

CONSTRUÇÃO DE UM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 COM UMA DELEÇÃO NO GENE VIRION HOST SHUTOFF

Marcos Schaan Profes¹, Franciscus Antonius Maria Rijsewijk¹, Paulo Michel Roehé¹ e Ana Cláudia Franco¹ (orient.)

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; marcos_s_p@yahoo.com.br; ana.franco@ufrgs.br.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, é uma das maiores causas de encefalite viral bovina no Brasil. Os alfa herpesvírus possuem uma proteína estrutural, a *virion host shutoff* (vhs), codificada pelo gene UL41. Esta proteína está presente no tegumento viral e inicia a degradação de mRNAs, inibe a produção proteica da célula hospedeira e conseqüentemente inibe a expressão celular de moléculas como MHC de classe I. Além disso, a vhs interfere nas respostas celulares por interferon e é essencial para o bloqueio da ativação de células dendríticas, as quais são um dos alvos do vírus. Estes efeitos da vhs interferem na resposta imune do hospedeiro contra os alfa herpesvírus. Considerando isso, os vírus com uma deleção no gene UL41, além de serem menos patogênicos, podem induzir uma forte resposta imune, o que os transformariam em fortes candidatos para o desenvolvimento de vacinas atenuadas. Com a intenção de construir um BHV-5 atenuado que também poderia ser utilizado como uma vacina diferencial, descrevemos aqui a deleção do gene UL41 no genoma de um BHV-5 recombinante, anteriormente produzido, que contém três deleções (EVI88/95 gI/gE/US9). Com esse propósito, as regiões flangeadoras (5' e 3') do gene UL41 foram amplificadas e clonadas cada uma no vetor pCR2.1-TOPO. Após isso, a região 3' foi sub-clonada no vetor que continha a região 5' sendo que a orientação dos fragmentos foi analisada por enzimas de restrição. Um clone com ambas as regiões na mesma orientação do genoma viral foi escolhido para a inserção do gene *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) sob o controle do promotor *ie1/2* do citomegalovirus humano. O gene EGFP será clonado entre os fragmentos 5' e 3' do UL41. Nesse momento, essa construção estará pronta para ser co-transfectada com o DNA viral para permitir a recombinação e conseqüentemente a deleção do gene UL41. A co-transfecção será realizada em células de traquéia de embriões bovinos de acordo com o método de fosfato de cálcio. Os mutantes expressando EGFP no locus do UL41 serão selecionados em um microscópio de luz UV e serão purificados e multiplicados. O DNA de um dos recombianes será analisado por enzimas de restrição e parcialmente seqüenciado, sendo que posteriormente suas propriedades de crescimento *in vitro* serão caracterizadas. Esse vírus será usado em futuros experimentos com animais com o objetivo de caracterizar as suas propriedades imunogênicas.

(Apoio: CNPq)