

# TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS (VBIG) PELO SEQÜENCIAMENTO DO SEGMENTO S1 E MODELAGEM PROTÉICA

JT Abreu<sup>\*1</sup>, CJ M Veloso<sup>1</sup>, JS Resende<sup>2</sup>, RB Flatschart<sup>2</sup>, ÁV-F Flatschart<sup>3</sup>, SN Júnior<sup>4</sup>, MM Santoro<sup>4</sup>, ACR Mendes<sup>1</sup>, LDZ Diniz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escola de Veterinária – PUC MG-Unidade Betim, MG, Brasil

<sup>2</sup> Dep. Med. Vet. Preventiva, EV/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Dep. Bioquímica e Imunologia, ICB/ UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

## Introdução

O VBIG membro da família *Coronaviridae*, contém quatro proteínas estruturais, sendo a glicoproteína S constituída de duas subunidades (S1 e S2). A glicoproteína S apresenta diversos determinantes antigênicos indutores de anticorpos neutralizantes e, recentemente, epítotos indutores de imunidade celular também têm sido descritos (3, 4). A classificação dos sorotipos é baseada na análise da subunidade S1 através de diferentes metodologias. Programas de vacinação e medidas de controle vêm sendo implementadas em diversas partes do mundo, e mesmo assim novos surtos vêm ocorrendo (1, 2). Idealmente, a escolha das estirpes vacinais deve ser baseada em informações de tipificação dos isolados locais circulantes. O presente trabalho faz parte de um estudo de caracterização de isolados brasileiros do VBIG pelo seqüenciamento do segmento S1. Foi feita, de forma inédita, a modelagem e a dinâmica molecular da proteína S1 de VBIGs (14 isolados brasileiros e estirpes M41, H120 e H52 obtidas do GenBank), o alinhamento estrutural e a construção de dendrogramas com as estruturas modeladas.

## Material e Métodos

Foram analisados 14 isolados de VBIG oriundos de casos clínicos de doença respiratória, renal e reprodutiva em plantéis não vacinados e vacinados no Estado de Minas Gerais no período de 1972 a 1989. Como controles, foram utilizadas nove estirpes de referência do VBIG. A produção viral, extração dos RNAs, RT-PCRs e purificação dos produtos foram realizadas de acordo com Abreu (1). O sequenciamento foi feito na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. As seqüências foram analisadas pelo programa E-GENE e alinhadas com outras 33 de VBIGs disponíveis em bancos de dados (GenBank) pelo ClustalW (EMBL). Os modelos protéicos foram elaborados por homologia, tomando como referência o modelo estrutural da subunidade S1 do SARS-CoV (PDB ID 1Q4Z) elaborado por Spiga et.al. (5). Os modelos foram elaborados com o uso do software MODELLER, otimizados e protonados com o RESUME e solvatados com o VMD. Estes modelos foram minimizados e refinados por meio de dinâmica molecular computacional com o uso do software NAMD. Os modelos refinados tiveram seus parâmetros estruturais validados com o programa PROCHECK. As análises dos perfis de hidrofobicidade, cargas, polaridade e cavidades foram feitas com o uso dos softwares VMD e VEGAZZ. A superfície acessível dos potenciais sítios de glicosilação, distribuição das cisteínas e das regiões hipervariáveis (HVRs) foram analisadas pelo uso do software RasMol. Os limites das HVRs 1, 2 e 3, foram definidos de acordo com trabalhos anteriores (2, 3, 4). As análises de similaridade e sobreposição estrutural entre as proteínas modeladas foram feitas com os softwares FRIEND e MODELLER.

## Resultados e discussão

Produtos de aproximadamente 1720 pb dos isolados e estirpes do VBIG foram amplificados pela PCR. Todos os modelos de proteína S1 apresentaram-se formados por  $\alpha$  hélices com algumas folhas  $\beta$ , formando "loops" de comprimento variável. Esses achados são condizentes com estudos anteriores (2, 3). O posicionamento das HVRs, dos sítios de glicosilação e cisteínas foram diferentes nos isolados e estirpes de VBIG, demonstrando que seqüências de aminoácidos (aa) bastante similares podem originar proteínas de conformações e funções diferentes, sendo o inverso também verdadeiro. Os alinhamentos estruturais feitos com o programa Friend baseados nos modelos de todos os isolados brasileiros e estirpes M41, H120 e H52, mostraram que somente as regiões hidrofóbicas presentes no cerne das moléculas são similares entre os VBIGs. A partir dos alinhamentos estruturais foi possível construir dendrogramas que segregam os VBIGs em seis grandes grupos. Isolados obtidos numa mesma região e época apresentaram diferentes similaridades de aa e estruturais. Quatro isolados brasileiros classificados geneticamente como Massachusetts, apresentaram-se em grupos distintos das estirpes de mesmo sorotipo, quando analisados estruturalmente, pelo fato da classificação pela modelagem protéica não coincidir com genotipagem, gerando dados para futuros trabalhos.

## Conclusões

Considerando a análise por seqüenciamento e modelagem protéica do gene de S1 os isolados brasileiros avaliados formaram um grupo distinto dos outros VBIGs (M41, H120 e H52) e apresentaram grande diversidade genética entre si e em comparação com outros VBIGs de referência. A modelagem da estrutura de S1 dos isolados brasileiros e das estirpes M41, H120 e H52, associada ao alinhamento estrutural, permitiu descobrir que as regiões exteriorizadas dessa proteína não apresentaram similaridades significativas, mesmo entre VBIGs com grande similaridade gênica.

## Agradecimentos

Apoio financeiro: FIP (PUC Minas), FAPEMIG, FINEP, CNPq e FEP – MVZ- Coordenação Preventiva.

## Bibliografia

1. Abreu, J. T. Caracterização molecular de isolados brasileiros do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. 2006. 219 p. Tese (Doutorado em Microbiologia). UFMG.
2. Cavanagh, D. *Veterinary Research* 2007; 38: 281-297.
3. Ignjatovic, J. & Sapats, S. *Archives of Virology* 2005; 150: 1813-1831.
4. Schikora, B. M., Shih, L. M., Hietala et al. *Archives of Virology* 2003; 148: 115-136.
5. Spiga, O., Bernini, A., Ciutti A. et al. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 2003; 310: 78-83.