

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA UMA CEPA DO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA NO
GENE DA GLICOPROTEÍNA C**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Evandro Reinoldo Winkelmann

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA UMA CEPA DO HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA NO GENE DA
GLICOPROTEÍNA C**

por

Evandro Reinoldo Winkelmann

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

Orientador: Prof. Rudi Weiblen, PhD

Santa Maria, RS, Brasil
2006

Winkelmann, Evandro Reinoldo, 1978-

W774p

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra uma cepa do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva no gene da glicoproteína C / por Evandro Reinoldo Winkelmann ; orientador Rudi Weiblen. – Santa Maria, 2006
43 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2006.

1. Medicina veterinária 2. Híbridomas 3. BoHV-1
4. BoHV-5 5. Pesquisa 6. Diagnóstico I. Weiblen, Rudi, orient. II. Título

CDU: 619:578

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

©2006

Todos os direitos autorais reservados a Evandro Reinoldo Winkelmann. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: DMVP/CCR/UFSM – Laboratório de Virologia, Prédio 20, Sala 4200, Santa Maria, RS, CEP97105-900.

Fone/Fax: (55) 3220 8834. E-mail: evandro_winkelmann@hotmail.com

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA UMA CEPA DO HERPESVÍRUS BOVINO
TIPO 1 DEFECTIVA NO GENE DA GLICOPROTEÍNA C**

elaborada por
Evandro Reinoldo Winkelmann

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rudi Weiblen, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)

Fábio Pereira Leivas Leite, PhD, UFPel

Valéria Maria Lara Carregaro, Dr, UFSM

Santa Maria, 29 de agosto de 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Virologia e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade oferecida.

Aos Professores Rudi e Eduardo, pela orientação, exemplo de dedicação e ensinamentos. À professora Luciane, pela colaboração, aprendizado e amizade. Agradeço por estarem sempre presentes e por mostrarem o melhor caminho a ser seguido.

À minha esposa Sandra, pelo amor, incentivo e dedicação. Sem ela, muitos dos obstáculos teriam sido mais difíceis de serem vencidos.

À minha família, especialmente aos meus pais, que sempre incentivaram meu estudo e dedicação.

Aos colegas, bolsistas, funcionários, colaboradores e amigos do Setor de Virologia. Com certeza, todos tiveram uma participação na realização desse trabalho, incentivando, ajudando e contribuindo de uma forma ou de outra para que ao final estivesse da melhor forma possível.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro que viabilizaram a execução desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA UMA CEPA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA NO GENE DA GLICOPROTEÍNA C

AUTOR: EVANDRO REINOLDO WINKELMANN

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 29 de agosto de 2006.

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas significativas para a bovinocultura. Anticorpos monoclonais (AcMs) se constituem em importantes ferramentas para o diagnóstico e pesquisa em diversos aspectos da biologia desse agente. A maioria dos AcMs produzidos contra o BoHV-1 são direcionados contra a glicoproteína C (gC), um antígeno abundante e imunodominante do envelope viral. No presente trabalho, antígenos de uma cepa do BoHV-1 defectiva no gene da gC foram utilizados para a imunização de camundongos visando a produção de AcMs com outras especificidades protéicas. Após fusão e seleção de 54 clones resistentes ao meio seletivo HAT, foram obtidos três hibridomas secretores de AcMs contra antígenos do BoHV-1 (1F1, 2H4, 4D7). Os AcMs pertenceram ao isotipo IgG2a e reagiram em diluições de até 1:640 (sobrenadante de cultivo) e 1:20.000 (fluido ascítico) em testes de imunofluorescência indireta (IFA) e imunoperoxidase indireta (IPX). Os três AcMs reagiram na IFA com 14 isolados de doença respiratória e/ou genital e com 17 isolados de doença neurológica, e apresentaram atividade neutralizante em níveis variáveis contra a grande maioria desses isolados. A especificidade protéica dos AcMs não foi determinada, pois nenhum deles reagiu com proteínas virais na técnica de Western blot. Por outro lado, os três AcMs reagiram na IFA contra antígenos virais de cepas do BoHV-1 e BoHV-5 com deleção dos genes que codificam as proteínas gC, gE, gI e US9, demonstrando que são direcionados contra outros antígenos virais. Pelo seu alto título de reação e pelo amplo espectro de reatividade, esses AcMs possuem aplicação potencial em técnicas diagnósticas. Esses AcMs também podem ser úteis para o mapeamento de epitopos neutralizantes conservados nas glicoproteínas do envelope.

Palavras-chave: BoHV-1, BoHV-5, hibridomas, pesquisa, diagnóstico.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO A BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 STRAIN DEFECTIVE IN THE GENE CODING FOR THE GLYCOPROTEIN C

AUTHOR: EVANDRO REINOLDO WINKELMANN

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, August, 29th, 2006.

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is an important pathogen of cattle and causes significant economic losses to livestock industry. Monoclonal antibodies (mAbs) represent useful tools for diagnostic and research purposes. Most mAbs produced against BoHV-1 are directed to glycoprotein gC (gC), an abundant and immunodominant envelope antigen. In the present study, antigens of a BoHV-1 strain defective in the gene coding for glycoprotein C was used to immunize BALB/c mice to produce mAbs with other protein specificities. After fusion and selection of 54 hybridomas resistant to the selective medium HAT, three hybridomas secreting mAbs directed to BoHV-1 antigens were obtained (1F1, 2H4, 4D7). The mAbs belong to the IgG2a isotype and reacted in an indirect fluorescent antibody assay (IFA) and indirect immunoperoxidase staining (IPX) of BoHV-1-infected cells at dilutions up to 1:640 (culture supernatant) and 1:20,000 (ascitic fluid). The three mAbs tested reacted with 14 isolates of respiratory and/or genital disease and with 17 isolates of neurological disease and showed variable level of neutralizing activity against the most of these isolates. The protein specificity of the mAbs could not be determined, because none of them reacted with viral proteins in western immunoblot. On the other hand, the three mAbs reacted in IFA with viral antigens of BoHV-1 and BoHV-5 mutant strains defective on gC, gE, gI and US9 genes, demonstrating that they are directed against other viral antigens. Because the high reaction titer and the wide range of reactivity, these mAbs have potential use in diagnostics techniques. Also, these mAbs may be useful to map conserved neutralizing epitopes in the envelope glycoproteins.

Key words: BoHV-1, BoHV-5, hybridomas, research, diagnostic.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Caracterização de anticorpos monoclonais (AcMs) produzidos contra antígenos de uma cepa de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) defectiva na glicoproteína gC (IBRVdlTKdlgIII).....	31
TABELA 2 – Reatividade e atividade neutralizante dos anticorpos monoclonais com isolados de campo e cepas padrão de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5).....	32

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Reatividade dos anticorpos monoclonais nas técnicas de imunoperoxidase indireta (IPX) (linhas 1 e 2) e imunofluorescência indireta (IFA) (linhas 3 e 4). Células infectadas com a cepa de BHV-1 IBRVdlTKdlgIII (linhas 1 e 3) e células não infectadas (linhas 2 e 4) foram testadas, utilizando-se os AcMs 1F1 (coluna A), 2H4 (coluna B) e 4D7 (coluna C) como anticorpos primários.....33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CAPÍTULO 1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA UMA CEPA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA NO GENE DA GLICOPROTEÍNA C.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	20
Material e métodos.....	22
Resultados e discussão.....	24
Referências	28
3. CONCLUSÕES.....	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A subfamília *Alphaherpesvirinae* abriga vários patógenos importantes de humanos e de animais, incluindo os vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), o vírus da pseudorraiva (PRV), entre outros (ROIZMAN et al., 1992). Os vírus dessa subfamília apresentam um espectro amplo de hospedeiros, ciclo replicativo curto e se disseminam rapidamente em células de cultivo, resultando em lise celular. Após a infecção aguda, os herpesvírus estabelecem infecções latentes em seus hospedeiros, principalmente em neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos, sendo esta característica importante para a perpetuação desses vírus na natureza (ROIZMAN et al., 1992; ROCK, 1994).

Os vírions são formados por DNA genômico de 136kb envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico (95-110nm de diâmetro) composto por 162 capsômeros. O capsídeo é recoberto por uma zona eletrodensa denominada tegumento e por um envelope lipoprotéico derivado de membranas celulares, no qual glicoproteínas codificadas pelo vírus estão inseridas (ROIZMAN et al., 1992). O número de glicoproteínas presentes no envelope é variável entre os herpesvírus. Por exemplo, o HSV apresenta pelo menos 11 glicoproteínas (ROIZMAN et al., 1992).

As glicoproteínas dos herpesvírus estão envolvidas em diversas etapas da multiplicação viral. São responsáveis pela ligação inicial dos vírions aos receptores celulares e subsequente penetração na célula hospedeira, sendo assim responsáveis pelo tropismo do vírus por tecidos e órgãos. Também estão envolvidas na morfogênese dos vírions, no egresso das partículas víricas e na transmissão do vírus entre células (SPEAR, 1985). Algumas glicoproteínas servem como receptores para a porção Fc de imunoglobulinas G (IgGs) ou fator C3b do complemento, interferindo na modulação da resposta imune pelo hospedeiro (BRYANT et al., 2003). A maioria das funções das glicoproteínas têm sido estudadas pelo uso de anticorpos monoclonais (AcMs), expressão de genes individuais em células eucariotas e pela produção de vírus com deleções de certos genes (SPEAR, 1985; 1993).

O seqüenciamento do genoma do BoHV-1 revelou a existência de 10 ORFs (*open reading frame*) que codificam glicoproteínas (MISRA et al., 1988; WHITBECK et al., 1988; FITZPATRICK et al., 1989; TIKOO et al., 1990; MEYER et al., 1991; LEUNG-TACK et al., 1994; REBORDOSA et al., 1994; VILCEK et al., 1995; SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Os produtos prováveis dessas seqüências codificantes foram denominados gB, gC, gD,

gE, gG, gH, gI, gK, gL e gM, de acordo com a sua homologia com o HSV-1, considerado o protótipo da subfamília *Alphaherpesvirinae* (BARANOWSKI et al., 1996). Os genes das glicoproteínas gB (UL27), gC (UL44), gH (UL22), gL (UL1), gK (UL53) e gM (UL10) estão localizados na região única longa (UL) do genoma, enquanto que os quatro genes restantes, gG (US4), gD (US6), gI (US7) e gE (US8), localizam-se na região única curta (US) (BARANOWSKI et al., 1996).

As glicoproteínas gB, gC e gD do BoHV-1, anteriormente denominadas gI, gIII e gIV, respectivamente, estão presentes em grandes quantidades no envelope viral e na membrana plasmática de células infectadas. O papel das glicoproteínas na patogenia do BoHV-1 e as suas interações com o sistema imune do hospedeiro tem sido exaustivamente estudados (TIKOO et al., 1995). Outras glicoproteínas do BoHV-1 foram identificadas e denominadas gH (gII/gp108), gE (gp93), gp42 e gG. Essas glicoproteínas parecem ser menos abundantes no envelope, mas algumas delas, tais como a gH, são essenciais para a replicação viral em cultivo celular (BARANOWSKI et al., 1996).

O BoHV-1 e o BoHV-5 são relacionados entre si, apresentando, porém, diferenças importantes de patogenicidade (MEYER et al., 2001). Até 1992, o BoHV-5 era classificado como subtipo 3 do BoHV-1 (BoHV-1.3), baseado em propriedades comuns entre os dois vírus, incluindo a morfologia (FRENCH, 1962a; WILD et al., 1998), efeito citopático em cultivo celular (FRENCH, 1962a) e reatividade cruzada pelas técnicas de imunofluorescência e soroneutralização (FRENCH, 1962b; EUGSTER et al., 1975). Estudos filogenéticos baseados nas seqüências da gB e gD também demonstraram uma estreita relação entre esses alfa herpesvírus (ROS & BELÁK, 1999).

Os genomas do BoHV-1 e BoHV-5 apresentam uma homologia de 85% entre si (ENGELS et al., 1986; DELHON et al., 2003). Por outro lado, estudos comparativos *in vitro* demonstraram diferenças genômicas e antigênicas entre os dois vírus, verificadas por análise de restrição (BRAKE & STUDDERT, 1985; ENGELS et al., 1986; BULACH & STUDDERT, 1990), testes de neutralização cruzada (BAGUST & CLARK, 1972; METZLER et al., 1986), cinética de neutralização (BRATANICH et al., 1991), SDS-PAGE com polipeptídeos marcados (METZLER et al., 1986; SCHUDEL et al., 1986), reatividade com anticorpos monoclonais (METZLER et al., 1986; FRIEDLI & METZLER, 1987) e caracterização dos genes que codificam as glicoproteínas gC (CHOWDHURY, 1995), gD (ABDELMAGID et al., 1995), gG (ENGELHARDT & KEIL, 1996), gH (MEYER et al., 1999) e gE (CHOWDHURY et al., 2000).

A gC é uma das glicoproteínas mais abundantes do envelope viral e também está presente em quantidade considerável na membrana plasmática de células infectadas (VANDRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, et al., 1984; MARSHALL et al., 1986). Essa glicoproteína induz resposta por anticorpos neutralizantes (BABIUK, et al., 1987) e é reconhecida por linfócitos T CD4+ e CD8+ (HUTCHINGS et al., 1990; LEARY & SPLITTER, 1990; DENIS, et al., 1993). A gC é a principal glicoproteína envolvida na ligação do vírus com receptor semelhante à heparina (OKAZAKI et al., 1987; 1991; LIANG et al., 1991).

A gC do BoHV-1 é um dímero de 180/97KDa, composta por 521 aminoácidos (aa), possuindo um peptídeo sinal entre os aa 7 e 21; uma região intermediária e um domínio transmembrana entre os aa 467 e 500, seguida por uma região C-terminal hidrofílica (FITZPATRICK et al., 1989). A gC do BoHV-5 é um pouco menor do que a gC do BoHV-1, possuindo 471 aa (FRIEDLI & METZLER, 1987; COLLINS et al., 1993). Os 2/3 da região carboxi-terminal da gC são altamente conservados entre esses dois vírus. Essa região inclui a parte central da gC (aa 172-323), que corresponde ao domínio de ligação com os receptores de heparina (OKAZAKI et al., 1994). Por outro lado, a seqüência da região C-terminal hidrofílica do BoHV-5 difere da do BoHV-1 por ser consideravelmente menor. As diferenças nas regiões amino e carboxi-terminal, a ausência de dois sítios prováveis de glicosilação no BoHV-5, e as diferenças de cargas das regiões amino-terminal do BoHV-1 e BoHV-5 poderiam contribuir parcialmente para as propriedades diferentes desses dois vírus, incluindo as diferenças na patogênese da doença respiratória e neurológica (CHOWDHURY, 1995).

A seqüência do gene da gD do BoHV-1 codifica uma proteína de 417aa, com massa molecular de 75kDa (TIKOO et al., 1990). A comparação da seqüência de aa deduzida da seqüência dos genes que codificam a gD do BoHV-1 e do BoHV-5 demonstrou que os 2/3 da porção amino terminal da proteína (aa 1-282 da gD do BoHV-5) são conservados entre os dois vírus. Por outro lado, a região carboxi terminal (aa 355-382) da gD do BoHV-5 difere da seqüência do BoHV-1 (ABDELMAGID et al., 1995). Esses aa estão localizados na principal região hidrofílica da gD e podem ser importantes para a interação entre proteínas (TIKOO et al., 1993). Essas diferenças podem contribuir para as propriedades biológicas do BoHV-5, incluindo a neuroinvasividade (ABDELMAGID et al., 1995). A gD é essencial para a penetração dos alfa herpesvírus nas células (SPEAR, 1993). Além disso, células expressando a gD resistem a infecção pelo vírus homólogo, um fenômeno conhecido como interferência. A interferência ocorre em nível de penetração nas células e não durante a ligação do vírus ou em etapas após a penetração (CAMPADELLI-FIUME et al., 1988; JOHNSON & SPEAR, 1989).

A gD e a gB são as únicas glicoproteínas que podem induzir resposta imune que resulta em redução significativa da replicação e excreção viral (ISRAEL et al., 1992; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1993). Entretanto, a gD do BoHV-1 induz uma resposta imune mais forte e mais consistente que a gB e gC (HUTCHINGS et al., 1990). AcMs contra a gD demonstraram os maiores títulos neutralizantes na ausência de complemento e inibiram a adsorção e penetração viral (HUGHES et al., 1988; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1990; DUBUISSON et al., 1992). Esses atributos fazem da gD uma das mais importantes proteínas envolvidas na resposta imune contra o BoHV-1 (ABDELMAGID et al., 1995) e candidata potencial para a produção de vacinas de subunidade (TIKOO et al., 1995).

A gB é uma das principais glicoproteínas do envelope viral e também é encontrada na membrana plasmática de células infectadas (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1984; MARSHALL et al., 1986). A seqüência do gene da gB codifica um polipeptídeo de 932aa, que apresenta uma seqüência sinal longa, uma seqüência transmembrana e cinco potenciais sítios para glicosilação (MISRA et al., 1988; WHITBECK et al., 1988). A gB, totalmente glicosilada (gBa), apresenta uma massa molecular de 130kDa e é parcialmente clivada por proteases celulares, gerando duas subunidades, a gBb (75kDa) e a gBc (55kDa), que ficam covalentemente ligadas por pontes dissulfeto (MARSHALL et al., 1986; OKAZAKI et al., 1986; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1984, 1992). A subunidade gBb, em sua porção amino-terminal, liga-se a heparina (LI et al., 1996) e a gBc pode conter um domínio fusogênico (LI et al., 1997). Um estudo comparativo entre as seqüências de diferentes alfa herpesvírus revelou que o gene que codifica a gB é altamente conservado, especialmente na região central (ROS & BELÁK, 1999), indicando que esta glicoproteína possui um papel muito importante na biologia do vírus (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1992).

A gB induz uma forte resposta por anticorpos neutralizantes (BABIUK et al., 1987) e é reconhecida por linfócitos T CD4+ (HUTCHINGS et al., 1990; LEARY & SPLITTER, 1990). Estudos preliminares identificaram importantes epitopos presentes na gB que estão envolvidos na indução de anticorpos neutralizantes (FITZPATRICK et al., 1990a). Também tem sido sugerido que a gB esteja envolvida na interação inicial e ligação dos vírions com a célula (LIANG et al., 1991), penetração e fusão com a célula hospedeira (FITZPATRICK et al., 1990b). A clivagem da gB pode ser necessária para a disseminação do vírus entre células (KOPP et al., 1994).

A glicoproteína G (gG), além de ser encontrada no envelope viral, é também secretada após o processamento proteolítico em células infectadas. A sua função, no entanto, permanece

desconhecida. A gG foi inicialmente caracterizada no HSV-2 como uma glicoproteína secretada de 92kDa (MARSDEN et al., 1984; SU et al., 1987). Quando expressada naturalmente, a gG do BoHV-1 e do BoHV-5 é um polipeptídeo secretado, com massa molecular de 65kDa. No entanto, pode estar associada com glicoaminoglicanos (GAGs), sendo denominada de glicopeptideoglicano G (gpgG) e alterando sua massa molecular para 90-240kDa (ENGELHARDT & KEIL, 1996; KEIL et al., 1996). A seqüência de aminoácidos da gG do BoHV-1 e BoHV-5 apresenta 75% de identidade e homologia no genoma de 85%. As regiões de maior homologia estão localizadas em domínios com importância estrutural, como as seqüências de ancoragem na membrana e sítios de N-glicosilação (ENGELHARDT & KEIL, 1996). A gG codificada pelos herpesvírus eqüino tipo 1 (EHV-1), herpesvírus eqüino tipo 3 (EHV-3), herpesvírus rangiferino tipo 1 (RanHV-1), herpesvírus caprino tipo 1 (CapHV-1), herpesvírus cervídeo tipo 1 (CerHV-1), BoHV-1 e BoHV-5 apresentam capacidade de ligação a citoquinas (BRYANT et al., 2003). Uma amostra de BoHV-1 defectiva no gene que codifica a gG resultou em atenuação quando inoculada em bezerros, e também foi mais imunogênica (KAASHOEK et al., 1998). A ausência da atividade de ligação da gG do BoHV-1 às citoquinas poderia explicar esse fenômeno observado *in vivo* (ENGELHARDT & KEIL, 1996). Outros autores também sugerem que a gG do BoHV-1 facilitaria a disseminação do vírus entre células (NACHAMICHI et al., 2002).

A gH, um componente essencial dos vírions, é a segunda glicoproteína mais conservada entre membros da família *Herpesviridae* (BARANOWSKI et al., 1996) e a mais conservada entre o BoHV-1 e o BoHV-5, com 86,4% de identidade (MEYER et al., 1999). O gene da gH do BoHV-1 codifica uma proteína com massa molecular de 108kDa (BARANOWSKI et al., 1995). A análise da gH por AcMs indicou que esta glicoproteína apresenta propriedades fusogênicas, provavelmente cooperando com a gB e gD na penetração e disseminação do vírus entre células (BARANOWSKI et al., 1993). Essa proteína parece não atuar como proteína de ligação aos receptores celulares (BARANOWSKI et al., 1996). Além disso, a gH do PRV está envolvida na neuroinvasividade (BABIC et al., 1996). Alguns epitopos funcionais da gH do BoHV-5 estão ausentes na gH do BoHV-1. Essas diferenças antigênicas, bem como a divergência na seqüência de um domínio, localizado entre os aa 150-250, possivelmente podem estar relacionadas com as diferenças de tropismo do vírus *in vivo* (MEYER et al., 1999). A gH do BoHV-1 forma um complexo com a gL, o qual é necessário para o processamento adequado e transporte da gH (KHATTAR et al., 1996). Da mesma forma, esse complexo é requerido para a indução de resposta imune por anticorpos neutralizantes e ancoragem da gL na membrana plasmática (KHATTAR et al., 1996).

A gE é uma glicoproteína presente em menor quantidade no envelope viral, em contraste com as glicoproteínas imunodominantes gB, gC e gD (REBORDOSA et al., 1994). A gE do BoHV-1 possui 575aa, e uma massa molecular de 92kDa, determinada por extensivas modificações pós-tradução, principalmente N-glicosilações (LEHMANN et al., 2004). A comparação da seqüência da gE do BoHV-1 e do BoHV-5 demonstrou uma identidade de aa de 72%, e 77% de similaridade entre nucleotídeos (CHOWDHURY et al., 2000), sendo a porção C-terminal a mais conservada entre os dois vírus (LEHMANN et al., 2004). A gE do BoHV-1 forma um heterodímero com uma proteína de 63kDa, homóloga a gI do HSV-1 (JOHNSON & FEENSTRA, 1987; BARANOWSKI et al., 1996). Esse complexo gE-gI mostrou-se importante para a virulência e disseminação do vírus entre células (CHOWDHURY et al., 2000). Embora dispensáveis para a replicação viral em cultivo celular, os genes da gE e gI são muito conservados entre os alfa herpesvírus estudados (BALAN et al., 1994; DINGWELL et al., 1994; LEUNG-TACK et al., 1994; REBORDOSA et al., 1994).

A gE e gI são associadas entre si logo após a sua síntese (JOHNSON et al., 1988; ZUCKERMANN et al., 1988; WHITBECK et al., 1996). Para alguns herpesvírus, esse complexo funciona como um receptor para a porção Fc da imunoglobulina G e, conseqüentemente, poderia atuar na evasão da resposta imune humoral (BAUCKE, et al., 1979; JOHNSON et al., 1988; BELL et al., 1990; DUBIN et al., 1990). *In vitro*, o complexo gE-gI está envolvido na transmissão do vírus entre células, possivelmente por promover fusão celular ou por atuar na liberação dos vírions (BALAN et al., 1994; DINGWELL & JOHNSON, 1998). Cepas defectivas na gE e/ou gI apresentam como característica um fenótipo de formação de placas menores (BALAN et al., 1994; WHITBECK et al., 1996).

A caracterização das proteínas homólogas do BoHV-1 correspondentes aos genes do HSV-1 que codificam a gK, gL e gM ainda precisa ser melhor realizada. Entretanto, tendo como base a seqüência de aa, foi calculada a massa molecular dessas três glicoproteínas, sendo que a gK apresenta 35kDa, a gL, 17kDa e a gM, 43kDa (VLCEK et al., 1995; SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

Pelo uso de anticorpos monoclonais, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al. (1984) identificaram quatro glicoproteínas que estão presentes no envelope do BoHV-1 e na membrana plasmática de células infectadas. As mesmas foram inicialmente denominadas gI, gII, gIII e gIV. Em analogia com o HSV-1, as glicoproteínas gI, gIII e gIV foram posteriormente denominadas gB, gC e gD, respectivamente.

Anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos do BoHV-1, no qual as três glicoproteínas dominantes (gB, gC e gD) foram removidas por imunoafinidade, também

permitiram a identificação de outras três glicoproteínas, denominadas gp108, gp93 e gp42 (BARANOWSKI et al., 1993). Estudos posteriores demonstraram que a gp108, gII e gH são as mesmas proteínas (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1984; BARANOWSKI et al., 1995). A formação de complexos entre as glicoproteínas gH e gL tem sido descrita em diversos alfa herpesvírus (HUTCHINSON et al., 1992; KLUPP et al., 1992, 1994; FORGHANI et al., 1994; METTENLEITER, 1994). Entretanto, uma associação similar entre a gH e gL do BoHV-1 ainda necessita ser demonstrada (BARANOWSKI et al., 1996). A gp93 do BoHV-1 foi identificada como homóloga da gE do HSV-1 (BARANOWSKI et al., 1996). A gE mostrou-se co-precipitar com uma glicoproteína de 63KDa (BARANOWSKI et al., 1993), provavelmente a gI, a qual já foi demonstrada formar um heterodímero com a gE no PRV e HSV-1 (JOHNSON & FEENSTRA, 1987; ZUCKERMANN et al., 1988). A seqüência codificante da gp42 do BoHV-1 permanece desconhecida. Entretanto, de acordo com a massa molecular, essa glicoproteína parece ser homóloga à gK do HSV-1 (BARANOWSKI et al., 1996).

Anticorpos monoclonais contra o BoHV-1 foram selecionados e distribuídos em quatro grupos de acordo com o padrão de imunoprecipitação (SHEN et al., 1991). No primeiro grupo (A) foram alocados 4 AcMs que precipitaram três glicoproteínas, com massas de 130kDa, 71kDa e 55kDa (homólogas da gB). Esses anticorpos mostraram uma alta reatividade na técnica de ELISA, entretanto apresentaram baixa atividade neutralizante. O grupo B também consistiu de quatro AcMs que precipitaram uma glicoproteína com massa de 71kDa (homóloga da gD). Os anticorpos deste grupo apresentaram uma forte atividade neutralizante. O grupo C consistiu de dezesseis AcMs que precipitaram uma glicoproteína de 97KDa (homóloga da gC). Os anticorpos deste grupo foram altamente reativos no ELISA, entretanto apresentaram uma fraca atividade neutralizante. O grupo D consistiu de dois AcMs que precipitaram um peptídeo duplo de 37/32kDa, demonstrando reação fraca no ELISA e no teste de SN.

A técnica de microscopia imunoelétrica foi utilizada para demonstrar o local de ligação de três AcMs com atividade neutralizante no BoHV-1 (WINKLER et al., 1995). Foi observado que os AcMs se ligavam apenas no envelope viral, não sendo verificada ligação no nucleocapsídeo. Também foi demonstrado pela técnica de *Western blot* que um desses AcMs reconhece uma banda de 77kDa, correspondendo a glicoproteína gD (gIV) do envelope viral. AcMs direcionados contra a gD podem ser usados para a produção de reagentes para diagnóstico em sistemas onde vacinas convencionais são empregadas, devido ao fato da gD

ser o principal antígeno tipo-específico do vírus e ser altamente imunogênica (WINKLER et al., 1995).

Além do seu uso na identificação e caracterização das glicoproteínas virais dos herpesvírus, AcMs apresentam uma importante aplicação no diagnóstico e no estudo da variabilidade antigênica do vírus, podendo ser empregados na classificação e diferenciação de isolados (MEYER et al., 1999; SOUZA et al., 2002; OLDONI et al., 2004).

Em estudos de reatividade cruzada entre o BoHV-1 e o BoHV-5, MEYER et al. (1999) utilizaram um painel com 21 AcMs direcionados contra a gH do BoHV-1, produzidos por BARANOWSKI et al. (1993). Dois desses AcMs reconheceram apenas a gH do BoHV-1, não reagindo contra a gH do BoHV-5 pela técnica de radio-imunoprecipitação (RIA). Também, não apresentaram atividade neutralizante contra amostras de BoHV-5, apenas com amostras de BoHV-1.

Painéis de AcMs produzidos contra uma cepa de BoHV-1 e contra uma cepa de BoHV-5 foram utilizados para a classificação de isolados (D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002). Três AcMs reagiram exclusivamente com isolados de BoHV-1. Um AcM reconheceu todos os isolados de BoHV-5, entretanto também apresentou reação contra a cepa Los Angeles do BoHV-1. Deve-se observar que esta cepa foi descrita como tendo sido isolada originalmente de um caso de encefalite, embora universalmente reconhecida como BoHV-1 (ENGELS et al., 1986).

Onze AcMs foram produzidos contra uma cepa de BoHV-5, sendo que dois falharam em reconhecer os isolados de BoHV-1 testados (OLDONI et al., 2004). Embora também tenham apresentado uma fraca reação com a cepa Los Angeles (BoHV-1), estes AcMs puderam ser utilizados na diferenciação entre isolados de BoHV-1 e BoHV-5.

O objetivo do presente trabalho foi produzir anticorpos monoclonais contra uma cepa de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e avaliar o seu uso potencial como reagentes em testes de diagnóstico e para pesquisa. Como a maioria dos AcMs produzidos contra antígenos do BoHV-1 são direcionados contra a gC (FRIEDLI & METZLER, 1987; SHEN et al., 1991; COLLINS et al., 1993; OLDONI et al., 2004), optou-se por utilizar antígenos de uma cepa defectiva nesta glicoproteína como forma de se obter AcMs com outras especificidades protéicas.

2. CAPÍTULO 1

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra uma cepa do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva no gene da glicoproteína C

Production and characterization of monoclonal antibodies against a bovine herpesvirus type 1 strain defective in the gene coding for the glycoprotein C

Evandro Reinoldo Winkelmann^I, Leticia Frizzo da Silva^I, Sandra Vanderli Mayer^I, Ketty Cristina Mazzutti^{II}, Eduardo Furtado Flores^{III*}, Rudi Weiblen^{III}

(Artigo a ser submetido à revista Ciência Rural, 2006)

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fone/fax: 55-3220-8034. E-mail:

flores@ccr.ufsm.br. * Autor para correspondência.

RESUMO

Uma cepa do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) defectiva no gene da glicoproteína C (IBRVdlTKdlgIII) foi utilizada para a imunização de camundongos BALB/c visando a produção de anticorpos monoclonais (AcMs). Após fusão e seleção de 54 clones resistentes ao meio seletivo HAT, foram obtidos três hibridomas secretores de AcMs contra antígenos do BoHV-1 (1F1, 2H4, 4D7). Os AcMs pertenceram ao isotipo IgG2a e reagiram em diluições de até 1:640 (sobrenadante de cultivo) e 1:20.000 (fluido ascítico) em testes de imunofluorescência indireta (IFA) e imunoperoxidase indireta (IPX). Os três AcMs reagiram na IFA com 14 isolados de doença respiratória e/ou genital e com 17 isolados de doença neurológica, e apresentaram atividade neutralizante em níveis variáveis contra a grande maioria desses isolados. A especificidade protéica dos AcMs não foi determinada, pois nenhum deles reagiu com proteínas virais na técnica de Western blot. Por outro lado, os três AcMs reagiram na IFA contra antígenos virais de cepas do BoHV-1 e BoHV-5 com deleção dos genes que codificam as proteínas gC, gE, gI e US9, demonstrando que são direcionados contra outros antígenos virais. Pelo seu alto título de reação e pelo amplo espectro de reatividade, esses AcMs possuem aplicação potencial em técnicas diagnósticas. Esses AcMs também podem ser úteis para o mapeamento de epitopos neutralizantes conservados nas glicoproteínas do envelope.

Palavras-chave: *BoHV-1, BoHV-5, hibridomas, pesquisa, diagnóstico.*

ABSTRACT

A bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strain defective in the gene coding for glycoprotein C (IBRVdlTKdlgIII) was used to immunize BALB/c mice to produce monoclonal antibodies (mAbs). After fusion and selection of 54 hybridomas resistant to the selective medium HAT, three hybridomas secreting mAbs directed to BoHV-1 antigens were obtained (1F1, 2H4, 4D7). The mAbs belonged to the IgG2a isotype and reacted in an indirect fluorescent antibody assay (IFA) and indirect immunoperoxidase staining (IPX) of BoHV-1-infected cells at dilutions up to 1:640 (culture supernatant) and 1:20,000 (ascitic fluid). The three mAbs tested reacted with 14 isolates of respiratory and/or genital disease and with 17 isolates of neurological disease and showed variable level of neutralizing activity against the most of these isolates. The protein specificity of the mAbs could not be determined, because none of them reacted with viral proteins in western immunoblot. On the other hand, the three mAbs reacted in IFA with viral antigens of BoHV-1 and BoHV-5 mutant strains defective on gC, gE, gI and US9 genes, demonstrating that they are directed against other viral antigens. Because the high reaction titer and the wide range of reactivity, these mAbs have potential use in diagnostics techniques. Also, these mAbs may be useful to map conserved neutralizing epitopes in the envelope glycoproteins.

Key words: *BoHV-1, BoHV-5, hybridomas, research, diagnostic.*

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae*, é um importante patógeno que causa grandes prejuízos para a pecuária bovina (TURIN et al., 1999). O BoHV-1 tem sido associado com manifestações clínicas como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular

(IPV), balanopostite pustular (IPB), conjuntivite e abortos, enfermidades que cursam com alta morbidade e baixa mortalidade (KAHRS, 1977; TIKOO et al., 1995).

O BoHV-1 encontra-se difundido por todo o mundo, incluindo o Brasil. A prevalência das infecções pelo BoHV-1 em rebanhos brasileiros apresenta coeficientes variáveis em diferentes regiões, sendo que grande parte das propriedades apresentam animais sorologicamente positivos. No estado do Rio Grande do Sul a prevalência de anticorpos para o BoHV-1 foi de 18,8% (LOVATO et al., 1995) e 31,9% (VIDOR et al., 1995). No estado de Goiás, a soroprevalência para o BoHV-1 nos animais foi de 51,9% (BARBOSA et al., 2005).

Os isolados de BoHV-1 foram agrupados em dois subtipos, denominados BoHV-1.1 e BoHV-1.2, de acordo com os perfis de restrição enzimática do genoma do vírus. O BoHV-1.2 foi subdividido em BoHV-1.2a e BoHV-1.2b (METZLER et al., 1985). O subtipo 1 (BoHV-1.1) é relacionado ao grupo que causa doença respiratória clássica; o subtipo 2a (BoHV-1.2a) abrange as cepas associadas com IBR/IPV e abortos, enquanto o subtipo 2b (BoHV-1.2b) causa vulvovaginite ou balanopostite, mas geralmente não está associado com abortos (MILLER, 1991). O BoHV-1 é geneticamente e antigenicamente relacionado com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), anteriormente classificado como um subtipo de BoHV-1 (BoHV-1.3) (BULACH & STUDDERT, 1990).

Anticorpos monoclonais (AcMs) têm sido utilizados para o diagnóstico e também para estudar a variabilidade antigênica do BoHV-1 e BoHV-5, sendo empregados na classificação e diferenciação de isolados do vírus (MEYER et al., 1999; SOUZA et al., 2002; OLDONI et al., 2004). A maioria dos AcMs produzidos contra os herpesvírus bovinos são direcionados contra a glicoproteína C (gC) (FRIEDLI & METZLER, 1987; SHEN et al., 1991; COLLINS et al., 1993; OLDONI et al., 2004). Essa glicoproteína é uma das mais abundantes do envelope viral e está envolvida na interação inicial dos vírions com a superfície celular,

constituindo-se no principal alvo de anticorpos neutralizantes (OKAZAKI et al., 1991; LIANG et al., 1992).

Esse trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o BoHV-1, com outras especificidades protéicas que não a gC, sendo avaliado o seu uso potencial como reagentes para o diagnóstico e pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Células e vírus

Células de linhagem de rim bovino CRIB (FLORES & DONIS, 1995) foram propagadas em meio essencial mínimo (MEM¹) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB²); 10.000 UI/l de penicilina¹, 0,2g/l de estreptomicina¹ e 2,5 mg/l de fungizona³. Células de mieloma da linhagem Sp2/0 foram propagadas em meio RPMI¹, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1mM de piruvato de sódio⁴, 2mM de L-glutamina⁴ e antibióticos e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Uma cepa de BoHV-1 (Los Angeles) com deleção do gene da glicoproteína gC e timidina kinase (IBRVdITKdlgIII) (KIT et al., 1990) foi utilizada para a imunização dos camundongos. O vírus foi biologicamente clonado três vezes pela técnica de ensaio de placa (MAHY & KANGRO, 1996) antes da produção de estoques e de antígeno viral.

Produção de antígeno

O vírus clonado foi utilizado para infectar monocamadas de células CRIB e produzir antígeno para a imunização dos camundongos. As células foram infectadas em garrafas⁵ de 150cm² com uma multiplicidade de infecção de 1 DICC₅₀/célula (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares). Após 1 hora de adsorção, o inóculo foi removido e acrescentou-se meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino. Aproximadamente 20-24h após a infecção, quando o efeito citopático abrangia aproximadamente 90% do cultivo celular, as células e o sobrenadante celular foram removidos e acondicionados em tubos de 50ml e

centrifugados a 300xg por 10 min a 4°C. O *pellet* de células foi ressuspenso em 500µl de MEM e congelado e descongelado três vezes para promover a completa lise celular e liberação das partículas víricas para o sobrenadante. Após esse procedimento, o material foi centrifugado a 2000xg por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e estocado a -70°C. Imunização dos camundongos, fusão celular, seleção de hibridomas e produção de fluido ascítico

Todos os procedimentos de imunização dos camundongos, fusão celular, seleção de hibridomas e produção de fluido ascítico foram realizados como descrito por OLDONI et al. (2004). Os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (lei número 6.638 de 8 de maio de 1979). Hibridomas secretores de anticorpos específicos contra o BoHV-1 foram selecionados através da técnica de imunofluorescência indireta (IFA), utilizando-se o sobrenadante do cultivo de hibridomas como anticorpo primário para detectar antígenos virais em células CRIB infectadas com a cepa IBRVdITKdlgIII. Após a obtenção de hibridomas secretores de AcMs específicos para o BoHV-1, cada um deles foi clonado através da técnica de diluição limitante, obtendo-se populações celulares oriundas de uma única célula. Essas células foram expandidas, o sobrenadante de cultivo foi coletado e estoques de células foram congelados. Foi também realizada a produção de fluido ascítico em camundongos, o qual foi coletado, clarificado através de centrifugação e estocado a -70°C. A partir do sobrenadante de cultivo e do fluido ascítico produzidos foi realizada a caracterização dos AcMs.

Caracterização dos anticorpos monoclonais

Os hibridomas secretores de anticorpos específicos para o BoHV-1 foram caracterizados com relação à: i. classe e subclasse de imunoglobulina; ii. título de reação nas técnicas de imunofluorescência indireta (IFA) e imunoperoxidase indireta (IPX); iii. reatividade contra isolados de campo de BoHV-1 e BoHV-5; iv. atividade neutralizante; e v.

especificidade protéica. A classe e subclasse de imunoglobulina foram determinadas utilizando um *kit*⁶ comercial seguindo as instruções do fabricante. O título de reação de cada anticorpo monoclonal foi determinado testando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultivo e do fluido ascítico como anticorpo primário nas técnicas de IFA e IPX. O espectro de reatividade de cada anticorpo monoclonal foi verificado testando-se células infectadas com diferentes isolados de campo ou cepas padrão pela técnica de IFA. A atividade neutralizante foi investigada pela técnica de soroneutralização (SN), seguindo protocolos previamente descritos (SHEN et al., 1991). A especificidade protéica foi investigada pela capacidade dos anticorpos monoclonais de se ligarem em proteínas virais imobilizadas em membrana de nitrocelulose, pela técnica de *Western blot* (OLDONI et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fusão de células de mieloma com esplenócitos de camundongos imunizados com o BoHV-1 IBRVdITKdlgIII resultou na obtenção de 54 colônias resistentes ao meio HAT. O sobrenadante de apenas três desses hibridomas reagiu especificamente com células infectadas com o BoHV-1. Os demais hibridomas produziram anticorpos que reagiram com as células CRIB não-infectadas ou não apresentaram reatividade. Vários são os fatores que podem ter interferido no sucesso da obtenção de hibridomas secretores de AcMs, entre eles a eficiência de imunização dos camundongos, incompatibilidade entre as células de mieloma e as linhagens de camundongos BALB/c, procedimentos de fusão e manutenção dos clones, entre outros (HARLOW & LANE, 1988).

Os três clones secretores de AcMs específicos para o BoHV-1 foram denominados 1F1, 2H4 e 4D7. A partir de cada um desses três clones, foram realizadas a coleta do sobrenadante de cultivo e a produção de fluido ascítico em camundongos. Tanto o sobrenadante de cultivo, quanto o fluido ascítico foram utilizados para a caracterização dos AcMs.

A isotipagem dos AcMs produzidos determinou que eles pertencem ao isotipo IgG2a (Tabela 1). O título de reação dos AcMs nas técnicas de IFA e IPX foi investigado, testando-se diferentes diluições do anticorpo em células de cultivo CRIB infectadas com o BoHV-1 (Tabela 1). O sobrenadante dos cultivos apresentou reação positiva na diluição de 1:160 (4D7) até 1:640 (2H4). Já o fluido ascítico apresentou reação positiva nas diluições de 1:10.000 (4D7) até 1:20.000 (2H4). Esses altos títulos de reatividade são propriedades desejáveis para o seu uso como reagentes em técnicas imunodiagnósticas.

A reatividade dos AcMs contra diferentes isolados do vírus foi investigada pela técnica de IFA (Tabela 2). Foram testados isolados de doença respiratória e/ou genital (supostamente BoHV-1), e isolados de doença neurológica (supostamente BoHV-5). Os três AcMs reagiram com todos os isolados testados, não podendo ser realizada a diferenciação entre os dois tipos. Isso pode ser explicado pelo fato do BoHV-1 e BoHV-5 possuírem extensiva homologia em nível de nucleotídeos e aminoácidos (BAGUST & CLARK, 1972; METZLER et al., 1986; BULACH & STUDDERT, 1990; BRATANICH et al., 1991). Assim, esses vírus são antigenicamente muito semelhantes entre si, o que dificulta a sua diferenciação por técnicas imunodiagnósticas de rotina (ROS & BELAK, 1999).

A possibilidade de diferenciação entre isolados de BoHV-1 e BoHV-5 através de AcMs é descrita por alguns autores (MEYER et al., 1999; SOUZA et al., 2002; OLDONI et al., 2004). Entretanto, as principais diferenças antigênicas entre o BoHV-1 e BoHV-5 estão na glicoproteína gC (FRIEDLI & METZLER, 1987; COLLINS et al., 1993) e a estratégia usada no presente trabalho era justamente produzir anticorpos contra outras glicoproteínas que não a gC, já que a maioria dos AcMs produzidos contra o herpesvírus bovino são direcionados contra essa glicoproteína (FRIEDLI & METZLER, 1987; SHEN et al., 1991; COLLINS et al., 1993; OLDONI et al., 2004).

A atividade neutralizante dos anticorpos monoclonais foi investigada pela técnica de soroneutralização (SN). Os resultados estão apresentados nas tabelas 1 e 2. No sobrenadante de cultivo não foi detectada atividade neutralizante. No entanto, quando avaliada a atividade neutralizante do fluido ascítico, foram observados títulos de ≤ 10 até 1.280. É interessante observar que os maiores títulos de anticorpos neutralizantes foram verificados contra a cepa homóloga utilizada na imunização dos camundongos (IBRVdITKdlgIII). A ausência de atividade neutralizante no sobrenadante de cultivo pode ser explicada pela baixa concentração de anticorpos provavelmente presente nesse fluido.

Na tentativa de se determinar a especificidade protéica dos AcMs, lisados de células infectadas com o BoHV-1 foram utilizados para a análise pela técnica de *western blot*, utilizando cada um dos três AcMs como anticorpo primário. Entretanto, não foi observada nenhuma reação positiva, não sendo possível determinar a proteína para qual cada AcM é direcionado. Então, outro procedimento foi utilizado na tentativa de se determinar a especificidade protéica dos AcMs. Amostras recombinantes do BoHV-1 e BoHV-5 que apresentava deleções dos genes que codificam as proteínas gC, gE, gI e US9 foram testadas pela técnica de IFA com cada um dos AcMs (Tabela 2). Como os três AcMs reagiram com antígenos desses vírus, certamente são direcionadas contra outras proteínas que não a gC, gE, gI e US9.

A atividade neutralizante apresentada pelos três AcMs produzidos sugere que os mesmos são direcionados contra glicoproteínas de superfície presentes no vírion. As glicoproteínas do envelope do BoHV-1 são os principais antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (BABIUK et al., 1987; DUBIN et al., 1991). Elas desempenham importantes funções, como interação entre o vírus e a célula hospedeira pela ligação nos seus receptores, penetração, disseminação do vírus entre células e egresso da partícula vírica (SPEAR, 1993). Nesse sentido, os AcMs apresentam grande importância, pois podem ser

utilizados para analisar diferenças antigênicas nas glicoproteínas e a especificidade dos epítopos de diferentes isolados (CHOWDHURY, 1995).

As principais glicoproteínas envolvidas no processo de ligação e penetração dos vírions na célula são a gC, gB e gD (LIANG et al., 1991). As glicoproteínas gB e gD estão presentes em grande quantidade no envelope de vírions e na membrana de células infectadas, induzindo uma forte resposta por anticorpos neutralizantes (BABIUK et al., 1987) e são responsáveis por grande parte da reatividade sorológica cruzada entre o BoHV-1 e BoHV-5 (COLLINS et al., 1993). A gC é uma das glicoproteínas mais abundantes do envelope viral e também induz resposta por anticorpos neutralizantes (OKAZAKI et al., 1991; LIANG et al., 1992). Entretanto, foi demonstrado que os AcMs produzidos não apresentam afinidade por esta glicoproteína. Assim, entre possíveis candidatas para a especificidade protéica dos anticorpos estão a gB e gD. Para a confirmação dessa hipótese, estudos adicionais serão necessários.

Em resumo, o presente trabalho relata a produção de três AcMs contra o BoHV-1. Os AcMs apresentaram um título alto de reação e reconheceram todos os isolados de campo testados. Essas características os candidatam para uso em diagnóstico. Ainda, apresentaram capacidade neutralizante, sendo esta propriedade importante para potencial aplicação em trabalhos de pesquisa.

FONTES DE AQUISIÇÃO

1. Cutilab, Campinas, SP, Brasil.
2. Gibco-BRL, Rockville, MD, USA.
3. Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
4. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
5. Corning Brasil Indústria e Comércio Ltda. Itaim-Bibi, SP, Brasil.
6. Mouse Type Isotyping kit, BioRad, Hercules, CA, USA.

REFERÊNCIAS

- BAGUST, T.J.; CLARK. L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.82, p.375-383, 1972.
- BABIUK, L.A. et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. **Virology**, v.159, p.57-66, 1987.
- BARBOSA, A.C.V.C., et al. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, p.1368-1373, 2005.
- BRATANICH, A.C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Zentralbl Veterinarmed [B]**, v.38, p.41-48, 1991.
- BULACH, D.M.; STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, v.113, p.17-34, 1990.
- CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent (BHV-5). **Virology**, v.213, p.558-568, 1995.
- COLLINS, J.K. et al. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **Journal of General Virology**, v.74, p.1509-1517, 1993.
- DUBIN, G. et al. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Journal of Virology**, v.65, p.7046-7050, 1991.
- FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhea virus (BVDV). **Virology**, v.208, p.565-575, 1995.

FRIEDLI K.; METZLER, A. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. **Archives of Virology**, v.94, p.109-122, 1987.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.171, p.1055-1064, 1977.

KIT, S. et al. US patent number 4992051 and 5128129. **US Patent Office**, Washington, DC, 1990.

LIANG, X. et al. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v.189, p.629-639, 1992.

LOVATO, L.T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.25, p.425-430, 1995.

MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. **Virology methods manual**. San Diego, CA: Academic Press INC, 1996. 374p.

METZLER, A. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v.85, p.57-59, 1985.

METZLER, A. et al. Bovine herpesvirus type 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, p.205-217, 1986.

- MEYER, G. et al. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v.80, p.2849-2859, 1999.
- MILLER, J.M. The effects of IBR virus infections on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v.86, p.790-794, 1991.
- OKAZAKI, K. et al. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. **Virology**, v.181, p.666-670, 1991.
- OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.213-221, 2004.
- ROS, C.; BELAK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1247-1253, 1999.
- SHEN, D.T. et al. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. **Veterinary Microbiology**, v.28, p.25-37, 1991.
- SOUZA, V.F. et al. Caracterização de amostras de herpesvírus tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.13-18, 2002.
- SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v.4, p.167-180, 1993.
- TIKOO, S.K. et al. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p.191-223, 1995.
- TURIN, L. et al. BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. **Molecular Medicine**, v.5, p.261-284, 1999.
- VIDOR, T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v.25, p.421-424, 1995.

Tabela 1 – Caracterização de anticorpos monoclonais (AcMs) produzidos contra antígenos de uma cepa de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) defectiva na glicoproteína gC (IBRVdlTKdlgIII).

AcM	Isotipo	Título ^a		Reação em IFA ^b	Reação em IPX ^c	Western <i>blot</i>	Especifi- cidade protéica	Atividade neutrali- zante
		Sobrenadante de cultivo	Líquido Ascítico					
1F1	IgG2a	320	17.500	+ ^d	+	- ^e	Não gC, não gE, não gI	+ (1280) ^f
2H4	IgG2a	160	10.000	+	+	-		+ (320)
4D7	IgG2a	640	20.000	+	+	-		+ (320)

^a Títulos expressos como a recíproca da maior diluição onde se observou reação positiva na IFA.

^b Técnica de imunofluorescência indireta.

^c Técnica de imunoperoxidase indireta.

^d Reação positiva.

^e Reação negativa.

^f Títulos expressos como a recíproca da maior diluição do AcM (líquido ascítico) capaz de neutralizar a replicação viral. Os AcMs foram testados pela técnica de soroneutralização utilizando a cepa homóloga IBRVdlTKdlgIII.

Tabela 2 – Reatividade¹ e atividade neutralizante² dos anticorpos monoclonais com isolados de campo e cepas padrão de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5).

Cepa	Quadro clínico ou origem da amostra	Anticorpos monoclonais					
		1F1		2H4		4D7	
		IFA	SN	IFA	SN	IFA	SN
Los Angeles	IBR ^a	+ ^b	40 ^c	+	40	+	160
IBRVdlTKdlgIII ^d	Cepa recombinante (IBR)	+	1280	+	320	+	320
Cooper	IBR	+	20	+	10	+	10
EVI 123/98	IBR	+	20	+	40	+	80
SV 265/96	IBR	+	40	+	40	+	80
SV453/93	IBR	+	20	+	10	+	10
LAM	IBR	+	20	+	40	+	80
LAM US9 ^{-e}	Cepa recombinante (IBR)	+	320	+	160	+	80
SV 56/90	IPV ^f	+	160	+	160	+	80
SV371/05	IBR	+	20	+	40	+	20
CE 05 - 18	Sêmen	+	20	+	20	+	40
ILAG 01 - 2420	Sêmen	+	20	+	40	+	80
CE 05 - 63	Sêmen	+	40	+	40	+	20
CIAG 04 - 1428	Sêmen	+	40	+	80	+	40
97/613	Encefalite	+	20	+	10	+	10
A663	Encefalite	+	<10	+	10	+	10
EVI 340/96	Encefalite	+	<10	+	40	+	80
P-160/87	Encefalite	+	40	+	80	+	40
P-169/97	Encefalite	+	20	+	40	+	40
RP	Encefalite	+	40	+	20	+	20
SV 136/88	Encefalite	+	10	+	10	+	10
EVI-88/95	Encefalite	+	80	+	160	+	40
EVI-88/95 gE ⁻ , gI ⁻ , US9 ^{-g}	Cepa recombinante (Encefalite)	+	80	+	20	+	40
SV106	Encefalite	+	20	+	40	+	40
SV507/99	Encefalite	+	10	+	10	+	10
SV642/99	Encefalite	+	10	+	10	+	10
SV47/05	Encefalite	+	160	+	40	+	80
SV609/03	Encefalite	+	160	+	40	+	80
SV198/05	Encefalite	+	80	+	80	+	80
SV41/06	Encefalite	+	20	+	10	+	10
SV437/04	Encefalite	+	20	+	20	+	10

¹ Testada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFA).

² Testada pela técnica de soroneutralização (SN).

^a Rinotraqueíte infecciosa bovina.

^b Reação positiva.

^c Títulos expressos como a recíproca da maior diluição capaz de neutralizar a replicação viral.

^d Cepa com deleção dos genes da timidina quinase e da glicoproteína gC.

^e Cepa com deleção do gene da proteína US9.

^f Vulvovaginite pustular infecciosa.

^g Cepa com deleção dos genes das glicoproteínas gE, gI e da proteína US9.

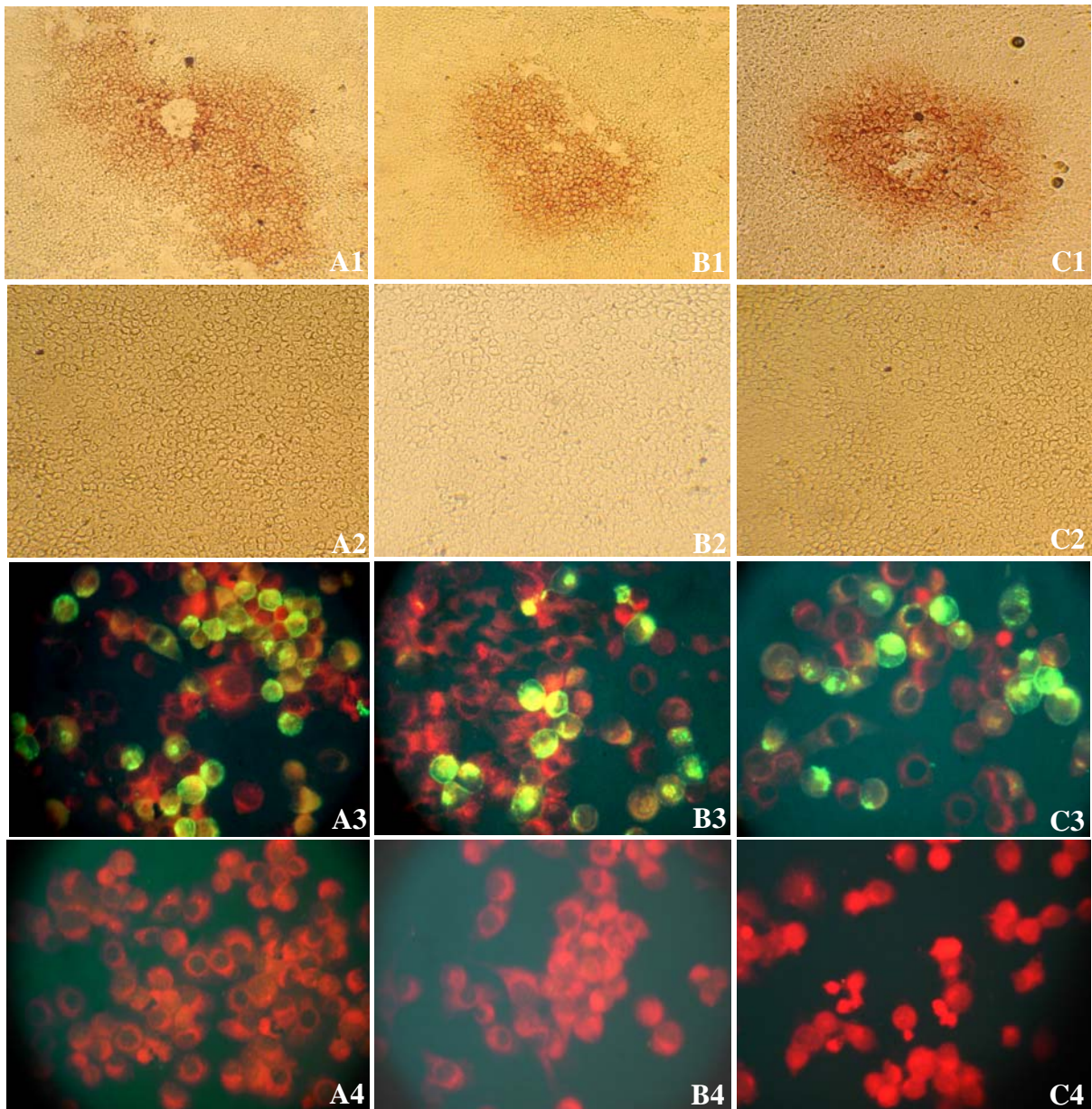


Figura 1 – Reatividade dos anticorpos monoclonais nas técnicas de imunoperoxidase indireta (IPX) (linhas 1 e 2) e imunofluorescência indireta (IFA) (linhas 3 e 4). Células infectadas com a cepa de BHV-1 IBRVdlTKdlgIII (linhas 1 e 3) e células não infectadas (linhas 2 e 4) foram testadas, utilizando-se os AcMs 1F1 (coluna A), 2H4 (coluna B) e 4D7 (coluna C) como anticorpos primários.

3. CONCLUSÕES

- Foram obtidos três anticorpos monoclonais (AcMs) com especificidades protéicas que não a gC.
- Embora não tenha sido possível determinar a sua especificidade protéica, os AcMs são provavelmente direcionados contra proteínas de superfície dos vírions.
- Os AcMs reconhecem epitopos neutralizantes conservados entre isolados de campo do BoHV-1 e BoHV-5.
- Os altos títulos de reação e o amplo espectro de reatividade dos AcMs são propriedades importantes para uso em técnicas de diagnóstico.
- Os AcMs podem ser utilizados para o mapeamento de epitopos neutralizantes nas proteínas-alvo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGID, O.Y., et al. Fine mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**, v.206, p.242-253, 1995.

BABIC, N., et al. Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. **Virology**, v.219, p.279-284, 1996.

BABIUK, L.A., et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. **Virology**, v.159, p. 57-66, 1987.

BAGUST, T.J.; CLARK. L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.82, p.375-383, 1972.

BALAN, P., et al. An analysis of the *in vitro* and *in vivo* phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. **Journal of General Virology**, v.75, p.1245-1258, 1994.

BARANOWSKI, E., et al. Identification of 108 K, 93 K and 42 K glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v.133, p.97-111, 1993.

BARANOWSKI, E., et al. Synthesis and processing of bovine herpesvirus- 1 glycoprotein H. **Virology**, v.206, p.651-654, 1995.

BARANOWSKI, E., et al. Structural and functional analyses of bovine herpesvirus type 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.91-101, 1996.

BAUCKE, R.B., et al. Membrane proteins specified by herpes simplex viruses V. Identification of an Fc-binding glycoprotein. **Journal of Virology**, v.32, p.779-789, 1979.

BELL, S., et al. Induction of immunoglobulin G Fc receptors by recombinant vaccinia viruses expressing glycoproteins E and I of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v.64, p.2181-2186, 1990.

BRAKE, F.; STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v.62, p.331-334, 1985.

BRATANICH, A.C., et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Zentralbl Veterinarmed [B]**, v.38, p.41-48, 1991.

BRYANT, N.A., et al. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. **The EMBO Journal**, v.22, p.833-846, 2003.

BULACH, D.M.; STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, v.113, p.17-34, 1990.

CAMPADELLI-FIUME, G., et al. Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. **Journal of Virology**, v.62, p.159-167, 1988.

CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent (BHV-5). **Virology**, v.213, p.558-568, 1995.

CHOWDHURY, S.I., et al. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, v.74, p.2094-2106, 2000.

COLLINS, J.K., et al. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **Journal of General Virology**, v.74, p.1509-1517, 1993.

D'ARCE, R.C.F., et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.315-324, 2002.

DELHON, G., et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, p.10339-10347, 2003.

DENIS, M., et al. Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. **Immunology**, v.78, p.7-13, 1993.

DINGWELL, K.S., et al. Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread *in vivo* and across junctions of cultured cells. **Journal of Virology**, v.68, p.834-845, 1994.

DINGWELL, K.S.; JONHSON, D.C. The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. **Journal of Virology**, v.72, p.8933-8942, 1998.

DUBIN, G., et al. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Journal of Virology**, v.65, p.7046-7050, 1990.

DUBUISSON, J., et al. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. **Journal of General Virology**, v.73, p.2031-2039, 1992.

ENGELHARDT, T.; KEIL, G.M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. **Virology**, v.225, p.126-135, 1996.

ENGELS, M., et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v.6, p.57-73, 1986.

EUGSTER, A.K., et al. Herpesvirus encephalitis in range calves. **Annual Meeting of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v.17, p.267-281, 1975.

FITZPATRICK, D.R., et al. Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses. **Virology**, v.173, p.46-57, 1989.

FITZPATRICK, D.R., et al. Mapping 10 epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIII. **Virology**, v.176, p.145-157, 1990a.

FITZPATRICK, D.R., et al. Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. **Journal of General Virology**, v.71, p.1215-9, 1990b.

FORGHANI, B., et al. Neutmlization epitope of the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex. **Virology**, v.199, p.458-462, 1994.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.216-221, 1962a.

FRENCH, E.L. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.555-556, 1962b.

FRIEDLI K.; METZLER, A. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. **Archives of Virology**, v.94, p.109-122, 1987.

HUGHES, G., et al. Functional and topographical analysis of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. **Archives of Virology**, v.63, p.47-60, 1988.

HUTCHINGS, D.L., et al. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. **Journal of Virology**, v.64, p.5114-5122, 1990.

HUTCHINSON, L., et al. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. **Journal of Virology**, v.66, p.2240-2250, 1992.

ISRAEL, B.A., et al. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus-1 replication in cattle. **Virology**, v.188, p.256, 1992.

JOHNSON, D.C.; FEENSTRA, V. Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. **Journal of Virology**, v.61, p.2208-2216, 1987.

JOHNSON, D.C., et al. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. **Journal of Virology**, v.62, p.1347-1354, 1988.

JOHNSON, R.M.; SPEAR, P.G. Herpes simplex virus glycoprotein D mediates interference with herpes simplex virus infection. **Journal of Virology**, v.63, p.819-827, 1989.

KAASHOEK, M.J., et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v.16, p.802-809, 1998.

KEIL, G.M., et al. Bovine herpesvirus 1 U(s) open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. **Journal of Virology**, v.70, p.3032-3038, 1996.

KHATTAR, S.K., et al. Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BHV-1 glycoprotein gH. **Virology**, v.219, p.66-76, 1996.

KLUPP, B., et al. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein H. **J. Virology**, v.66, p.3048-3055, 1992.

KLUPP, B., et al. Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. **Journal of Virology**, v.68, p.3868-3878, 1994.

KOPP, A., et al., Proteolytic cleavage of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or pseudorabies virus. **Journal of Virology**, v.68, p.1667-1674, 1994.

LEARY, T.P.; SPLITTER, G.A. Recombinant herpesviral proteins produced by cell-free translation provide a novel approach for the mapping of T lymphocyte epitopes. **Journal of Immunology**, v.145, p.718-723, 1990.

LEHMANN, D., et al. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display **Veterinary Microbiology**, v.104, p.1-17, 2004.

LEUNG-TACK, P., et al. The complete DNA sequence and genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpes virus type 1 (ST strain). **Virology**, v.199, p.409-421, 1994.

LI, Y., et al. Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. **Journal of Virology**, v.70, p.2032-2037, 1996.

LI, Y., et al. Functional analysis of the transmembrane anchor region of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gB. **Virology**, v.228, p.39-54, 1997.

LIANG, X.P., et al. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. **Journal of Virology**, v.65, p.1124-1132, 1991.

MARSDEN, H.S., et al. Characterization of the 92,000-dalton glycoprotein induced by herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, v.50, p.547-554, 1984.

MARSHALL, R.L., et al. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. **Journal of Virology**, v.57, p.745-753, 1986.

METTENLEITER, T.C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.42, p.153-177, 1994.

METZLER, A., et al. Bovine herpesvirus type 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, p.205-217, 1986.

MEYER, A.L., et al. Cloning and sequence of an infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1090, p.267-269, 1991.

MEYER, G., et al. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v.80, p.2849-2859, 1999.

MEYER, G., et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, p.633-652, 2001.

MISRA, V., et al. Sequence of a bovine herpesvirus- glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for the glycoprotein gB. **Virology**, v.166, p.542-549, 1988.

NACHAMICHI, K., et al. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v.294, p.22-30, 2002.

OKAZAKI, K., et al. Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. **Virology**, v.150, p.260-264, 1986.

OKAZAKI, K., et al. Intracellular localization and transport of three different bovine herpesvirus type 1 glycoproteins involved in neutralization. **Archives of Virology**, v.92, p.17-26, 1987.

OKAZAKI, K., et al. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparin-like moiety on the cell surface. **Virology**, v.181, p.666-670, 1991.

OKAZAKI, K., et al. Heparin binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. **Archives of Virology**, v.134, p.413-419, 1994.

OLDONI, I., et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.213-221, 2004.

REBORDOSA, X., et al. Mapping, cloning and sequencing of a glycoprotein-coding gene from bovine herpesvirus type 1 homologous to the gE gene from HSV-1. **Gene**, v.149, p.203-209, 1994.

ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type-1. **Seminar in Virology**, v.5, p.233-240, 1994.

ROIZMANN, B., et al. The family *Herpesviridae*: An update. **Archives of Virology**, v.123, p.425-488, 1992.

ROS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1247-1253, 1999.

SCHUDEL, A.A., et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.33, p.303-310, 1986.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.17-29, 1996.

SHEN, D.T., et al. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. **Veterinary Microbiology**, v.28, p.25-37, 1991.

SOUZA, V.F., et al. Caracterização de amostras de herpesvírus tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.13-18, 2002.

SPEAR, P.G. The herpesvirus glycoproteins. In: ROIZMAN, B. (ed.): **The herpesviruses**. Plenum Publishing Corporation: New York, v.3, p.315-347, 1985.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v.4, p.167-180, 1993.

SU, H. K., et al. Processing of the herpes simplex virus type 2 glycoprotein gG-2 results in secretion of a 34 000-Mr cleavage product. **Journal of Virology**, v.61, p.1735-1737, 1987.

TIKOO, S.K., et al. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus-1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. **Journal of Virology**, v.64, p.5132-5142, 1990.

TIKOO, S.K., et al. Analysis of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV truncation and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. **Journal of Virology**, v.67, p.2103-2109, 1993.

TIKOO, S.K., et al. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p.191-223, 1995.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. et al. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins. **Virology**, v.135, p.466-479, 1984.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., et al. The role of carbohydrates in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus Type 1 glycoproteins gI and gIV. **Journal of General Virology**, v.71, p.2053-2063, 1990.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., et al. Structural, functional, and immunological characterization of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gI expressed by recombinant baculovirus. **Virology**, v.190, p.378-392, 1992.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., et al. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. **Vaccine**, v.11, p.25, 1993.

VILCEK, C., et al. Nucleotide sequence analysis of a 30-kb region of bovine herpesvirus 1 genome which exhibits a collinear gene arrangement with the UL21 to UL4 genes of herpes simplex virus. **Virology**, v.210, p.100-108, 1995.

WHITBECK, J.C., et al. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. **Journal of Virology**, v.62, p.3319-3327, 1988.

WHITBECK, J.C., et al. Synthesis, processing, and oligomerization of the bovine herpes virus 1 gE and gI membrane proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.7878-7884, 1996.

WILD, P., et al. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v.72, p.9561-9566, 1998.

WINKLER, M.T., et al. Study of neutralizing monoclonal antibodies to bovine herpes virus type-1 (Cooper strain) by immunoperoxidase and immunoelectron microscopy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.11, p.1-4, 1995.

ZUCKERMANN, F.A., et al. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. **Journal of Virology**, v.62, p.4622-4626, 1988.