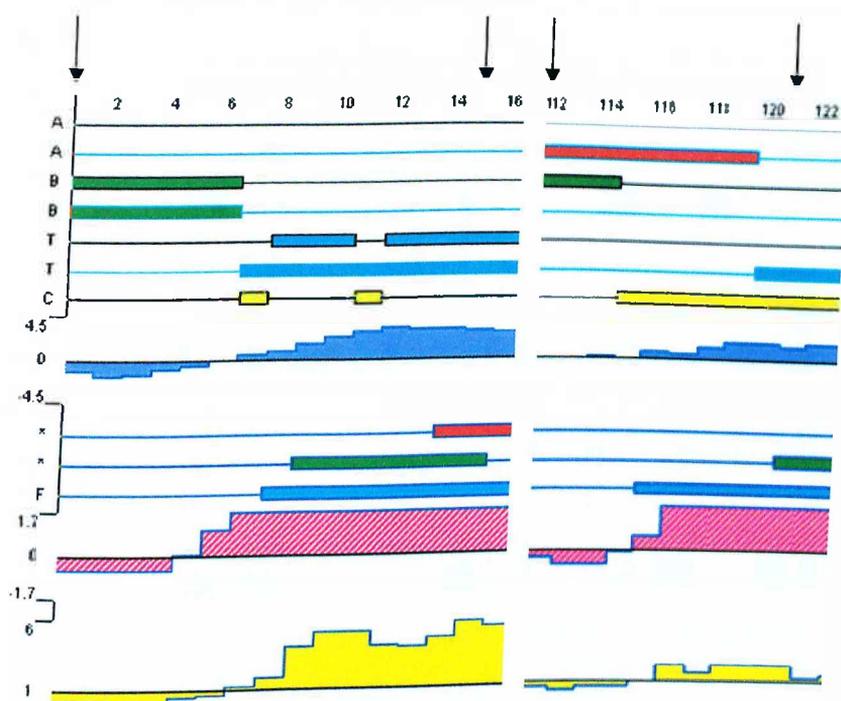


Fig. 9: Índice de antigenicidade (rosa), exposição na superfície (amarelo) e hidrofobicidade (roxo) da Proteína VP5, abrangendo os aminoácidos 1 a 15 e 112 a 121, limitados pelas setas.

Predição de estrutura e acesso a solvente (www.predictprotein.org)

Neste tópico trataremos de previsão de estruturas secundárias (PROF_acc) e possível acessibilidade a solvente observada (O_3_sec) e prevista (P_3_acc) das regiões que foram mapeadas pelos peptídeos em conjunto no programa CUSTAL W (18.1), levando em consideração o índice de confiabilidade da previsão de estrutura (Rel_sec) e acessibilidade a solvente (Rel_acc). Os termos dos índices de previsão se encontram na **Figura 10**.

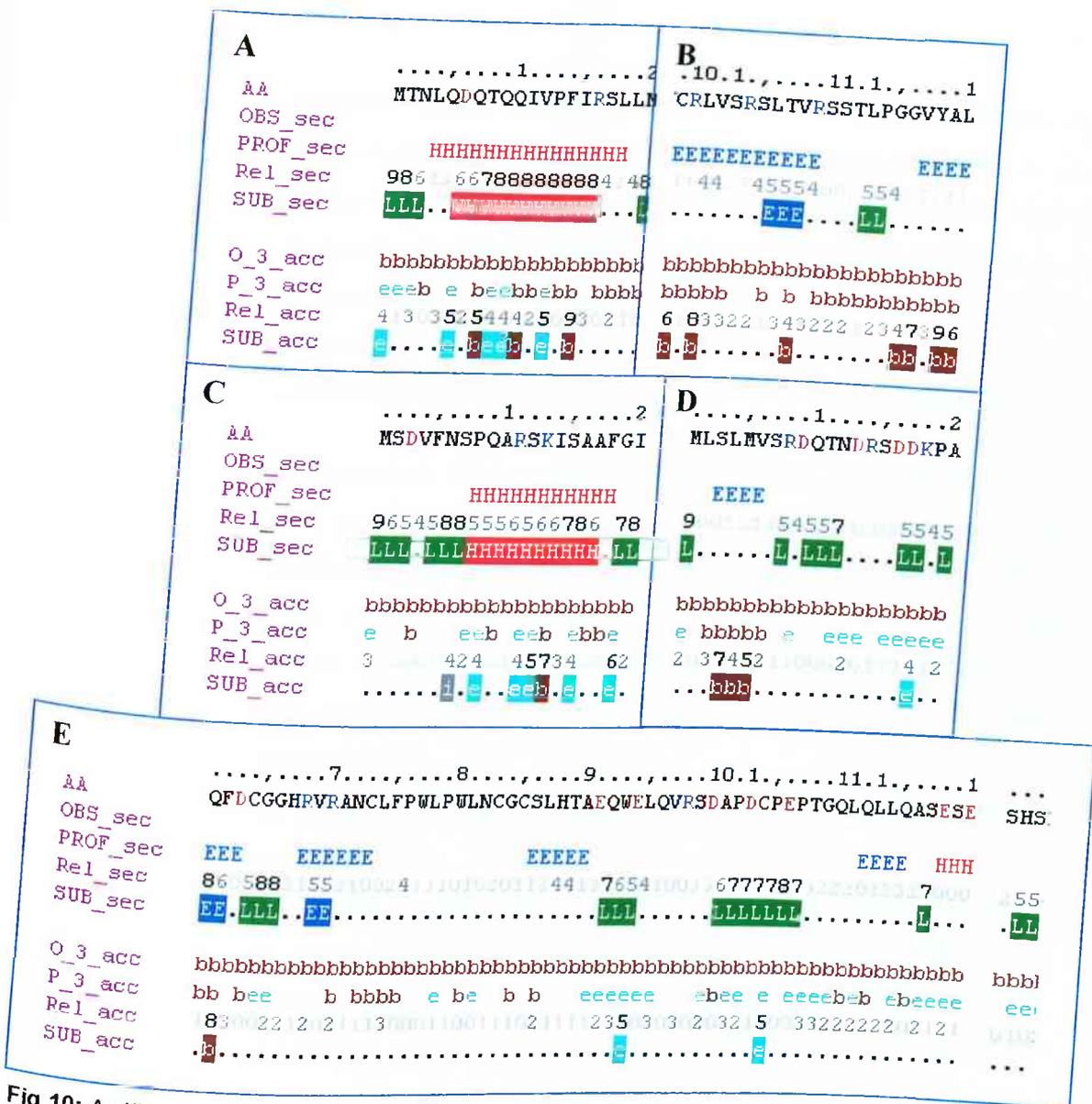


Fig 10: Análise da previsão da estrutura secundária das proteínas virais do IBDV pelo *PredictProtein Serve*: A: região 7-17 da poliproteína VP2-3-4; B: região 103-112 da poliproteína VP2-3-4; C: região 1-15 da proteína VP1; D: região 1-15 da proteína VP5; E: região 112-121 da proteína VP5.

- AA : sequência de aminoácidos
- OBS_sec: estrutura secundária observada: H=hélice, E=estendido (folha), branco=outra (alça)
- PROF_sec: previsão de estrutura secundária PROF : =hélice, E=estendido (folha), branco=outra (alça) (PROF = PROF: perfil da rede de previsão HeiDelberg)
- Rel_sec: índice de confiabilidade da previsão PROFsec (0=baixo to 9=alto).
- SUB_sec: subtópico da predição PROFsec, para todos os resíduos com uma média esperada de acurácia > 82%. NOTA: para este subtópico os símbolos a seguir são usados: L: é alça ; para aqueles que "." É usado: significa que nenhuma previsão foi feita para aquele resíduo, pois a confiabilidade é: Rel < 5.
- O_3_acc: relativa acessibilidade à solvente observada (acc) em três fases: b = 0-9%, i = 9-36%, e = 36-100%.
- P_3_acc: previsão relativa de acessibilidade a solvente PROF (acc) em três fases: b = 0-9%, i = 9-36%, e = 36-100%.
- Rel_acc: índice de confiabilidade para a previsão PROFacc (0=baixo to 9=alto).
- SUB_acc: da predição PROFsacc, para todos os resíduos com uma média esperada de acurácia > 0.69.
- NOTA: para este subtópico símbolos a seguir são usados: I: é intermediário ; para aqueles que "." é usado: significa que nenhuma previsão foi feita para aquele resíduo, pois a confiabilidade é: Rel < 4.

- **Poliproteína 2-3-4-região aa 7-17:** existe uma probabilidade desta região apresentar uma estrutura secundária helicoidal bastante alta de acordo com o índice de confiabilidade maior que 5. Quanto à probabilidade de acesso a solvente observada e prevista estão apenas entre 0-16%, mas a prevista é alta, ou seja, se encontra entre 36-100% nos resíduos 9Q, 10Q e 13P confirmado pelo índice de confiabilidade maior que 4 (**Fig. 16**).
- **Poliproteína 2-3-4-região 103-112 (clones invertidos):** região com predição de estrutura na forma Estendida com índice de confiabilidade maior que 5 para esta forma nos resíduos 106L, 107T e 108V. Quanto a acesso a solvente, tanto a observada quanto a prevista são baixas, estando apenas entre 0-16%, mas com índice de confiabilidade maior que 4 somente no resíduo 108V(**Fig. 16**).
- **VP1 região 2-7:** com exceção do resíduo 4V, a região mapeada apresenta alta probabilidade de apresentar uma estrutura secundária prevista para a forma de Alça/Loop devido ao índice de confiabilidade se apresentar maior que 5. Quanto à acessibilidade a solvente, tanto a observada quanto a prevista são baixas, estando apenas entre 0-16%, mas com índice de confiabilidade menor que 4 (**Fig. 16**).
- **VP1 região 1-15 (clones invertidos):** *A região 2-7 já foi elucidada acima. Existe a probabilidade de que toda região compreendida entre a 8-15 tenha estrutura secundária prevista para uma forma helicoidal devido ao alto índice de confiabilidade. Quanto à possibilidade de acesso a solvente, grande parte da região (9Q, 12S e 13K) apresenta índice para observada e prevista entre 36-100% e entre 0-16% para um único resíduo I14 também na observada e prevista e, o mais interessante, apresentando um índice de confiabilidade maior que 4 nestes resíduos. No resíduo 1M, a probabilidade de estar presente numa estrutura em forma de Alça/Loop é altíssima devido ao índice de confiabilidade ser bem maior que 5 e, apesar da acessibilidade a

solvente observada estar apenas entre 0-16%, a prevista se encontra entre 36-100%, mas com índice de confiabilidade um pouco baixo, menor que 4 (Fig. 16).

- **VP5 região 1-15 (clones invertidos):** A previsão de estrutura em *Alça/Loop* é alta nos resíduos 1M, 8R, 10Q, 11T e 12N devido ao índice de confiabilidade maior que 5 nas previsões destes resíduos. Já a probabilidade de acesso a solvente é baixa tanto na observada quanto na prevista, estando apenas entre 0-16%, com índices de confiabilidade maiores que 4, apesar de que nos resíduos 1M 9D 12N 13D 14R a probabilidade prevista ficou entre 36-100%, mas com índice de confiabilidade abaixo de 4 (Fig. 16).
- **VP5 região 112-121:** Não se pode afirmar muito a respeito desta região a respeito da predição de estrutura secundária, com exceção do resíduo 117Q, onde existe a possibilidade alta de estrutura em *Alça/Loop* com índice de confiabilidade acima de 5. A probabilidade de acesso a solvente é baixa na observada estando apenas entre 0-16% enquanto que a prevista varia entre baixa 0-16% e 36-100%, respectivamente em alguns resíduos, mas o índice de confiabilidade é abaixo de quatro para estas previsões (Fig. 16).

DISCUSSÃO

A escolha por animais SPF para o experimento teve como princípio excluir o máximo de anticorpos que possam vir a ser gerados por contaminação externa e não pelas sucessivas vacinações que foram realizadas no período de três meses com as vacinas Bursine 2 e Bursine K ACL (ambas Fort Dodge). Em geral as aves comerciais se comportam muito bem no que diz respeito à produção de anticorpos quando submetidos à vacinação, seja com vacinas de DNA (Kim et al., 2004^b), com a própria proteína VP2 (Hulse and Romero, 2004), plasmídeos contendo fragmentos da região maior do genoma de *IBDV* (Chang et al., 2003) ou codificando antígenos deste vírus (Li et al., 2003), e até mesmo pelo uso de um herpesvírus aviário como vetor expressando antígenos de VP2 (Tsukamoto et al., 2002). Prudêncio, 2004 por

meio da imunização de galinhas com proteínas totais de *Boophilus microplus*, conseguiu altos títulos de anticorpos, mesmo não sendo um parasita específico de aves domésticas, possibilitando identificar peptídeos através de purificação de imunoglobulinas do tipo Y nestes animais.

Outra medida que foi tomada se deu em relação à salubridade do ambiente no qual os animais estavam confinados; uma fumigação com KMnO_4 + Formol foi realizada no biotério da Granja Planalto, em sala específica e lacrada, com dois dias de antecedência à chegada dos galos. Tal preocupação se deve ao fato de que a seleção de fagos seria realizada com anticorpos purificados destes animais, o que poderia aumentar os riscos de obter seqüências inespecíficas para o trabalho. Os intervalos entre uma vacinação e outra, de 15 em 15 dias, foi obedecido.

Durante os ciclos de seleção, houve um enriquecimento do número de fagos, já esperado pelo fato de que, a cada ciclo, clones/fagos com determinadas seqüências foram sendo retidos para subsequente eluição e amplificados para o ciclo seguinte. Este enriquecimento pôde ser obtido por Lowman and Wells, 1993, que mutando códons em resíduos importantes para receptores do hormônio do crescimento humano (hGH), construíram 5 diferentes bibliotecas de fagos pelo uso de transfecção com fagomídeos, mesmo assim ainda conseguiram um enriquecimento de seus fagos de interesse. Apesar das dificuldades a respeito de eficiência do processo de transfecção de DNA, os poucos fagomídeos viáveis foram retidos e amplificados, graças ao enriquecimento gerado pelos processos de ligação e eluição da técnica de *phage display*.

O crescimento de clones em *Deepwell* se revelou eficiente na obtenção de quantidades suficientes de fagos a serem utilizados para o teste ELISA, e também vantajosa em relação ao tempo para realização deste mesmo teste, em comparação ao mesmo processo com microtubos, na medida em que os clones eram dispensados nas placas em intervalos de tempo menores, e também devido ao uso de pipetas multi-canal.

A amplificação dos fagos em tubos Falcon apresentou uma vantagem adicional em relação aos microtubos, pois o primeiro possui um espaço interno maior, gerando uma melhor aeração para a bactéria.

Outra etapa importante foi a extração de DNA dos fagos, principalmente no que diz respeito ao tempo em que os reagentes permanecem nos estágios de precipitação, seja com PEG ou com Álcool Etílico (absoluto e 70%), assim, quanto menor é o tempo de incubação melhor é a qualidade do DNA, pois previne a ação de proteases ou restos de bactérias que podem ser carregados juntamente com DNA viral.

Os resultados de ELISA foram bastante satisfatórios no que diz respeito ao processo de seleção de fagos a serem seqüenciados, na medida em que quase a totalidade dos fagos selecionados, ou seja, fagos que deram reação positiva para este teste, apresentaram seqüências que se relacionavam com proteínas do *IBDV*. Similarmente, Iniguez et al. (1998) realizaram teste para identificar quais fagos já selecionados poderiam ser usados como antígenos em um diagnóstico de ELISA, com objetivo de detectar a presença de anticorpos anti-EAV (vírus da arterite eqüina). Usando um conjunto de soros positivos para EAV contra uma placa sensibilizada com os fagos isolados, os autores verificaram que aqueles fagos que apresentaram reação positiva também possuíam seqüências peptídicas homólogas às de EAV. Em outro vírus eqüino, o herpesvírus tipo 1, assim como no presente trabalho, identificou-se seqüências de peptídeos por *phage display* com subsequente reconhecimento de especificidade dos clones em soro positivo específico para sorotipo 1 de herpesvírus eqüino pelo teste de ELISA (Birch-Machin et al., 2000).

Outro exemplo de sucesso de seleção de peptídeos por *phage display* em aves, mas diferentemente do atual trabalho, desta vez para o parasito da coccidiose aviária (*Eimeria*), demonstrou que um peptídeo específico era capaz de romper a membrana da primeira forma infectante daquele parasito, fornecendo subsídios adicionais para o seu controle (Kawazoe and da Silva Júnior, 2003).

O sistema de apresentação de proteínas em fagos, ou *Phage display*, pode ser utilizado como nova ferramenta a ser aplicada no campo. No caso de *IBDV*, existem poucos estudos conhecidos, mas os já existentes são bastante conclusivos a respeito da viabilidade do seu uso. Cui et al. (2003^a) primeiramente identificaram resíduos cruciais de epítomos conformacionais na proteína VP2 de *IBDV* por *Phage display* e, logo após os mesmos autores (Cui

et al., 2003^b) mapearam estes epítomos conformacionais na proteína capsidial VP2 de IBDV também por *Phage display*.

Apesar de o presente estudo ter utilizado em conjunto, uma biblioteca linear e uma conformacional de peptídeos recombinantes (*New England Biolabs, Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM*), durante os ciclos de seleção, apenas peptídeos de 12 resíduos foram selecionados e confirmados pelo programa DNAPro12. Diferentemente de Cui et al. (2003^{a,b}) não foi possível isolar epítomos conformacionais com sete resíduos nesta investigação, provavelmente a biblioteca comercial usada não estivesse adequada, ou ainda, porque pode haver uma maior probabilidade de selecionar peptídeos ligantes naqueles fagos apresentadores de 12 aminoácidos randômicos, mas neste caso não podemos afirmar sobre esta possibilidade uma vez que as bibliotecas foram misturadas, e não há como comparar.

O alinhamento dos peptídeos obtidos realizado no programa **CLUSTAL W (18.1)** possibilitou o destaque de um motivo de aminoácidos – **QXXXF (Gln-XXX-Phe)** - que, apesar de descontínua, se repetia em todos peptídeos. Outro motivo, também descontínuo, que se repetiu na maioria dos peptídeos quando alinhados foi **FXS (Phe-x-Ser)**. A relevância a respeito destes dois motivos se explica pela repetição destes três aminoácidos (**Q, F e S**) que, de acordo com o programa **AAFREQ**, são os mais frequentes na constituição dos peptídeos isolados.

Algumas considerações podem ser feitas em relação a esses motivos isolados, quando analisados sob o ponto de vista dos resultados obtidos pelos programas Predict Protein e DnaStar-Protean, que reforçam a hipótese sobre a importância destes motivos. De acordo com a **Tabela 12**, a provável região mapeada da poliproteína VP2-3-4 foi **7-QTQQXVXFIRS-17**. Nesta região os motivos citados anteriormente – **QXXXF** e **FXS** – se encontram representados, embora o motivo **FXS** possua uma provável representação conformacional, como apresentado nos resultados do PredictProtein. Isto é, avaliando apenas o motivo **FXS** no final da sequência peptídica mapeada acima, se considerarmos a estrutura secundária da proteína, pode-se inferir que o resíduo **X** pode ser interpretado como um ou mais resíduos (**XR**), pois na análise da molécula, o resíduo **X** se encontra em uma região com baixa probabilidade de acesso a solvente e estrutura secundária prevista para a forma helicoidal (Fig. 16), além

de baixa hidrofiliçidade, exposição em superfície, e antigenicidade da região onde se encontram estes dois resíduos X e R. Em resumo, o motivo FXS pode ser na realidade visto como conformacional, a partir da sequência mapeada (FXRS), onde o resíduo X não estaria acessível.

Outra informação a se considerar se diz respeito a um motivo contínuo – QTQQ- mapeado por quatro clones diferentes, que faz parte de uma região de alta antigenicidade, hidrofiliçidade e exposição em superfície, além do que a previsão da estrutura secundária para a mesma é de forma helicoidal e há alta probabilidade de acesso a solvente, especificamente os resíduos 9 e 10.

As regiões mapeadas da proteína *VP1* **1-MSXXFXSXQXXSXXS-15** e **2-SDVFNS-7** também contém o motivo –FXS- e, apesar de invertido na região **1-MSXXFXSXQXXSXXS-15**, também contém o motivo –QXXF- apesar de que o que se pode considerar de maior relevância neste segundo motivo é o fato de que a região compreendida por este motivo (resíduos 5-10), de acordo com as previsões dos programas DnaStar e Predictprotein, é onde se inicia um pico de antigenicidade, alta hidrofiliçidade e exposição em superfície e, alta probabilidade de apresentar uma estrutura inicialmente em forma de alça (*loop*) e posteriormente helicoidal, sendo que esta possível alça estaria exposta para fora do capsídeo devido à previsão dos outros parâmetros citados anteriormente (hidrofiliçidade, exposição em superfície e antigenicidade).

Os peptídeos **HHSATLFSQFQN** e **QQQQFYSTATNS** apresentaram pareamento (resíduos 224-235 e 321-332, respectivamente) com a região da proteína *VP2*, que de acordo com Azad et al. (1987), corresponde ao maior domínio conformacional e antigênico desta proteína e está compreendida entre os aminoácidos 206-350; foi posteriormente referido como domínio hipervariável ou variável da *VP2* por (Bayliss et al., 1990). Além do mais, de acordo com Azad et al. (1987), existem duas grandes regiões a cada término desta região variável – pico A compreendendo os aminoácidos 210 a 225 e pico B compreendendo os aminoácidos 312 a 324 sendo a primeira onde está presente o mesmo peptídeo selecionado citado anteriormente – **HHSATLFSQFQN**. Neste caso, acredito que este motivo possa ser de grande relevância na identificação de seqüências conservadas e com alta antigenicidade das proteínas do capsídeo viral, com provável uso para diagnóstico ou mesmo terapêutico.

Lejal et al. (2000) confirmaram que o sítio de clivagem entre VP3-VP4 ocorre na Ala-755-Ala-756, (antes proposto por Hudson et al., 1986, como sendo K-722-R-723) região na qual o peptídeo **NQLAHFFESASP** apresentou homologia, inclusive com Ala-756, como mostra o alinhamento realizado no programa **MATCH** na Tabela 6. Este mesmo autor testou o efeito da substituição das duas Ala-755-Ala-756 no processamento da poliproteína *in vitro*. Esperava-se que a substituição fosse interferir fortemente no processamento da poliproteína entre VP4-VP3. De fato esta dupla mutação resultou na formação de pVP2 e não clivou o polipeptídeo VP3-VP4, mostrando ser esta região da poliproteína importante no seu processamento. Essa dupla porção de Ala, de acordo com o *PredictProtein*, teria grandes possibilidades de estar presente em uma região de formação de estrutura em hélice (dado não mostrado).

Além da dupla porção de Ala citada anteriormente, deve-se destacar outra de grande relevância neste presente estudo, representada pelo motivo **QQ**, o qual se repetiu em um número significativo de peptídeos selecionados (41 clones em 50), além do que, o primeiro aminoácido (**Q**) está presente no motivo **QXXXF**, que é consenso entre todos os peptídeos quando alinhados. Importante observar que, conforme a predição da poliproteína VP2-3-4 e alinhamento dos peptídeos em conjunto pelo CLUSTAL W, em que a região mapeada compreende os aminoácidos 7 a 17, o motivo **QQ** apresenta uma região com altíssima probabilidade de formação de estrutura em hélice e acessibilidade a solventes. Este motivo também é descrito por Graille et al. (2000), que descreveram resíduos-chave de contato entre *Staphylococcus aureus* e fragmentos de imunoglobulinas humanas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos (Fab) através da estrutura cristalográfica do domínio D do patógeno. Dentre estes domínios, o domínio QQ estava sempre presente e exposto para fora da membrana, numa estrutura em hélice. Este trabalho reforça a hipótese de que este motivo, por se apresentar sempre em regiões de alta antigenicidade, com estrutura em hélice, possa também vir a ser de importância no reconhecimento de IBDV por linfócitos B da bursa de aves comerciais.

Aparentemente, a região imediatamente após o resíduo K na posição 579 da VP1 de IBDV, é altamente conservada em todas as cepas de IBDV.

Este resíduo está presente em um dos quatro motivos envolvidos na atividade da polimerase de vírus de RNA, no caso o *IBDV* (Islam et al., 2001). Os resultados do presente trabalho apresentaram um peptídeo – **QQQQQFYSATNS** – que parecia com a região imediatamente anterior ao resíduo **K**, citado anteriormente; no entanto, de acordo com Ribas and Wickner, 1992, o domínio essencial do motivo da RdRp (*VP1*), pode estender-se além da região consenso, além de mais mutações nas proximidades dos motivos desta RdRp podem influenciar na atividade da polimerase, o que pode indicar que o peptídeo selecionado acima pode estar envolvido neste domínio da *VP1*.

O mesmo clone, mas com sua seqüência invertida (**SNTASYFQQQQQ**), apresenta homologia com parte de uma região do aminoácido 73 a 90, correspondente à região do domínio de auto-interação da *VP5* do vírus, mapeado por Tacken et al. (2003) e ainda ao final da região transmembrana predita (resíduos 69-88). Devido à comum estrutura em α -hélice de domínios transmembrana, muitos a considera formadora de poros ou canais na membrana.

Um outro peptídeo mereceu destaque no presente trabalho – **NFLSQQTQNSHS** – o qual apresenta homologia entre os aminoácidos 4-15 na proteína *VP1*, por isso, de acordo com Islam et al. (2001) existe um fato de relevante importância, que diz respeito à informação na posição do aminoácido 13, onde todas as cepas clássicas atenuadas apresentam uma mutação única (Lys13Thr, conforme letra sublinhada no peptídeo) na proteína *VP1*, o que permite postular um possível papel desta mutação na atenuação destes tipos de cepas.

Conforme Tacken et al. (2000), a *VP3* tem a capacidade de ligação com a *VP1*. A região responsável por esta interação foi mapeada na *VP3* até exatos 10 resíduos carboxi-terminais e ainda foi demonstrado que *VP3* interage ainda com ambas as fitas de RNA de *IBDV* (Tacken et al., 2002). Hudson et al (1986) postularam que o domínio responsável por esta última interação, apesar de ainda não estar totalmente determinado, ocorra na região carboxi-terminal entre os aminoácidos 1004-1013, sendo uma região básica com resíduos de prolina interespaçados. De posse destas informações, foi possível verificar a homologia do peptídeo – **VMTQSDVFYSRR** – com a região abrangendo os aminoácidos 994-1005, ou seja, coincide com boa parte da região de interação

da VP3 com as fitas de RNA do vírus e o começo da região de interação com a VP1.

Estudos adicionais de homologia do peptídeo selecionado – **QQQQQFYSATNS** – (resíduos 321-332) com outra região considerada importante da VP2, em termos de virulência, nos leva ao heptapeptídeo **SWSASGS** (Chen et al., 1998) considerado um marcador de virulência relacionado à mudanças na sua seqüência. Outro peptídeo, localizado nesta mesma região, mas referente a cepas não patogênicas, diz respeito à **SASARGS** (Brown et al., 1994), ou seja, uma troca ocorrida em **W326A** ou **S330R** estaria responsável por uma “avirulência” em *IBDV*. Wang et al. (2004) conseguiram gerar mudanças na seqüência de aminoácidos da VP2 durante a replicação de *vvIBDV* em cultura de células de CEFs (chicken embryo fibroblast) e em algumas cepas destas culturas, onde houve a mudança **S330R**, os testes mostraram uma queda significativa, de 64% para 32%, na mortalidade de alguns animais. De acordo com nossos resultados, o peptídeo selecionado, citado no início, alinhou exatamente com o resíduo **S330**, no motivo **SATNS**.

Pode ser ainda muito cedo para nós inferirmos somente a relação VP2-*IBDV* sobre virulência porque VP5, VP3, VP4 e VP1 ainda não foram totalmente analisadas (Wang et al., 2004).

É importante continuar descrevendo e alinhando novos peptídeos, provenientes de *phage display*, com as proteínas de *IBDV*. E, na medida em que novas informações sejam incorporadas, poderemos determinar o verdadeiro perfil antigênico destas proteínas virais e suas interações. Como por exemplo, Brown et al. (1994) mostraram que cepas *vvIBDV* se diferenciam de cepas clássicas virulentas por apresentarem apenas 4 resíduos conservados de aminoácidos na VP2 (A222, I256 I294 e S299), ou seja, de uma forma bem generalista, o que diferencia a porcentagem de mortalidade provocada por uma cepa em relação à outra esta presente em poucos resíduos de aminoácidos, os quais se mapeados e estudados podem vir a gerar diagnósticos ou vacinas que atendam às exigências do mercado avícola. Adicionalmente, Brandt et al. (2001) estudando determinantes moleculares de tropismo celular, virulência e fenótipo de patogenicidade de *IBDV*, descobriram que os resíduos na VP2, Q253, D279 e A284, estão envolvidos no tropismo celular e virulência de *IBDV*.

Estes mesmos autores sugeriram ainda que os resíduos 115 e 653, desta vez da proteína *VP1*, estavam envolvidos na replicação célula-específica em *IBDV*, pela análise de mutações ocorridas nestes dois resíduos. Chevalier et al. (2004) descobriram que o último resíduo C-Terminal da *VP3*, um ácido glutâmico na posição 257, é responsável pelo controle da montagem do capsídeo de *IBDV*. Estes são apenas alguns exemplos de aminoácidos que não puderam ser mapeados pelos clones isolados neste trabalho, o que não impede que um contínuo sequenciamento e alinhamento de novos clones não possam vir a apresentar homologias com resíduos de grande importância, já descritos ou não, e que possam ser utilizados em novos diagnósticos e/ou em vacinas mais eficientes ou definitiva contra a Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Azad, A.A., Barrett, S.A., Fahey, K.J., 1985. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* 143, 35-44
- Azad, A.A., Jagadish, M.N., Brown, M.A., Hudson, P.J., 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a Birnavirus. *Virology* 161, 145-152.
- Banda, A., Villegas, P., 2004. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48, 540-9.
- Barbas, C.F. III., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J., 2001. *Phage display: A Laboratory Manual*. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bayliss, C.D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R.W., Papageorgiou, A., Muller, H., Boursnel, M.E.G., 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71, 569-577
- Birch-Machin, I., Ryder, S., Taylor, L., Iniguez, P., Marault, M., Ceglie, L., Zientara, S., Cruciere, C., Cancellotti, F., Koptopoulos, G., Mumford, J., Binns, M., Davis-Poynter, N., Hannant, D., 2000. Utilisation of bacteriophage *display* libraries to identify peptide sequences recognised by equine herpesvirus type 1 specific equine sera. *J. Virol. Methods.* 88, 89-104.
- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., Vakharia, V.N., 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75, 11974-11982.
- Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., 2002. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biocologia Ciência & Desenvolvimento* 26, 44-51.
- Brown, M.D., Green, P., Skinner, M.A., 1994. VP2 sequences of recent European "very virulent" isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strain. *J. Gen. Virol.* 75, 675-680.

- Chang, H.C., Lin, T.L., Wu, C.C., 2003. DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 21, 507-13.
- Chen, H.Y., Zhou, Q., Zhang, M.F., Giambone, J.J., 1998. Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of nine infectious bursal disease viruses from mainland China. *Avian Dis.* 42, 762-769.
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B., Delmas, B., 2004. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 78, 3296-303.
- Cui, X., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 2003^a. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *J. Virol. Methods.* 109, 75-83.
- Cui, X., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 2003^b. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display. *J. Virol. Methods.* 114, 109-12.
- Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas., 2000. Doenças das Aves. Campinas – SP 200, 301-313.
- Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., Silverman, G.J., 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 5399-404.
- Hudson, P.J., McKern, N.M., Power, B.E., Azad, A.A., 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14, 5001-5012.
- Hulse, D.J., Romero, C.H., 2004. Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes. *Vaccine* 22, 1249-59.
- Iniguez, P., Zientara, S., Marault, M., Machin, I.B., Hannant, D., Cruciere, C., 1998. Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *J. Virol. Methods.* 73, 175-83.

- Islam, M.R., Zierenberg, K., Müller, H., 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein *VP1* of very virulent infectious bursal disease virus (*IBDV*) is phylogenetically distinct from that of all other *IBDV* strains. *Arch. Virol.* 146, 2481–2492.
- Kawazoe, U., da Silva Júnior, A., 2003. Sequência de aminoácidos desenvolvida em laboratório destrói parasita causador da coccidiose. *Jornal da Unicamp.*
- Kim, S.J., Sung, H.W., Han, J.H., Jackwood, D., Kwon, H.M., 2004. Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Vet Microbiol.* 101, 39-51.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J.C., Delmas, B., 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus *VP4* and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81, 983–992.
- Li, J., Huang, Y., Liang, X., Lu, M., Li, L., Yu, L., Deng, R., 2003. Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens: factors influencing efficacy. *Virus Res.* 98, 63-74.
- Lima, A.M.C., Santos, B.M., Silva, P.L., 1996. Distribuição do vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrício em embriões de galinha. *Conferência Apinco 1*, 95.
- Lowman, H.B., Wells, J.A., 1993. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent *phage display*. *J. Mol. Biol.*, 234, 564-578.
- Lukert, P.D., Saif, Y.M., 1997. Infectious bursal disease virus. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M., editors. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press. 721-38.
- McNulty, M.S., Allan, G.M., McFerran, J.B., 1979. Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys. *Avian Pathol.* 8, 205-12.
- Muller, H., Becht, H., 1982. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.* 44, 384–392.
- Oleksiewicz, M.B., Botner, A., Toft, P., Normann, P., Storgaard, T., 2001. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by

- phage display*: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J. Virol.* 75, 3277-90.
- Prudencio, C.R., 2004. Utilização do "*phage display*" para identificação de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas y policlonais anti-proteínas totais de larvas do *Boophilus microplus*. Dissertação de mestrado-Universidade Federal de Uberlândia.
- Ribas, J.C., Wickner, R.B., 1992. RNA-dependent RNA polymerase consensus sequence of the L-A double-stranded RNA virus: definition of essential domains. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2185–2189.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Spies, U., Muller, H., Becht, H., 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Vírus Res* 8, 127–140.
- Tacken, M.G.J., Peeters, B.P.H., Thomas, A.A.M., Rottier, P.J.M., Boot, H.J., 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein *VP3* interacts both with *VP1*, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* 76, 11301–11311.
- Tacken, M.G., Rottier, P.J., Gielkens, A.L., Peeters, B.P., 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein *VP3* interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, *VP1*. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt. 1), 209–218.
- Tacken, M.G., Van Den Beuken, P.A., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., Boot, H.J., 2003. Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins *VP3*, *pVP2*, *VP4*, and *VP5*: mapping of the interacting domains. *Virology* 312, 306–319.
- Tsukamoto, K., Saito, S., Saeki, S., Sato, T., Tanimura, N., Isobe, T., Mase, M., Imada, T., Yuasa, N., Yamaguchi, S., 2002. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing *VP2* antigens. *J. Virol.* 76, 5637-45.

Wang, X.M., Zeng, X.W., Gao, H.L., Fu, C.Y., Wei, P., 2004. Changes in VP2 Gene During the Attenuation of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Strain Gx Isolated in China. Avian Dis. 48, 77-83.

CONCLUSÃO:

Os galos SPF forneceram resultados satisfatórios quanto à quantidade e principalmente quanto à especificidade dos anticorpos gerados.

O imunoenensaio ELISA provou ser eficiente na seleção de fagos específicos para *IBDV*, com diversos clones selecionados representando prováveis motivos de proteínas virais, especificamente **QXXXF** e **FXS**, tendo como alvo principal as proteínas *VP1*, poliproteína *VP2-3-4* e *VP5*.

Dentre os peptídeos selecionados, alguns apresentaram homologia com regiões onde mutações na proteína *VP1* (**Lys13Thr**) e na proteína *VP2* (**S330R**) estão relacionadas à virulência das cepas (**FLSQQTQNSHS** e **QQQQQFYSATNS**, respectivamente). Outros peptídeos, como **HHSATLFSQFQN** e **QQQQQFYSATNS**, apresentaram homologia com a região hipervariável da *VP2* e também com regiões de interações entre as proteínas do vírus, como: **NQLAHFFESASP** no domínio de interação *VP3-VP4*, **SNTASYFQQQQQ** no domínio de auto-interação da *VP5* e **VMTQSDVFYSRR** na região de interação entre *VP3* com as fitas de RNA e com a *VP1*.

A técnica de *phage display* foi efetiva na busca de peptídeos-alvo específicos para o vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício. É importante e viável a continuidade deste trabalho para a busca de peptídeos com uso potencial em diagnósticos mais eficientes e precisos, e para a produção de vacinas mais estáveis, pois seus surtos, que periodicamente ressurgem, são invariavelmente causados por cepas cada vez mais virulentas, acarretando enormes perdas no mercado avícola.

ANEXO 1:

Reagentes para realização de gel SDS-PAGE (16%):

Gel de separação:	Tris-HCl 0,375M pH 8,8 SDS 0,1% EDTA 2mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125%
Gel de empilhamento:	Tris-HCl 0,125M pH 6,8 SDS 0,1% EDTA 2mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125% H ₂ O
Tampão Eletrodo pH 8,3 (4X):	Tris-HCl 0,1M EDTA 7,8M Glicina 0,77M SDS 3% H ₂ O
Tampão da amostra:	Tris-HCl 0,1M pH 6,8 SDS 4% Glicerol 20% Azul de bromofenol 0,2% H ₂ O
Solução de Coomassie-blue 0,1% (coloração do gel) Solução descorante:	Álcool Etilico 30% Acido Acético 10% H ₂ O 60%

ANEXO 2:

Reagentes/concentrações utilizados nos ciclos de seleção (*Biopanning*):

Meio LB (Por litro)	10 g Bacto-Tryptona, 5 g Extrato de Levedura, 25 g NaCl.
IPTG / Xgal	1,25g IPTG + 1g Xgal +25ml Dimetil Formamida.
Agarose Top (Por litro)	10g Bacto-Tryptona, 5g extrato de levedura, 25g NaCl, 1g MgCl ₂ -6H ₂ O, 7g Agarose.
Tetraciclina (estoque)	20mg/ml Álcool Etilico
PEG/NaCl: 20% (w/v)	Polietilenoglicol, 2,5M NaCl.
Tampão Iodeto	10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 4M NaI.

FU00034893-0