

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO
VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE PARA APLICAÇÃO
NO IMUNODIAGNÓSTICO**

Mariana Costa Mello Gonçalves
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO
VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE PARA APLICAÇÃO
NO IMUNODIAGNÓSTICO**

Mariana Costa Mello Gonçalves
Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho – 2012

G635p Gonçalves, Mariana Costa Mello
Produção de antígenos recombinantes do vírus da doença de
Newcastle para aplicação no imunodiagnóstico. / Mariana Costa Mello
Gonçalves. – – Jaboticabal, 2012
xix, 97 f. ;il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Hélio José Montassier

Banca examinadora: Manuel Víctor Franco Lemos, Everlon Cid
Rigobelo, Camilo Del Cistia Andrade, Ricardo Luiz Moro de Souza.

Bibliografia

1. Clonagem. 2. Expressão. 3. Proteínas recombinantes. 4. Vírus
da doença de Newcastle. 5. ELISA. 6. Imunodiagnóstico. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988.73:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA COSTA MELLO GONÇALVES – Nascida em janeiro de 1985, em São Paulo, SP, Brasil. Graduiu-se em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em 30 de novembro de 2006. Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado pela mesma universidade tendo obtido o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária em fevereiro de 2009. Ingressou no curso de doutorado em março de 2009, no programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal.

*O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas
tranqüilas.
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor
do Seu Nome.
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria
mal algum, porque Tu estás comigo; a Tua vara e o Teu cajado me
consolam.
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,
unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias
de minha vida e habitarei na casa do Senhor por longos dias.
(Salmo 23)*

A quem me deu a vida ... e hoje vive em mim

Soeli Izilda Costa Mello (in memoriam)

Ao meu maior amor, melhor amigo e grande parceiro

Victor Costa e Silva

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada Senhor por mais esta conquista. *‘Esperei com paciência ao Senhor, e ele se inclinou para mim, e ouviu o meu clamor’.*

A família que Deus me deu: Maria Rosa, Dinavera e Elinavera, obrigada pela compreensão e apoio, todo o esforço é por vocês.

Ao Profº Hélio José Montassier, obrigada por ter permitido que eu tivesse um caminho a trilhar. Obrigada pelo exemplo de competência e dedicação. Obrigada por tudo!

A banca examinadora : **Profº Drº Manuel Victor Franco Lemos, Drº Camilo Del Cistia Andrade, Prof Drº Everlon Cid Rigobelo, Profº Drº Ricardo Luiz Moro de Souza**, obrigada pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A Profª Drª Adolorata e Profª Drº Manuel Victor Franco Lemos, Profª Drª Karin Wether, Profº Drº Samir Issa Samara, membros da banca do exame de qualificação, obrigada pela contribuição e atenção.

A família Imunovir: Camila, Elisa, Filipe, Ketherson, Maria de Fátima, Mariana Monezi, obrigada por toda ajuda, pelo apoio, pelos conselhos e pelo prazer de conviver com vocês!

A Maria de Lourdes, obrigada pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela grande contribuição na minha formação profissional e crescimento pessoal.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Veterinária, obrigada por toda a colaboração e boa vontade.

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação, obrigada pelas orientações sempre dadas de forma tão gentil.

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp, câmpus Jaboticabal, obrigada pelas informações e correções.

A Capes, obrigada pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO LITERATURA.....	4
2.1. Doença de Newcastle: aspectos gerais	4
2.2. O agente etiológico da doença de Newcastle	5
2.3. Hospedeiros do vírus da doença de Newcastle	11
2.4. Epidemiologia da doença de Newcastle	11
2.5. Medidas de controle da doença de Newcastle	14
2.5.1. Vacinação ..	14
2.5.2. Monitoramento sorológico	15
2.6. Diagnóstico laboratorial	16
2.7. Produção de proteínas recombinantes ...	18
2.8. Aplicação das proteínas recombinantes para diagnóstico da DN..	21
III. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos gerais	23
3.2. Objetivos específicos	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Amostra viral	25
4.2. Extração do RNA viral.....	25
4.3. Reação de transcrição reversa (RT)	26
4.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	26
4.5. Análise eletroforética em gel de agarose	27
4.6. Metodologia para clonagem e expressão em <i>Escherichia coli</i>	27
4.6.1. Produção de células competentes de <i>E. coli</i> ...	27
4.6.2. Oligonucleotídeos iniciadores ...	27
4.6.3. Vetores de clonagem e expressão do produto da RT-PCR ...	28
4.6.4. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> DH10B por choque térmico ...	29
4.6.5. Análise dos clones transformantes ...	30

4.6.6. Sequenciamento dos clones bacterianos transformantes	32
4.6.7. Indução da expressão dos peptídeos recombinantes	32
4.7. Metodologia para clonagem e expressão na cepa INVScI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
4.7.1. Oligonucleotídeos iniciadores	33
4.7.2. Clonagem dos genes das proteínas HN, F e Fc do VDN	33
4.7.3. Expressão das proteínas recombinantes na cepa INVScI de <i>S. cerevisiae</i>	34
4.7.4. Extração das proteínas recombinantes das células lisadas de levedura.	35
4.8. Dosagem das proteínas recombinantes	36
4.9. Purificação das proteínas recombinantes por resina de afinidade de níquel sepharose	36
4.10. Análise da expressão das proteínas recombinantes através das técnicas de SDS-PAGE e western blot	37
4.11. Concentração do VDN com polietileno glicol para uso nas técnicas de SDS-PAGE e western blot	38
4.12. Preparo de soros de referência contra o VDN	38
4.13. Amostras de soros para aplicação em teste de imunodiagnóstico das proteínas recombinantes	38
4.13.1. Amostras de soros de galinha de postura e matrizes	39
4.13.2. Amostras de soros de frangos de corte	39
4.13.3. Amostras de soros negativos para o VDN	40
4.14. Titulação em bloco para padronização da aplicação das proteínas recombinantes do VDN no teste de ELISA indireto	40
4.15. Aplicação das proteínas recombinantes do VDN no teste de ELISA indireto HN-recombinant	41
4.16. Testes de referência	42
4.16.1. Teste de inibição da hemaglutinação (HI)	42
4.16.2. Testes Sadwiche-ELISA-Indireto Concanavalina A (S-ELISA-ConA)	43
4.17. Análise dos resultados do ELISA Indireto	44
4.18. Avaliação da sensibilidade, especificidade e acurácia	44
4.19. Soro hiperimune de cabra	45
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Propagação e titulação da infectividade viral	46
5.2. Clonagem do gene da glicoproteína HN no sistema eucariótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
5.2.1. Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores	46
5.2.2. Amplificação do inserto HN do VDN	47
5.2.3. Sequenciamento de nucleotídeos dos insertos nos clones bacterianos transformantes selecionados	48
5.2.4. Indução da expressão das proteínas recombinantes	49
5.3. Produção de antígenos recombinantes no sistema procariótico <i>Escherichia coli</i>	54

5.3.1. Fragmento HN01	54
5.3.1.1. Identificação dos clones bacterianos portadores do inserto	55
5.3.1.2. Indução da expressão do fragmento HN01	56
5.3.2. Expressão dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal do VDN	59
5.3.2.1. Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores	59
5.3.2.2. Amplificação dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal	60
5.3.2.3. Análise dos clones transformantes	61
5.3.2.4. Sequenciamento de nucleotídeos dos insertos nos clones bacterianos transformantes selecionados	63
5.3.2.5. Indução da expressão das proteínas recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal	66
5.3.2.6. Análise por SDS-PAGE e Western blot das proteínas produzidas	66
5.3.2.7. Desenvolvimento de um método indireto de ELISA com as proteínas recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal	68
5.3.2.8. Relações entre os resultados do ELISA HN N-terminal e ELISA HN C-terminal e os testes sorológicos de referência HI e S-ELISA-ConA	70
5.3.2.9. Produção de soros de cabras hiperimunizadas com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal	77
VI. CONCLUSÕES	80
VII. REFERÊNCIAS	82

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Página

Quadro 01: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos dos fragmentos específicos caracteristicamente imunogênicos clonados no vetor pET SUMO (Invitrogen) no sistema <i>E. coli</i>	28
Quadro 2. Descrição dos oligonucleotídeos do vetor pET SUMO para a avaliação dos clones transformantes de <i>E. coli</i>	30
Quadro 3. Perfis térmicos utilizados para amplificação dos insertos a serem clonados nos vetores pGEM T-Easy (Promega) e pET SUMO (Invitrogen) no sistema <i>E. coli</i>	32
Quadro 04. Oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação da proteína HN recombinante no sistema <i>S. cerevisiae</i>	33
Tabela 01. Valores de soros concordantes e discordantes positivos e negativos no teste ELISA HN N-terminal em relação aos testes HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A	72
Tabela 02. Valores de soros concordantes e discordantes positivos e negativos no teste ELISA HN C-terminal em relação aos testes HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A	72
Tabela 03. Valores concordantes positivos e negativos para os antígenos nos testes ELISA C-terminal e ELISA N-terminal	73

Tabela 04. Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia dos ensaios de ELISA C-terminal e ELISA N-terminal usando o teste HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A como referenciais	74
---	----

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 01.** Esquema do genoma do Vírus da Doença de Newcastle e organização estrutural das proteínas. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina e neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html 08
- Figura.02.** Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen) utilizado no sistema *E. coli* 29
- Figura 03.** Mapa do vetor pYES 2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) utilizado para clonagem e expressão de proteínas recombinantes no sistema *Saccharomyces cerevisiae* 35
- Figura 04** Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao gene da glicoproteína HN com 1734pb, em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) 53°C, (2)53,3°C, (3)54,1°C, (4)55°C, (5)56,4°C, (6)58,2°C, (7)60,2°C, (8) 61,9°C, (9)63,2°C, (10)64,1°C, (11)64,8°C, (12)65°C.....47
- Figura 05.** Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao gene da glicoproteína HN. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) glicoproteína HN com 1734pb, (3) glicoproteína F com 1662pb, (4) fragmento Fc com 692pb, C-: controle negativo da reação.....48
- Figura 06.** Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos seqüenciados dos clones de *E.coli* transformado pelo vetor pYES 2.1 TOPO – Gene HN da estirpe La Sota, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.....48
- Figura 07..** Eletroferograma da amplificação do fragmento HN01. Colunas: M (Marcador 10bp Invitrogen), HN01 (fragmento amplificado), C- (controle negativo da reação) 55
- Figura 08:** Eletroferograma da amplificação dos clones A9, D8, F4 e F11 para identificação da inserção do fragmento na posição correta através da técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (1): Marcador 100bp(Invitrogen), (2, 4, 6, 8) Clones amplificados com os oligonucleotídeos do inserto, (3, 5, 7, 9) Clones amplificados com o oligonucleotídeo direto do inserto e o oligonucleotídeo

reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen), (10) Controle negativo da reação 56

Figura 09. Análise por SDS Page e Western blot do fragmento recombinante HN01 expresso no sistema *E. coli* com o vetor pET SUMO. (A) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. (B) Avaliação da reatividade do fragmento recombinante com soro policlonal (colunas 1 a 5) e anticorpo monoclonal (colunas 6 a 8). .Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) LCA de VDN concentrado, (2) fragmento HN01 expresso após indução com 0,1mM de IPTG,(3) fragmento HN01 expresso após indução com 1mM de IPTG, (4) controle positivo contendo o extrato de células transformadas apenas com o vetor pET SUMO, (5) fração não induzida, (6) fragmento HN01 expresso após indução com 0,1mM de IPTG, (7) fragmento HN01 expresso após indução com 1mM de IPTG, (8) fração não induzida 56

Figura 10. Representação gráfica dos resultados da titulação em bloco com soro policlonal e anticorpo monoclonal anti-histidina, onde foi adsorvido o antígeno denominado HN01 nas concentrações de 2,5, 5 e 10ug/mL 57

Figura 11. Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao fragmento HN N-terminal em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) 50°C, (2) 50,4°C, (3)51,2°C, (4) 52,3°C, (5)53,9°C, (6) 56°C, (7) 58,3°C, (8) 60,3°C, (9) 61,9°C, (10) 62,9°C, (11)63,7°C, (12) 64°C, Controle negativo da reação 60

Figura 12. Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao fragmento HN C-terminal em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) 53°C, (2)53,3°C, (3)54,1°C, (4)55°C, (5)56,4°C, (6)58,2°C, (7)60,2°C, (8) 61,9°C, (9)63,2°C, (10)64,1°C, (11)64,8°C, (12)65°C, Controle negativo da reação 60

Figura 13. Eletroferograma da amplificação dos fragmentos C-terminal e N-terminal da glicoproteína HN 61

Figura 14. Eletroferograma da análise dos clones transformantes pela técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (II) amplificação do fragmento utilizando os oligonucleotídeos direto e reverso do inserto com 692pb, (IV) amplificação utilizando os oligonucleotídeos direto do inserto e reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen) com 841pb , (VI) amplificação utilizando os oligonucleotídeos direto do vetor pET SUMO (Invitrogen) e reverso do inserto com 946pb 61

Figura 15. Eletroferograma da análise dos clones transformantes A3 e B10 pela técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (II) amplificação do fragmento utilizando os oligonucleotídeos

direto e reverso do inserto com 1050pb, (IV) amplificação utilizando os oligonucleotídeos direto do inserto e reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen) com 1200pb 62

Figura 16. Eletroferograma da análise dos fragmentos amplificados para ligação no vetor pET SUMO. Colunas: (LM) Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), (M) 1Kb plus DNA Ladder, (1) Inserto correspondente ao fragmento N-terminal do gene da glicoproteína HN, (2) Inserto correspondente ao fragmento C-terminal do gene da glicoproteína HN 62

Figura 17. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos seqüenciados do clone F7 de *E.coli* transformado pelo vetor pET SUMO – Fragmento HN N-terminal da estirpe LaSota do, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores identidade máxima com relação às sequências do gene HN da estirpe La Sota do VDN 64

Figura 18. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos seqüenciados do clone G3 de *E.coli* transformado pelo vetor pET SUMO – Fragmento HN C-terminal da estirpe LaSota do, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores identidade máxima com relação às sequências do gene HN das estirpes La Sota e B1 do VDN 65

Figura 19: Análise por SDS Page e Western blot dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal expresso no sistema *E. coli* com o vetor pET SUMO. (A) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. Colunas: (M) marcado de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN C-terminal. (B) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. Colunas: (M) marcado de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN N-terminal. (C) Avaliação da reatividade dos fragmentos recombinantes com anticorpo monoclonal anti-histidina . .Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN C-terminal, (2) fragmento HN N-terminal. (D) Avaliação da reatividade do fragmento recombinante HN C-terminal com soro policlonal.Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) Fração bruta do lisado celular, (2) fração purificada do lisado celular solúvel. (E) Avaliação da reatividade do fragmento recombinante HN N-terminal com soro policlonal.Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) Fração bruta do lisado celular, (2) fração purificada do lisado celular solúvel.....68

Figura 20. Representação gráfica da titulação dos antígenos HN N-terminal e HN C-terminal pela técnica de ELISA, adsorvidos na microplaca nas concentrações de

80, 40, 20 e 10ug, e utilizando-se soros de referência positivo e negativo diluídos de 1:50 até 1:1600 69

Figura 21. Avaliação da correlação entre os testes de ELISA indireto utilizando os antígenos recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal produzidos no sistema *E. coli* , com os ensaios de ELISA ConcA e HI 76

Figura 22. Representação gráfica da titulação em bloco realizada com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal para avaliação da reatividade dos soros de cabra que foram inoculadas com os mesmos antígenos. O soro 01 refere-se ao controle negativo, colhido antes da primeira inoculação. O soro 2 refere-se ao material colhido após 15 dias da primeira inoculação. O soro 03 refere-se ao material colhido após 15 dias da segunda inoculação e o soro 04 após a terceira inoculação 78

Figura 23. Representação gráfica da titulação em bloco realizada com LCAi adsorvido às microplacasa para avaliação da reatividade dos soros de cabra que foram inoculadas com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal. O soro 01 refere-se material colhido após 15 dias da primeira inoculação. O soro 02 refere-se ao material colhido após 15 dias da segunda inoculação, o soro 03 após a terceira inoculação e o soro 04 após a quarta inoculação.....79

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementar
DEPC: Dimetil pirocarbonato
DN: Doença de Newcastle
DO: Densidades ópticas
ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
HA: Teste de Hemaglutinação
HI: Inibição da Hemaglutinação
ICTV: International Committee for the Taxonomy of Virus
IPIC: Índice de Patogenicidade Intracerebral
IPIV: Índice de Patogenicidade Intravenosa
LCA: Líquido Córion Alantóide
LCAi: Líquido Córion Alantóide infectado
OPD: Orto-fenileno-diamina
ON: ‘Over-night’
SPF: “Specific Pathogen Free” Livre de patógeno específico
TBE: Tampão tris-borato-EDTA
TCB: Tampão carbonato bicarbonato
TCF: Tampão citrato fosfato
TMME: Tempo Médio de morte Embrionária
PBS: Tampão Fosfato Salina
PBST: Tampão Fosfato Salina Tween a 20%
PEG: polietilenoglicol
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
APMV: Paramixovírus aviário
RNA: Ácido ribonucleico
RT: Transcriptase Reverse
VDN: Vírus da Doença de Newcastle
DN: Doença de Newcastle

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO

RESUMO – Foi realizada a clonagem e expressão do gene da glicoproteína HN da estirpe La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN), como proteína recombinante de fusão, contendo uma cauda de poli-histidina no sistema hospedeiro constituído por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que apesar de tentativas de otimização, não evidenciou a expressão da proteína recombinante. Após isso, foram produzidas as porções N-terminal e C-terminal da glicoproteína HN como proteínas recombinantes de fusão contendo uma cauda de poli-histidina e o peptídeo SUMO no sistema hospedeiro constituído pela bactéria *Escherichia coli*. Constatou-se que o sistema procarioto de expressão foi mais eficiente e permitiu a geração de dois peptídeos, que depois de devidamente caracterizados e purificados foram utilizados como antígenos para a realização de testes de imunodiagnóstico em substituição aos kits comerciais utilizados atualmente. Foram desenvolvidos dois ensaios de ELISA baseados na adsorção de um antígeno formado pela expressão da porção N-terminal da glicoproteína HN (ELISA HN N-terminal) e na porção C-terminal da mesma glicoproteína (ELISA HN C-terminal), recuperados a partir da purificação da fração solúvel de culturas de *E. coli*. O ELISA C-terminal mostrou os melhores coeficientes de correlação com o teste padrão HI e com o teste S-ELISA-ConA, além de melhores índices de sensibilidade, especificidade e acurácia. Com isso, o ELISA baseado em um antígeno da porção C-terminal da glicoproteína HN e uma única diluição do soro desenvolvido neste estudo pode ser aplicado no diagnóstico e monitoramento pós-vacinal do VDN.

Palavras-chave: clonagem, expressão, proteínas recombinantes, vírus da doença de Newcastle, hemaglutinina-neuraminidase, ELISA, imunodiagnóstico.

PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIGENS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS FOR USE IN IMMUNODIAGNOSIS

ABSTRACT – Was carried out the cloning and expression of the glycoprotein gene of the strain La Sota HN of the Newcastle disease virus (NDV), as a recombinant fusion protein containing a poly-histidine tail at the host system consisting of the yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, which despite attempts at optimizing, showed no expression of recombinant protein. After that, the portions N-terminal and C-terminal from glycoprotein HN were produced as recombinant proteins containing a fusion tail and the poly-histidine peptide SUMO at the host system consisting of *Escherichia coli*. It was noted that the prokaryotic expression system was more efficient and allowed the generation of two peptides, which once characterized and purified were used as antigens for immunodiagnostic tests replacement in the commercial kits currently used. Were developed two ELISA assays based on the adsorption of the antigen formed by expression of the N-terminal portion of the HN glycoprotein (HN ELISA N-terminal) and the C-terminal portion of the same glycoprotein (HN ELISA C-terminus), recovered from purification of the soluble fraction of cultures of *E. coli*. The C-terminal ELISA showed the best correlation coefficients with the standard HI test and ELISA test S-ConA-, and higher sensitivity, specificity and accuracy. Therefore, the ELISA of the antigen based on a C-terminal portion of the glycoprotein HN and a single serum dilution developed in this study can be applied in the diagnosis and monitoring of post-vaccination VDN.

Key-words: cloning, expression, recombinant proteins, Newcastle disease virus, ELISA, hemagglutinin-neuraminidase, ELISA, imunodiagnosis.

I. INTRODUÇÃO

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é um membro do gênero *Avulavirus* da família *Paramyxoviridae*. É envelopado e apresenta nucleocapsídeo helicoidal composto de ácido nucléico, proteína de nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P) e polimerase (L). Seu genoma é composto por uma única fita de RNA de polaridade negativa e aproximadamente 15kb de comprimento.

Esse vírus é o agente etiológico da Doença de Newcastle (DN) que acomete diversas espécies de aves e causa grandes perdas econômicas na indústria avícola. É uma doença altamente contagiosa e caracteriza-se por uma infecção respiratória, neurológica ou entérica.

O envelope dos vírions contém as glicoproteínas hemaglutinina-neuraminidase (HN) e fusão (F), além de uma proteína de matriz não-glicosilada (M). As glicoproteínas HN e F são importantes para a infectividade viral e patogenicidade, e ambas podem induzir imunidade protetora.

A glicoproteína HN é responsável pela adsorção do vírus a receptores contendo ácido siálico e também possui atividade de neuraminidase. Esta proteína encontra-se ancorada à membrana viral pela extremidade hidrofóbica N-terminal e é o principal alvo antigênico da resposta imune do hospedeiro. Após a adsorção inicial mediada pela HN, a glicoproteína F interage com a membrana plasmática causando fusão entre o envelope viral e a membrana, que resulta na subsequente penetração e internalização do nucleocapsídeo viral.

A aplicação de meios rápidos para o diagnóstico da DN é de enorme importância, juntamente com a utilização de técnicas objetivando a determinação do estado imune após a administração de vacinas, a fim de se conseguir uma condição mais efetiva de controle dos surtos da infecção pelo VDN, tanto nas criações de galinhas de postura, como de frangos de corte.

Anticorpos específicos anti-VDN têm sido detectados pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), que é considerado o teste padrão para diagnóstico

sorológico da DN. Contudo, o HI tem valor limitado para detecção de anticorpos devido a sua baixa sensibilidade e reatividade cruzada de subtipos do VDN.

Nesse contexto, os ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA), desde que executados com padrões apropriados, podem se constituir em indicadores bastante acurados dos níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou imunizadas com o VDN, facilitando, dessa forma, o monitoramento do estado imune em granjas onde está sendo criado um número cada vez maior de aves.

No momento, preparações de partículas virais purificadas são rotineiramente usadas como antígeno para adsorção à fase sólida dos testes imunoenzimáticos, particularmente, nos kits comerciais de ELISA, que estão disponíveis para a detecção e mensuração de anticorpos contra o VDN. A purificação do VDN exige, por sua vez, que o vírus seja propagado em grande escala e, nesse caso é necessária a utilização de um grande número de ovos embrionados livres de patógenos específicos ("Specific Pathogen Free" - SPF). Além disso, os procedimentos de purificação são complexos, demorados e onerosos e, muitas vezes, com baixo rendimento.

Na tentativa de desenvolvimento e padronização de um teste ELISA eficaz para diagnóstico da doença de Newcastle, em diversas espécies, várias metodologias têm sido empreendidas, incluindo a produção de antígenos recombinantes. Tal procedimento pode resultar em um teste adequado e seguro para avaliação de um grande número de amostras de soros, pois envolve antígenos imuno-dominantes e não contém moléculas inespecíficas presentes nas preparações de propagação viral.

Nesse contexto, verifica-se que vários métodos de ELISA foram desenvolvidos usando proteínas recombinantes do VDN, como a nucleoproteína e a HN, produzidas, principalmente em sistemas eucariotos de expressão, com o baculovírus.

As bactérias, particularmente a *Escherichia coli*, estão certamente entre os sistemas mais comumente empregados na produção de proteínas recombinantes

heterólogas, sendo atualmente utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico. O fato de estas bactérias terem sido intensamente utilizadas como modelo para estudos da genética de procariotos, fez com que sua biologia molecular já esteja bem estabelecida, sendo de fácil manipulação e multiplicação rápida em meios relativamente simples.

Embora a *E. coli* tenha sido usada para a expressão da forma recombinante da HN, essa proteína foi destinada para estudos de antigenicidade visando a preparação de vacinas contra o VDN. Há apenas um estudo versando sobre a aplicação da HN recombinante produzida em *E. coli* como antígeno de fase sólida no ELISA, que não obstante tenha proporcionado resultados promissores, revelou também que há pontos a serem ainda aprimorados.

Contudo, devido à falta dos processamentos pós-traducionais em procariotos, proteínas expressas em sistemas eucarióticos são frequentemente utilizadas para diversas aplicações. As leveduras da espécie de *Sacharomyces cerevisiae* vêm ganhando cada vez mais popularidade como organismo hospedeiro, sendo utilizadas para a produção de uma variedade de proteínas heterólogas. A produção em larga escala e o processamento de derivados de levedura são procedimentos já bem estabelecidos e podem ser facilmente adaptados para produção de proteínas heterólogas.

Visando o aprimoramento do diagnóstico da doença de Newcastle e eficiente monitoramento da presença do vírus em aves no Brasil, o presente estudo teve por objetivo a produção de antígenos recombinantes a partir do gene da glicoproteína HN em sistemas procarioto (*E. coli*) e eucarioto (*S. cerevisiae*), de forma que as proteínas recombinantes obtidas, depois de devidamente caracterizadas, pudessem ser utilizadas como antígenos para a realização de testes de imuno-diagnóstico em substituição aos kits comerciais utilizados atualmente

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Doença de Newcastle: aspectos gerais

A doença de Newcastle (DN), também conhecida como pseudo-pestes aviária, pneumoencefalite aviária ou desordem neuro-respiratória, faz parte das enfermidades emergenciais listadas no Código Zoosanitário Internacional da Organização Mundial de Saúde Animal- OIE. É considerada em todo o mundo, uma das mais importantes doenças virais em aves não só devido a sua alta mortalidade e gravidade, mas também por causa do grande impacto econômico que resulta na obrigatoriedade de notificação aos órgãos competentes, impondo restrições e embargos comerciais às áreas e países onde os surtos ocorrem com sérias consequências sócio-econômicas e/ou de saúde pública (OIE, 2008; BRASIL, 2007).

O primeiro surto da DN no mundo foi relatado em 1926, na Ilha de Java, na Indonésia e também no mesmo ano em Newcastle, na Inglaterra (ALEXANDER, 1997, SEAL et al., 2000). No Brasil, o primeiro surto da DN ocorreu também simultaneamente em duas regiões distintas, em Belém do Pará e em Macapá, por volta de 1953 (SANTOS et al., 1954), sendo que o isolamento viral foi realizado por CUNHA & SILVA em 1955. A entrada do VDN no país foi atribuída à importação de carcaças de aves contaminadas procedentes dos EUA para hotéis da capital paraense (CUNHA & SILVA, 1955).

A DN causa uma variedade de sintomas que vão desde uma doença subclínica, problemas respiratórios leves e diminuição da produção de ovos, até uma infecção respiratória aguda (tosse, espirro e estertores) frequentemente seguida por manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça (ALDOUS & ALEXANDER, 2001). Mortalidades com estirpes patogênicas podem rapidamente exceder 90% em galinhas e perus, porém em aves silvestres, como perdiz, codorna, avestruz, psitacídeos e aves domésticas como patos, marrecos e

gansos, a infecção pode não apresentar nenhuma sintomatologia (ALEXANDER, 2009).

Em um estudo sobre a prevalência do VDN em frangos de corte no Brasil, ORSI et al. (2010) demonstraram a presença de vírus circulante, de estirpes não virulentas, em regiões do país onde não há vacinação. A soropositividade e o isolamento do vírus nos estados onde não é feita a vacinação contra a DN pode ser explicada pelo alto número de pássaros que se concentram em algumas regiões e à possível proximidade entre criação de diferentes tipos de aves ou até mesmo por falhas no manejo sanitário nas granjas.

2.2 O agente etiológico da Doença de Newcastle

A definição mais recente da DN é uma infecção causada pelo sorotipo 1 do *Paramyxovirus* aviário (APMV-1) que apresente Índice de Patogenicidade intracerebral (IPIC) em aves jovens, da espécie *Gallus gallus*, livres de patógenos específicos (SPF: “Specific Pathogen Free”) de um dia de idade, maior que 0,7. Alternativamente ao IPIC considera-se como agente etiológico da DN o APMV-1 que pode-se demonstrar através de sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, uma sequência codificadora de aminoácidos básicos na posição carboxi-terminal da proteína F2, sendo fenilalanina na posição 117 da extremidade amino-terminal da proteína F1. Nesse caso, o termo “múltiplos aminoácidos básicos” usado para caracterizar a proteína F das estirpes mais virulentas do VDN, refere-se aos três últimos resíduos de arginina ou lisina entre as posições 113 e 116 dessa mesma proteína (ALEXANDER, 2003).

O vírus da doença de Newcastle (VDN) pertence à Ordem *Mononegavirales*, à Família *Paramyxoviridae* que é subdividida em duas subfamílias: *Pneumovirinae*, composta de um único gênero, o *Pneumovirus*, incluindo os pneumovirus aviários; e a subfamília *Paramyxovirinae*, na qual estão incluídos três gêneros, dentre eles o *Avulavirus*, tendo o vírus da Doença de Newcastle - *Paramyxovirus* Aviário Tipo 1 (APMV1 – “Avian Paramyxovirus Type

1”). Ainda no gênero *Avulavirus* existem outros sorotipos, Paramyxovirus Aviários Tipo 2 ao 9. Além destes existem ainda estirpes denominadas Paramyxovirus Tipo 1 provenientes de pombos (PPMV-1 – “Pigeon Paramyxovirus Type 1”). Essas estirpes são variantes do APMV-1 que após sucessivas passagens em outras espécies de aves, sofreram um mecanismo de adaptação aos pombos, tornando-se não-patogênicas a essa espécie (ALEXANDER, 2009) (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV, 2010).

Os virions do VDN são envelopados, pleomórficos, muitas vezes esféricos e se apresentam com um diâmetro entre 100 a 500 nanômetros. Seu genoma é composto por RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa e contendo cerca de 15,2 kilobases (ALEXANDER, 2003; ARNS et al., 2007; SAMSON, 1988).

O genoma deste vírus codifica seis proteínas estruturais importantes (Figura 1): a proteína de nucleocapsídeo (NP), a fosfoproteína (P) e a grande proteína (L), que são associadas ao nucleocapsídeo; a glicoproteína de fusão (F), que se constitui nas menores projeções na superfície das partículas virais; a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN), responsável pela atividade da hemaglutinina e neuraminidase, sendo que estas últimas formam os dois tipos de projeções vistas na superfície das partículas virais; e a proteína de matriz (M) (YUSOFF & TAN, 2001).

As proteínas estruturais de envelope, a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a glicoproteína F têm papéis importantes na relação com o hospedeiro, pois conferem a função de adesão e fusão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro.

A glicoproteína HN é responsável pela adsorção do vírus a receptores contendo ácido siálico e também possui atividade de neuraminidase (MIRZA et al., 1994). Esta proteína encontra-se ancorada à membrana viral pela extremidade hidrofóbica N-terminal e é o principal alvo antigênico da resposta imune do hospedeiro (IORIO et al., 1991). Sua estrutura tridimensional ainda não está bem elucidada, mas usando anticorpos monoclonais (MAbs) foram identificados quatro

sítios antigênicos distintos que parecem estar associados com regiões conservadas e imunodominantes da proteína HN nas posições 193-201, 345-353, 513-521 e 494-569 (NAGY et al., 1990; NISHIKAWA et al., 1986). A região entre os resíduos 345 a 353 constitui o único epítipo linear da proteína, sendo os demais dependentes de modificações pós-traducionais (ALAMARES et al., 2005). Outro achado relevante é que os epítopos que induzem anticorpos neutralizantes são exclusivamente localizados no domínio globular, a partir do resíduo 47 (PEETERS et al., 2001).

A glicoproteína F é sintetizada em uma forma precursora, a F0, e só tem capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídios, F1 e F2. Entretanto, além da clivagem de F0, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEuw & PEETERS, 1999; MERZ et al., 1981). A proteína HN é a responsável pela promoção do mecanismo de fusão mediado pela proteína F, o qual possibilita a penetração do vírus. A demonstração dessa dependência confirmou a hipótese de que a virulência do vírus da Newcastle é multigênica (HUANG et al., 2004).

A proteína de nucleocapsídeo (NP) é uma das mais importantes proteínas do VDN. Essa proteína mantém uma relação estreita com o genoma viral durante a replicação do vírus, através da síntese de nucleocapsídeo RNase resistente, proporcionando proteção às novas partículas virais sintetizadas em ação conjunta com as proteínas P e L. Quanto a proteína de matriz (M), ela está presente em maior quantidade no interior do vírus, com a função de organizar a morfogênese do virion (KHO, 2001).

A replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira e a transcrição ocorre por meio da atuação da enzima transcriptase, que produzirá moléculas com capacidade de atuar com o RNA mensageiro e utilizar mecanismos da própria célula parasitada para tradução das proteínas virais as quais serão transportadas até a membrana plasmática celular, que se modificará devido ao pareamento com o nucleocapsídeo, culminando assim na liberação de novos virions (PEEPLES, 1988).

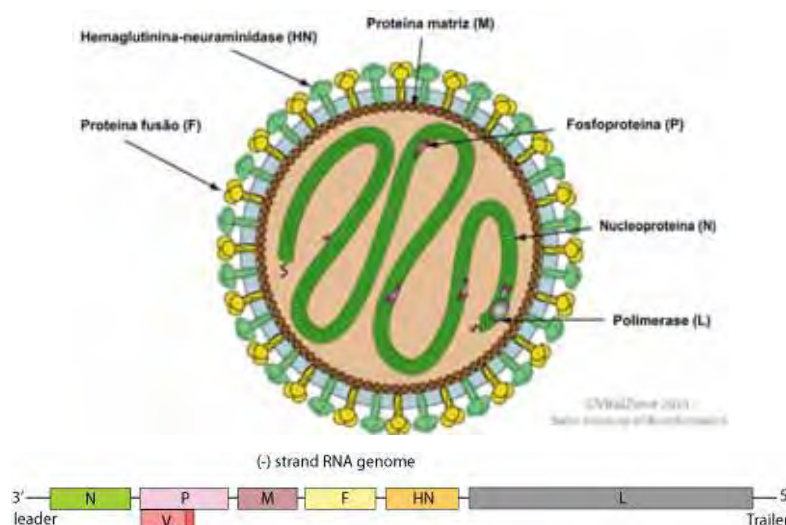


Figura 1. Esquema do genoma do Vírus da Doença de Newcastle e organização estrutural das proteínas. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina e neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html

Ainda no que diz respeito à replicação do VDN, DOMINGO (2002) demonstrou que devido à baixa fidelidade da enzima polimerase (transcriptase), há certamente a possibilidade de formação de novos genomas e novos virions, relacionados, porém distintos, caracterizando o que se denomina *quasispecies*. O conjunto de múltiplos genomas gerados na condição de *quasispecies* está relacionado com a sobrevivência e a evolução dos RNA vírus, caracterizada pela concomitância da ocorrência de mutações e maior adaptabilidade viral às pressões seletivas, especialmente do sistema imune do hospedeiro, gerando assim variação no genoma viral, por mutação espontânea ou por mecanismo de fuga da resposta imune (PERALES et al. , 2005; SNOECK, 2008).

HANSON & BRANDLY (1955), inicialmente, classificaram as estirpes do VDN, em função do tempo médio de morte embrionária dos embriões inoculados com essas estirpes, como lentogênicas, mesogênicas e velogênicas. Atualmente, as amostras do VDN têm sido agrupadas por meio de fatores como virulência e manifestação clínica da doença, em cinco patótipos: velogênico viscerotrópico,

velogênico neurotrópico, mesogênico, lentogênico ou vacinal, e entérico assintomático (BEARD & HANSON, 1984).

Assim, estirpes virais lentogênicas ou vacinais são de baixa virulência e causam infecções respiratórias ou entéricas brandas; as entéricas assintomáticas consistem de estirpes que causam infecção entérica subclínica, enquanto que estirpes de virulência intermediária causam primariamente doença de sinais respiratórios e, ocasionalmente, sintomatologia nervosa, mas com baixa mortalidade, sendo classificadas como mesogênicas. As estirpes virulentas, por sua vez, provocam alta mortalidade e são classificadas como velogênicas, sendo ainda divididas em neurotrópicas e viscerotrópicas, com base nas manifestações clínicas e patológicas que induzem nas aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2008).

A classificação desses patotipos raramente é observada no campo, uma vez que essas descrições referem-se ao que é observado em aves SPF inoculadas com os respectivos patotipos. Ainda no campo, sinais clínicos observados em aves infectadas com estirpes lentogênicas podem ser confundidos com infecções por outros micro-organismos ou quando condições ambientais adversas estão presentes (ALEXANDER, 2009).

Na verdade, foi relatado que os sinais clínicos em aves infectadas com o VDN variam amplamente e são dependentes de fatores, tais como patotipo viral, espécie hospedeira, idade das aves, infecções intercorrentes com outros micro-organismos, estresse ambiental e competência imunológica do hospedeiro (BACK, 2004). Em algumas circunstâncias, infecções com vírus extremamente virulento em frangos podem possuir uma morbidade próxima de 100% e resultar em alta mortalidade, de até 90%, em aves sensíveis (BEARD, 2008). Ainda que os sinais clínicos não sejam considerados patognomônicos da DN, os sinais nervosos e/ou entéricos podem estar associados a estirpes velogênicas (BEARD & HANSON, 1984).

Caso a DN não seja endêmica em uma determinada área, os sinais clínicos e as lesões podem ser altamente significativos (ALEXANDER et al., 2004). Os sinais clínicos típicos são: estado de prostração e depressão com penas eriçadas,

diarréia branco-esverdeada, e nas sobreviventes, a cabeça girada para um lado (torcicolo), paralisia dos membros pélvicos e/ou torácicos ou outros sinais neurológicos. Outras características típicas da doença incluem rápida propagação, morte em período de dois a três dias, mortalidade superior a 50%, e um período de incubação de dois a cinco dias, ou, em ocasiões raras, de dois a 15 dias. Na necropsia, os achados mais comuns são muco na traquéia, hemorragias no intestino e no proventrículo (BEARD & HANSON, 1984; NISHIZAWA, 2007).

Deve-se destacar que a maioria dos sinais clínicos descritos para a doença de Newcastle são muito parecidos ou até idênticos a outras enfermidades infecciosas, como bronquite infecciosa, laringotraqueíte, coriza infecciosa, doença crônica respiratória, dentre outras que causam, principalmente, sintomas digestivos e respiratórios, indistinguíveis da Doença de Newcastle. Portanto, sinais clínicos isolados não apresentam uma base confiável para o diagnóstico da doença (JORGE et al, 2002; ALEXANDER, 2009).

A infecção de algumas espécies de aves silvestres com estirpes mais virulentas do VDN pode não mostrar qualquer sinal clínico, porém essa espécie animal pode difundir o VDN para plantéis susceptíveis (SICK, 2001). A cura da DN, que é rara nas aves que sofreram distúrbios neurológicos graves, é acompanhada por sequelas, como crescimento retardado, queda de postura, ou ainda, com alterações nos ovos e baixa de eclodibilidade (CORREA, 1970).

O período de incubação do VDN pode ser de até 15 dias pós-infecção, entretanto a média é de cinco dias. Em galinhas susceptíveis, o surto pode ser extremamente severo e, nesse caso, 100% das aves afetadas podem morrer em até 72 horas sem apresentar qualquer sinal clínico. Pombos podem apresentar mortalidade de até 80%, enquanto que canários geralmente apresentam doença branda com baixa mortalidade. A perdiz não apresenta sinais clínicos, nem mortalidade, quando infectada experimentalmente com vírus patogênico. Entretanto, esta espécie, quando infectada experimentalmente, foi capaz de difundir o VDN para galinhas SPF. Psitacídeos podem desenvolver uma infecção

crônica renal com potencial de eliminação de partículas virais por longo período (SICK, 2001; ALEXANDER, 2009).

O aparecimento da doença em uma criação, geralmente, é verificado após cinco dias, em média, a partir da introdução do vírus. A mortalidade entre pintos vai de 10% a 50% nos casos crônicos e a quase 100% nos casos de infecção com estirpes de virulência alta (MALAVAZZI, 1999).

2.3 Hospedeiros do Vírus da Doença de Newcastle

A doença ataca com maior frequência os galináceos de todas as idades e particularmente galinhas e perus, de preferência nos meses frios. A susceptibilidade diminui na proporção em que as aves ficam mais idosas. Os palmípedes (pato, ganso) e o pombo são pouco susceptíveis. O VDN pode atacar outras aves, como o cisne, o pardal, a perdiz, a codorna, o corvo, a pomba-rôla, a coruja, o mergulhão, o faisão, a avestruz e outras aves. Convém lembrar que poucas espécies de aves seriam refratárias a uma infecção maciça com o VDN (CORREA, 1970). Conforme PAULILLO & DORETTO JÚNIOR (2000), o VDN é capaz de infectar, experimentalmente ou naturalmente, mais de 241 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens de aves existentes.

O VDN tem sido declarado como agente infectante em várias espécies animais. Além das aves, o vírus pode infectar espécies de répteis (principalmente serpentes), e mamíferos (CORREA, 1970; PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2009). O ser humano é sensível, e a infecção se manifesta em forma de conjuntivite. Há, entretanto, casos de infecções generalizadas nas quais os sintomas possam ser dor de cabeça, mal-estar e calafrios (CORREA, 1970).

2.4 Epidemiologia da Doença de Newcastle

A DN é considerada uma doença de distribuição mundial, com áreas endêmicas e áreas consideradas livres da doença. O VDN possui a capacidade de

se difundir por todo o mundo por meio de aves susceptíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores, insetos e artrópodes, que transitam entre as aves infectadas e as não infectadas susceptíveis (LANCASTER, 1964; LANCASTER & ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER, 1997). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excreta grande quantidade de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN entre as aves (NISHIZAWA et al., 2007).

No final do ano de 1960, uma panzootia de DN atingiu vários países no Oriente Médio, provavelmente devido ao intenso comércio de espécies de psitacídeos oriundos principalmente da América do Sul, da América Central e do Sudeste da Ásia, transportados por aviões, e atingiu todos os continentes e muitos países até o ano de 1973. Uma terceira panzootia emergiu inicialmente do Oriente Médio, em 1970, onde a principal forma de difusão deu-se através da exposição, competição e comercialização de pombos e a sua presença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, do Canadá, dos EUA, de Hong Kong e do Sudão. Em alguns países, a doença acometeu outras aves silvestres, inclusive a avicultura comercial sob a forma de doença neurotrópica (McNULTY et al., 1988).

Na Inglaterra, em 1984, uma amostra viral isolada de pombos foi responsável por vinte surtos da doença em frangos de corte, como resultado da ingestão de ração contaminada com VDN, o mesmo também ocorreu com um lote de faisões (ALEXANDER, 1988; ALEXANDER et al., 1984).

As aves silvestres são consideradas reservatório natural de estirpes do VDN, com capacidade de causar a doença e podem estar envolvidas nos surtos que ocorrem em aves domésticas (CAMENISCH et al., 2008). A alta densidade populacional e a localização de plantéis em áreas de concentração de aves silvestres ou ainda, próximo a rotas de aves migratórias ou mesmo o tráfico de animais silvestres têm sido responsáveis pelo aumento significativo da DN (VERNOERD, 2000; SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

No Brasil, há registros de detecção de anticorpos específicos e de isolamento do VDN em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro e de Pernambuco, sendo que essas espécies de aves foram consideradas reservatórios desse vírus para as aves de produção comercial (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2006). Além disso, em outro estudo no município de Galinhos, estado do Rio Grande do Norte, foi detectada a presença de estirpes do VDN de baixa patogenicidade em suabes cloacais de aves migratórias (ARAÚJO et al., 2010).

As principais vias de transmissão do VDN em criações de aves domésticas ocorrem por aerossóis provenientes de aves infectadas diretamente ou indiretamente através do contato com produtos contaminados por esses aerossóis. Quanto à infecção de seres humanos pelo VDN a transmissão ocorre a partir do contato com aves infectadas.

No Brasil não há relatos de infecção pelo VDN em humanos, porém trabalhos relatam que vírus vacinais ou de campo podem infectar o homem e manifestar sinais clínicos como: cefaléia, lacrimejamento, edema de pálpebra e consequentemente conjuntivite (HERNÁNDEZ, 1987; BEARD E HANSON, 1984),

O VDN é capaz de sobreviver no meio ambiente, água e matéria orgânica, dependendo das condições de temperatura e umidade, por um longo período de tempo e quase indefinidamente em materiais congelados. As vias de eliminação do vírus se dão através de secreções exsudativas do trato respiratório e das fezes (ALEXANDER, 2003).

A transmissão do vírus através dos ovos causa a morte embrionária, e poucos são os embriões infectados que alcançam a eclosão. Entretanto, esses poucos pintos que saem dos incubatórios constituem um importante fator na disseminação da doença (CORREA, 1970).

Os sítios naturais de infecção são essencialmente o aparelho respiratório e o tubo digestório; contudo, as mucosas conjuntival e cloacal também funcionam como vias de infecção (ALEXANDER, 2003).

2.5. Medidas de controle da Doença de Newcastle

2.5.1 Vacinação

Aliada às medidas de biosseguridade que as granjas devem possuir, a vacinação é o instrumento mais eficiente no controle e prevenção da DN (ALEXANDER, 2009). Usualmente, para aves de corte, recomenda-se uma vacinação na água de beber aos 10 a 12 dias e uma revacinação aos 30 a 35 dias de idade. Já no caso das galinhas poedeiras, além destas duas vacinações citadas, há necessidade de que se vacinem aos 90 ou 120 dias, através da via intramuscular profunda, no peito (MALAVAZZI, 1999).

No Brasil, os esforços para a profilaxia da DN estavam orientados para a imunização ativa, mediante o emprego convencional de vacinas vivas de caráter lentogênico, sendo empregadas, sobretudo as estirpes B1 e LaSota. No entanto, algumas estirpes vacinais não são indicadas para aves de um dia. Outras não são apropriadas para serem administradas pela via spray. Alternativamente, para a primeira vacinação, as estirpes B1, Ulster ou VG-GA, que são mais atenuadas podem ser utilizadas. Por outro lado, a estirpe LaSota, por ser menos atenuada, deve ser utilizada para a segunda vacinação (JORGE et al., 2002; NUNES et al., 2002).

No geral, o calendário vacinal deve ser regulamentado e planejado pelo plano nacional de defesa sanitária de cada país. A avaliação de fatores como a presença da imunidade passiva; estado imune; via de aplicação; estado nutricional; tamanho dos lotes; presença ou não de outros agentes patogênicos; condições de instalação e clima; histórico e custo da vacina são inevitáveis para o desenvolvimento do programa vacinal (ALEXANDER, 2009).

2.5.2 Monitoramento sorológico

Em áreas onde não se utilizam programas de vacinação, e/ou, em área onde a DN está erradicada, os testes sorológicos podem ser utilizados como meio de diagnóstico e prevenção. Porém, os resultados positivos podem não indicar a doença, mas sim, infecção com o vírus (THAYER, 1986).

A redução gradual na ocorrência da enfermidade é devido a controles intensivos na criação comercial, por meio de programas de vacinação eficientes e além dos esforços do governo federal, através do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Entretanto, a DN continua endêmica no Brasil, bem como no restante da América do Sul (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

A avaliação da resposta imune humoral é considerada um dos fatores mais importantes para monitoramento de programas vacinais da DN. BRETANO et al., (2000) afirmaram que o levantamento sorológico é de extrema importância na avaliação das condições sanitárias de plantéis, definindo a eficácia de programas de vacinação e a real situação do vírus no ambiente.

O Departamento de Saúde Animal (DSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem desenvolvido ações para evitar o ingresso da doença no Brasil. O MAPA realiza vigilância sanitária sobre o material genético no ponto de ingresso (portos, aeroportos e fronteiras), bem como controle de importação de aves destinadas a reposição genética e vigilância ativa para influenza aviária e DN, em aves migratórias, plantéis avícolas comerciais e de subsistência (BRASIL, 2007).

A vacinação e melhoria das condições zootécnicas, para criadores de aves caipiras, o isolamento sanitário de criações industriais das aves de vida livre e a vigilância sorológica constante poderiam contribuir para redução do problema (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2005).

2.6. Diagnóstico Laboratorial

A DN, segundo a OIE, é uma doença de notificação compulsória. O laboratório de referência para diagnóstico do VDN é o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), que é uma unidade do MAPA localizada em Campinas, São Paulo. A confirmação deve ser feita pelo isolamento e identificação do agente viral e através de testes de patogenicidade como: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) e o Tempo Médio de Morte Embrionária (TMME) (BRASIL, 2007). Reações sorológicas positivas servem para fazer o imunodiagnóstico e ainda detectam casos subclínicos da infecção pelo VDN (THAYER, 1986).

Os sinais clínicos e as lesões causadas pela infecção não são caracterizados como patognomônicos para a DN, só o diagnóstico laboratorial é confirmatório. O isolamento e identificação viral são considerados o método de diagnóstico definitivo (ALEXANDER, 2003).

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, através da inoculação da amostra na cavidade córion-alantóide. Após 48 horas, ou após a morte dos embriões, o líquido córion-alantóide é colhido e analisado pelo teste de hemaglutinação (HA). Com resultado positivo prossegue-se com o teste de inibição da hemaglutinação (HI), que fornecendo um resultado positivo leva à realização da técnica de neutralização viral e teste de caracterização de patogenicidade, através de inoculação em ovos embrionados e aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2008).

Outro meio de diagnóstico é a detecção e identificação do VDN por técnicas moleculares. Nesse sentido, ensaios para a detecção do genoma do VDN têm sido descritos na literatura como a hibridização de ácidos nucleicos e análise de RNA genômico viral. Podem ser empregados vários tipos de RT-PCR, tais como a PCR convencional e a PCR em tempo real, que podem ser seguidas por análises como RFLP e sequenciamento (GOHM et al., 2000; ALDOUS et al., 2000; KANT et al., 1997; PHAM et al., 2004; PHAM et al., 2005, YUSOFF & TAN, 2001).

As técnicas moleculares de diagnóstico têm despontado como uma alternativa interessante em comparação à metodologia convencional de caracterização viral, oferecendo vantagens em relação ao tempo de execução e ao custo (VIANNA et al., 2000). No manual da OIE a partir de 2000 a técnica de PCR passou a ser aceita e considerada padrão para diagnóstico da DN, através da avaliação da sequência de nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F do VDN (CREELAN et al., 2002).

Uma ampla variedade de testes sorológicos foi desenvolvida para detectar anticorpos contra o VDN, entre eles a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa e HI (ALEXANDER & MANVELL, 2002) e mais recentemente os ensaios imunoenzimático em fase sólida (ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (RICHTZENHAIN et al., 1993; CZIFRA et al., 1996; SOUSA et al., 1999; SILVA et al., 2009).

O teste de HI, entretanto, é tradicionalmente utilizado como prova padrão na detecção de anticorpos contra o VDN em aves (SOUSA et al., 1999). No entanto, o teste de HI tem valor limitado para detecção de anticorpos devido a sua baixa sensibilidade e reatividade cruzada de subtipos (THAYER, 1986; ROWE et al., 1999; PEIRIS et al., 2007; PRABAKARAM et al., 2009). Pesquisadores mostraram que o teste HI pode ter a sensibilidade aumentada com o uso da subunidade HN ao invés do vírus inteiro (ROWE et al., 1999).

Além disso, o ELISA, através do método indireto, tem sido muito usado no lugar do teste de HI, para o monitoramento e estudos de soroprevalência da DN, principalmente devido a possibilidade de processamento de um grande número de amostras de soro (RICHTZENHAIN et al., 1993; SOUSA et al., 1999; YUSOFF & TAN, 2001; SILVA et al., 2009). O ELISA é ainda o teste sorológico mais utilizado na avicultura para outros agentes etiológicos por sua maior sensibilidade, especificidade, rapidez e maior facilidade de padronização (THAYER, 1986).

Nesse sentido, verifica-se que ensaios de ELISA com base no método indireto têm sido rotineiramente usados para a detecção de anticorpos contra o

VDN. No entanto, nesse método, as microplacas de ELISA são adsorvidas com os antígenos virais purificados ou semi-purificados, os quais requerem a propagação desses agentes em sistemas convencionais tais como ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) ou em culturas celulares, em grandes volumes, adicionado, ainda, da necessidade de serem usados processos bastante complexos de purificação viral por técnicas de ultra-centrifugação em gradiente de sacarose (WILSON et al., 1984; RIVETZ et al., 1985; MIERS et al., 1994). Tudo isso, resulta em processos complexos e onerosos para a preparação das microplacas de ELISA.

Muitos são os estudos visando melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico da DN. As técnicas de clonagem e expressão de proteínas recombinantes permitem caracterizar e produzir antígenos em larga escala, buscando o desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos e ainda possibilitando a produção de vacinas.

2.7 Produção de proteínas recombinantes

A expressão de proteínas recombinantes em células onde elas não ocorram naturalmente é denominada produção heteróloga. Atualmente uma gama de sistemas heterólogos estão disponíveis como bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células eucarióticas de mamíferos, aves e de insetos, transfectadas com vetores virais (WALSH, 1998). A escolha do bio processo para síntese e purificação de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de fatores, como as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, da finalidade de sua obtenção, e da viabilidade econômica do método.

A expressão de proteínas recombinantes através do sistema baculovírus – células de insetos, têm sido amplamente utilizada sendo mais recomendada para ser empregada na obtenção de grandes quantidades de proteínas em células eucarióticas. Esse sistema se caracteriza também por oferecer diversas vantagens

em relação à expressão de proteínas em células procariotas. Um aspecto relevante, nesse caso é que as proteínas expressas em células de inseto possuem atividade biológica e reatividade imunológica muito similares às proteínas expressas em células de mamíferos ou aves, com a vantagem adicional de ser produzida em quantidades muito superiores e com custos significativamente menores. No entanto, este sistema requer o cultivo '*in vitro*' de células de inseto, sendo mais exposto à contaminação bacteriana e fungica e o sucesso pode depender de eventos sob os quais não se tem muito controle como a transfecção e a recombinação do vetor e do DNA do baculovírus (HOCHULI, 1992).

As bactérias, particularmente a *E.coli*, estão certamente entre os sistemas mais comumente empregados na produção de proteínas recombinantes heterológicas, sendo atualmente utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como a insulina, hormônio do crescimento humano, entre outros, obtendo altos níveis de expressão (WALSH, 1998). O fato de estas bactérias terem sido intensamente utilizadas como modelo para estudos da genética de procariotos, fez com que sua biologia molecular já esteja bem estabelecida, sendo de fácil manipulação, rápido crescimento e de exigências nutricionais relativamente simples.

Essa bactéria possui, entretanto, algumas desvantagens como sistema recombinante, particularmente a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação, fazendo com que as proteínas recombinantes acumulem-se no citoplasma, ou formem agregados insolúveis (corpos de inclusão), devido a sobrecarga dos mecanismos celulares normais de processamento de proteínas, ocasionando a formação de interações inter-moleculares (WEICKERT, et.al., 1996).

Ainda nesse sentido, o vetor Champion™ pET SUMO "Protein Expression System" (Invitrogen) permite a clonagem e expressão da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada ao peptídeo SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade destas. Além disso, a estrutura terciária do

peptídeo SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease, permitindo sua remoção e obtenção da proteína recombinante na forma nativa. Quando essa partícula está fusionada à porção N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na liberação da proteína.

Porém, quando o interesse é a produção de proteínas de organismos eucariotos, as leveduras destacam-se como hospedeiras alternativas, por serem unicelulares, deterem as vantagens do sistema bacteriano no que diz respeito à facilidade de manipulação e cultivo em escala industrial, além de serem capazes de realizar modificações pós-traducionais adequadas a várias proteínas. As leveduras da espécie de *Saccharomyces cerevisiae* vêm ganhando cada vez mais popularidade como organismo hospedeiro, sendo utilizadas para a produção de uma variedade de proteínas heterólogas. Essas células oferecem um conjunto considerável de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão gênica. Uma das vantagens que se destaca, é que esses microorganismos não produzem endotoxinas (lipossacarídeos-LPS), sendo, portanto, reconhecidos como muitos seguros para produção de alimentos, medicamentos ou imunobiológicos. A produção em larga escala e o processamento de derivados de levedura são procedimentos já bem estabelecidos e podem ser facilmente adaptados para produção de proteínas heterológicas (CHEN et al., 2003).

Muitas proteínas biologicamente importantes são naturalmente secretadas e podem adotar a sua conformação tridimensionalmente correta dentro da via secretora intracelular das leveduras (ROMANOS et al., 1992). Assim como ocorre nos eucariotos superiores, a secreção de proteínas em leveduras é dirigida por uma sequência aminoterminal que faz a translocação co-transducional no retículo endoplasmático (RE). Esta sequência denominada de peptídeo sinal é removida por uma peptidase sinal. No lúmen do RE, grupos aspargina-glicosil ligadas podem ser adicionadas a molécula protéica. O sinal para adição desses açúcares N-Ligados é o mesmo para glicoproteínas de leveduras e de animais, facilitando o

trânsito dessas proteínas pelas vesículas do RE em direção ao complexo de Golgi onde ocorrem modificações nas estruturas moleculares glicosiladas.

Vários são os estudos que relatam o sucesso da produção de proteínas heterólogas em leveduras, tanto os que fazem uso de seqüências sinais próprias da proteína recombinante, ou seja, seqüências sinal heterólogas, como as seqüências sinal da própria levedura, isto é, seqüências sinal homólogas. Há um número elevado de pesquisadores que tem empregado com sucesso, leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Picchia* para fazer a expressão de uma gama de diferentes antígenos virais como aqueles derivados de HIV, papilomavírus, hepatite B, vírus da influenza, vírus da raiva, vírus da língua azul, vírus da leucose bovina. A *S. cerevisiae* já foi usada com sucesso para a produção de VP2 proveniente do vírus da doença de Gumboro (AZAD et al., 1991) e mais recentemente para o vírus da bronquite infecciosa com a proteína N e para fragmento peptídico S1 (GIBERTONI, 2005).

2.8 Aplicação das proteínas recombinantes para diagnóstico da DN

Com relação à nucleoproteína recombinante do VDN como antígeno para aplicação no imunodiagnóstico, constata-se que existem várias abordagens que já foram exploradas, quer seja com o uso de sistemas de hospedeiros procariotos, como a *E. coli* (KHO et al., 2001), ou eucariotos, em culturas de células transfectadas com vetores constituídos por baculovírus (ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1998). No entanto para a proteína N do VDN, embora a *E. coli* tenha sido usada para a expressão da forma recombinante dessa proteína, ela foi somente usada para estudos estruturais dessa proteína, não tendo sido empregada como preparação antigênica de testes sorológicos. Ainda, com respeito à utilização de proteínas de nucleocapsídeo (proteínas N), sabe-se também que várias preparações recombinantes desse tipo de antígeno estrutural derivadas do vírus da caxumba, vírus da raiva, vírus da estomatite vesicular, vírus da bronquite infecciosa e do próprio VDN, já foram usadas de forma bem sucedida

para serem adsorvidas à superfície das cavidades de microplacas em diferentes ensaios imunoenzimáticos (LINDE et al., 1987; REID-SANDEN et al., 1990; HUMMEL et al., 1992; AHMAD et al., 1993; NDIFUNA et al. , 1998; ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1998; CHEN et al., 2003 ; LOA et al., 2004 ; GIBERTONI et al., 2005 GIBERTONI et al., 2010; KHO et al., 2001).

Nos últimos anos o gene da HN foi expresso em diferentes sistemas, incluindo bactérias cujos produtos mantêm epítomos lineares com potencial aplicação em diagnóstico e principalmente o sistema baculovírus (ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1999; ZOTH et al., 2011). O gene da glicoproteína HN foi clonado em: Vírus Vaccinia (NISHINO et al, 1991), fowlpox vírus (BOURSNELL et al, 1990; EDBAUER et al 1990; IRITANI et al, 1991), retrovírus (GRAVEL et al, 1990; COSSET et al, 1991), herpesvírus de peru (HECKERT et al, 1996), baculovírus (NAGY et al, 1990; NISHINO et al, 1991, ONG et al, 2000) e Citomegalovírus (LOKE et al, 2005). Embora a *E. coli* tenha sido usada para a expressão da forma recombinante da HN, essa proteína foi destinada para estudos de antigenicidade visando a preparação de vacinas contra o VDN. Há apenas um estudo versando sobre a aplicação da HN recombinante produzida em *E. coli* como antígeno de fase sólida no ELISA, que não obstante tenha proporcionado resultados promissores (MOHAN et al., 2006), revelou também que há pontos a serem ainda aprimorados como a obtenção das proteínas recombinantes a partir da fração solúvel do lisado celular.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Contribuir com o imunodiagnóstico da doença de Newcastle através do desenvolvimento de um sistema heterólogo, com os vetores apropriados, a fim de que as proteínas recombinantes obtidas sejam destinadas ao uso como preparação antigênica em ensaios sorológicos para o diagnóstico indireto da infecção pelo vírus da doença de Newcastle, ou no monitoramento e vigilância ativa da infecção por esse mesmo patógeno viral.

3.2.- Objetivos Específicos:

3.2.1- Caracterização bioquímica e imunoquímica das proteínas recombinantes expressas,

3.2.2- Aplicação das proteínas recombinantes obtidas no ensaio de ELISA-indireto para a detecção e mensuração de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle,

3.2.3- Avaliação da eficiência da aplicação das proteínas recombinantes expressas nos sistemas eucariótico e procariótico através dos resultados obtidos em testes ELISA utilizando soros de aves conhecidamente infectadas, para padronização de um ensaio diagnóstico utilizando o antígeno recombinante mais eficiente.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra viral

A amostra da estirpe vacinal La Sota do vírus da Doença de Newcastle (VDN) foi propagada na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF com nove a onze dias de incubação através da inoculação inicial de 0,1 mL de vacina viva contra a DN. Após 24 horas de incubação a 37,5°C realizou-se o exame de ovoscopia para a identificação e retirada de embriões mortos em decorrência de causas inespecíficas. Decorridas 40 horas de incubação e prévio resfriamento a 4°C, por 18 horas, a suspensão de líquido córion-alantóide infectado (LCAi) foi colhida e imediatamente centrifugada a 3000xg, 4°C por 30 minutos, para a clarificação da suspensão viral. O título hemaglutinante dessa suspensão foi avaliado pelo teste de hemaglutinação (HA) (SOUSA et AL., 2000). O volume total obtido de LCAi foi armazenado a -70°C.

4.2. Extração do RNA viral

O procedimento de extração do RNA viral foi realizada, a partir do líquido córion-alantóide infectado (LCAi) com estirpe La Sota com o auxílio do reagente comercial Trizol LS (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante, com algumas adaptações, abaixo explanadas.

A extração foi feita a partir de 500 µL de LCA infectado com a estirpe La Sota, adicionando-se 500 µL de Trizol LS Reagent (Invitrogen) e mais 100 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1. Em seguida, a mistura foi homogenizada com ajuda do vórtex e deixada em repouso em banho de gelo por 5 minutos sendo ao final desse passo, centrifugadas em 12000 xg por 15 minutos a 4°C. A fase líquida, em volume de aproximadamente 500 µL, foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde se adicionou o mesmo volume

de álcool isopropílico (500 µL). Essa mistura foi agitada, delicadamente, por inversão e depois deixada por 20 minutos a -70°C (precipitação do RNA).

No passo seguinte, centrifugou-se a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. Ao final dessa etapa, descartou-se o sobrenadante (álcool isopropílico) e adicionou-se 1mL de etanol 75%, homogeneizando-se manualmente, e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7.500 xg por 5 minutos a temperatura de 4°C, descartando-se, ao final o sobrenadante. As amostras foram colocadas para secar a temperatura ambiente e ressuspendidas em 12 µL de água ultra pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,1% p/v) e mais 1µL de inibidor de ribonuclease, por reação.

4.3. Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa, para obtenção do cDNA a partir do RNA genômico viral extraído, foi realizada incubando-se, inicialmente, a 65°C por 5 min, a mistura inicial de reação. Esta foi constituída por dNTPs (0,5mM) e “Random Primer” (0,1%) e 5µL do RNA extraído, em quantidade suficiente para completar um volume de 10µL. Em seguida, foi acrescentado o tampão 1x da enzima transcriptase reversa (Tris-HCl (50Mm, pH 8,3), HCl (75mM), MgCl₂ (3mM) e a reação foi incubada a 42° C por 2min, para depois se adicionar a enzima transcriptase reversa (Superscript/Invitrogen). A reação foi então incubada a 42°C por 50 min e, no final, a 70°C por 15 min.

4.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a obtenção das regiões codificadoras dos genes de interesse foi realizada a PCR para um volume final de 50µl. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 µL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com

DEPC e adicionando-se 5 μ L de cDNA viral obtido na RT. As temperaturas e os passos da PCR foram previamente otimizados, em função, principalmente, das características físico-químicas dos iniciadores utilizados.

4.5. Análise eletroforética em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados na PCR foi realizada através da eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose (1,0%) imerso em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm). A visualização dos produtos amplificados no gel de agarose foi realizada através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL). Quando necessário, os produtos do DNA alvo amplificados foram purificados através da utilização do kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

4.6. Metodologia para clonagem e expressão em *Escherichia coli*

4.6.1. Produção de células competentes de *E. coli*

As células escolhidas para clonagem, da linhagem *E. coli* DH10B e as utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes, da linhagem *E. coli* ER2566, foram quimicamente tornadas competentes conforme descrito por HANAHAN et al.(1983).

4.6.2.- Oligonucleotídeos iniciadores

Foram construídos os oligonucleotídeos iniciadores à partir da glicoproteína HN da estirpe La Sota segundo a sequência AJ621747 (GenBank) (quadro 01).

Quadro 01: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos específicos caracteristicamente imunogênicos, clonados no vetor pET SUMO (Invitrogen) no sistema *E. coli*

SISTEMA <i>E. coli</i>		
Fragmento HN – N terminal 1050 pb	Direto	5' ATG GAC CGC GCC GTT AG 3'
	Reverso	5' TCA TTG CTG ATC TGG GCC A T 3'
Fragmento HN - C terminal 692 pbb	Direto	5' ATG GAC TAC CAG ATT CGA 3'
	Reverso	5' CTA GCC AGA CCT GGC TTC TC 3'
Fragmento HN01 75 pb	Direto	5' ATG GAC TAC CAG ATT CGA 3'
	Reverso	5' TCA AGC CTG CTG TAT GCG 3'

4.6.3. Vetores de clonagem e expressão do produto da RT- PCR

Para a clonagem e expressão dos fragmentos N-terminal e C-terminal do gene da glicoproteína HN do VDN em *E. coli* foi utilizado o vetor Champion™ pET SUMO “Protein Expression System” (Invitrogen) (Figura 2)., seguindo, em linhas gerais, as indicações do manual do fabricante Este permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com T7 RNA polimerase para as células, que é fornecida pela *E. coli* que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990).

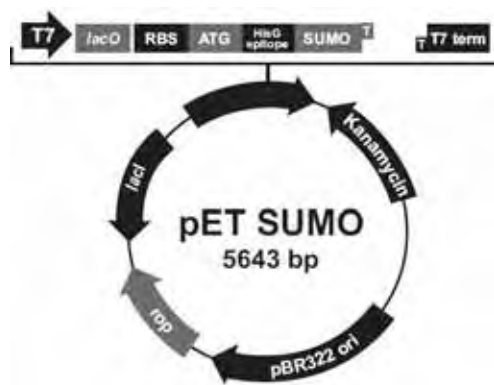


Figura. 2. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen) utilizado no sistema *E. coli*.

4.6.4 Transformação de células competentes de *E. coli* DH10B por choque térmico

Um volume de 200 μ l de células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B foi removido do freezer e mantido em gelo para descongelamento lento e posterior adição da mistura das reações de ligação, enquanto a mistura de reação de controle (vetor sem inserto), foi adicionada a um outro tubo contendo células competentes da mesma linhagem, seguindo de agitação suave e incubação em banho de gelo por 30 minutos. Decorrido esse tempo, as suspensões de células foram submetidas ao tratamento de choque térmico, fazendo-se a transferência do tubo contendo a mistura de reação para um banho maria a 42°C por dois minutos e, retornado para o gelo, matendo-o assim por dois minutos. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 500 μ l de meio LB + 0,2% de glicose incubados a 37°C por 1h. Após transformação, as células foram plaqueadas em meio 2xLB (10g de triptona, 10 g de NaCl, 5g de extrato de levedura, completar com água destilada para 1000 ml, e ajustar para pH 7,5) com o antibiótico apropriado para cada vetor. As placas foram incubadas a 37° C durante 16-18 h. Os clones transformantes que cresceram foram selecionados e essas colônias foram transferidas de forma organizada para a placa de 96 poços, contendo 2xLB +0,2% de glicose

suplementado com o antibiótico apropriado, para crescimento a 37°C e posterior estocagem em glicerol e manutenção a -70°C. Alguns clones obtidos na transformação de *E. coli* foram submetidos à mini-preparação de plasmídeos para a checagem, por meio de amplificação com jogo de oligonucleotídeos e por seqüenciamento, dos clones portadores do vetor e dos insertos de interesse. Os clones gerados pela transformação apenas com o vetor de expressão, sem inserto, foram utilizados para obtenção, após a indução, de extrato celular utilizado como controle positivo da expressão e para absorção de reatividade inespecífica nos ensaios sorológicos.

4.6.5 Análise dos clones transformantes

Alguns clones obtidos na transformação de *E. coli* foram submetidos à extração de DNA plasmidial pela técnica de mini-preparação com o kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas). Em seguida, foram realizadas reações de PCR com combinações 2 a 2 dos oligonucleotídeos iniciadores do inserto e do vetor, além de seqüenciamento de nucleotídeos do inserto gênico. A análise da presença do inserto foi feita com base no tamanho dos fragmentos amplificados nas PCRs com combinações 2 a 2 de cada um dos pares de oligonucleotídeos iniciadores, específicos para a amplificação dos genes ou fragmentos de interesse, ou das seqüências que flanqueiam os sítios de clonagem no vetor pET-SUMO (Invitrogen), conforme descrito no quadro 2, usando-se para comparação um padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Quadro 2. Descrição dos oligonucleotídeos do vetor pET SUMO para a avaliação dos clones transformantes de *E. coli*.

Vetor	Iniciadores	Sequência
pET SUMO	SUMO forward	5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'
	T7 reverse	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

Em suma para análise do DNA obtido a partir das mini-preparações e posterior seleção dos clones selecionados a partir da transformação foi feita uma PCR para a obtenção de toda a região codificadora do gene de interesse e também do vetor com o intuito de se identificar os clones que continham o inserto gênico. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 µL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC para volume final de 48,5 µL e adicionando-se 1,5 µL de DNA plasmidial obtido na extração dos clones transformantes.

As temperaturas e os passos da PCR foram otimizados, em função das características físico-químicas dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados através de um gradiente de temperatura. As reações utilizadas para amplificação dos produtos de interesse após otimização estão relacionadas no quadro 03.

Quadro 03. Perfis térmicos utilizados para amplificação dos insertos a serem clonados no vetor pET SUMO (Invitrogen) no sistema *E. coli*.

HN 01 (72pb)	1. 95°C – 5min 2. 94°C – 30seg 50°C – 30seg 72°C – 1min 3. 72°C – 10 min 4. 4°C – ∞ } 25x
HN N- TERMINAL (1050pb)	1. 95°C – 5min 2. 94°C – 1min 50°C – 1min 72°C – 1,5min 3. 72°C – 10 min 4. 4°C – ∞ } 25x
HN C- TERMINAL (692pb)	1. 95°C – 5min 2. 94°C – 1min 55°C – 1min 72°C – 1,5min 3. 72°C – 10 min 4. 4°C – ∞ } 25x

4.6.6 Sequenciamento de nucleotídeos do inserto gênico dos clones bacterianos transformantes

As amostras de DNA obtidas das extrações de cada clone bacteriano foram submetidas à reação de seqüenciamento utilizando-se o kit “DNA Sequencing-Big Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” versão 3.0. A seqüência de nucleotídeos foi compilada e analisada usando-se o programa Clustal W e comparando a similaridade de cada um dos clones analisados com a estirpe La Sota depositada no “GenBank” sob o código AJ621747.

4.6.7 Indução da expressão dos peptídeos recombinantes

Para a indução da expressão das proteínas recombinantes os clones transformantes foram inoculados em 10mL de meio 2xTY (1,7% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, 0,2% glicose) com agitação de 250rpm a 37°C ON. Após a incubação foi transferido 1mL da cultura para 50mL de meio 2xTY e incubados a 37° com agitação de 200rpm até atingir densidade óptica a 600nm (DO_{600}) entre 0.6-0.8, nesse momento 0,5mM de IPTG foi adicionado, sendo a cultura incubada a 30°C durante 4h com agitação de 200rpm. Após incubação as células foram centrifugadas 12000rpm por 10 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2mL de tampão de lise (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8.0). A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), permanecendo por 4 ciclos de 30seg cada, seguido de centrifugação a 12000rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante guardado para análise.

4.7 Metodologia para clonagem e expressão na cepa INVSc1 *Saccharomyces cerevisiae*

4.7.1 Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram construídos oligonucleotídeos iniciadores específicos para flanquear toda *open reading frame* (*orf*) do gene codificador da glicoproteína HN (quadro 04). Para isso consultou-se no 'GenBank' a sequência de nucleotídeos do VDN cadastrado sob os códigos de acesso AJ621747 (para HN) e AJ629062 (para F). Com auxílio de programas computacionais como *Gene Runner* (versão 3.05, *Hastings Software, Inc.*) e *BioEdit Sequence Alingment* Editor (versão 7.0.4.1, 1997-2005 Tom Hall) as características físico-químicas e desempenho da técnica de PCR foram analisadas.

Quadro 04. Oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação da proteína HN recombinante no sistema *S. cerevisiae*.

SISTEMA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
HN 1734 pb	Foward	5' GAA ATG GAC CGC GCC GT 3'
	Reverse	5' GCC AGA CCT GGC TTC TC 3'

4.7.2 Clonagem do gene da proteína HN do VDN

Primeiramente foi preparado o cDNA a partir do RNA genômico, tendo sido aplicadas as técnicas de RT e PCR. O produto amplificado contendo o gene de interesse foi clonado no vetor pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen®), o qual foi usado para a transformação de células de *E. coli* da linhagem Dh10B sendo que os transformantes foram cultivados em meio 2xLB 50 µg/ml de ampicilina. O sistema pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®) possibilita a expressão de uma proteína heteróloga recombinante com etiquetas na sua porção carboxi-terminal (cauda), do epítipo V-5 e de uma sequência de 6 histidinas (poli-histidina). Após a extração do DNA de alguns clones bacterianos foi feita a confirmação da presença

de plasmídeos contendo o inserto dos genes, por meio da técnica de PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores. Além disso, as amostras de DNA plasmidial obtidas foram submetidas à reação de seqüenciamento. A seqüência de nucleotídeos foi compilada e analisada usando-se o programa Clustal W.

4.7.3 Expressão das proteínas recombinantes na cepa INVSc1 de *S. cerevisiae*

Para a expressão das proteínas recombinantes em células de levedura transformadas, seguiu-se o protocolo preconizado pelo sistema pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®) (figura 03), que contém o promotor GAL-1, o qual permite a expressão do gene inserido no sítio múltiplo de clonagem, e o gene URA-3 para seleção de um grande número de cópias em levedura, além de ser um vetor episomal para a clonagem de produtos de PCR. Fez-se a transformação de células competentes de levedura, as quais foram preparadas com o auxílio dos reagentes e dos procedimentos do “Kit S.c. EasyComp™” (Invitrogen).

Em suma, um clone da levedura transformante e previamente confirmado como portador do inserto gênico de interesse foi inicialmente cultivado em meio YPD sólido (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de glicose e 2% de agar), para a obtenção de colônias isoladas após aproximadamente 4 dias de incubação a 30°C. Uma colônia isolada de levedura, foi então inoculada em meio seletivo SC-U (0,67% de “Yeast Nitrogen Base”, 0,2% “Yeast Synthetic Drop-out uracil”), contendo 2% de glicose e cultivada O.N. a 30°C, com agitação de 250rpm. Em seguida, a DO₆₀₀ foi mensurada e a partir do valor obtido, foi calculada a quantidade de cultura necessária para se alcançar uma DO₆₀₀ final igual a 0,4 em 50 mL de meio de indução, sendo feita a centrifugação a 1,500 x g por 15 min. O sedimento de células de leveduras foi então ressuspensionado em meio de indução (0,67% de “Yeast Nitrogen Base”, 0,2% de “Yeast Synthetic Drop-out uracil”; 0,004% de adenina; 2% de galactose). A cultura foi incubada a 30°C por 24 horas

a 250rpm de agitação, sendo após isso, as culturas centrifugadas a 1.500 xg, 5 min, a 4°C.

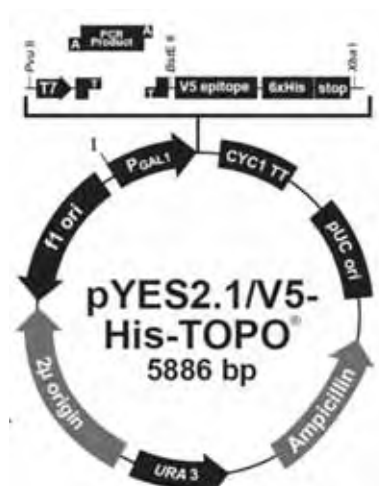


Figura 03. Mapa do vetor pYES 2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) utilizado para clonagem e expressão de proteínas recombinantes no sistema *Saccharomyces cerevisiae*.

4.7.4 Extração das proteínas recombinantes das células lisadas de levedura

Seguiu-se, no geral, o protocolo recomendado pelo fabricante do pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®) utilizado na indução da expressão de proteína em leveduras.

As células de levedura contendo as proteínas recombinantes foram ressuspendidas em 500 µl de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio, pH 7.4; 1 mM de EDTA; 5% de glicerol e 1mM de PMSF- Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil), sendo então centrifugadas a 1500 xg por 5 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas no tampão de lise, em um volume adequado e de forma a se obter uma DO₆₀₀ entre 50 – 100. Foi adicionado um volume igual de esférulas de vidro com 0.4-0.6µm de diâmetro (Sigma) previamente submetidas à lavagem ácida segundo recomendação do fabricante. Em seguida, as células de leveduras foram agitadas em vórtex, por

30s, sendo transferidas por mais 30s no gelo, repetindo-se este procedimento por 20x, para se obter um maior grau de lise das células. Ao final dessa etapa, foi feita a dosagem das proteínas totais.

4.8 Dosagem das proteínas recombinantes

Para a análise da expressão dos clones por SDS-PAGE e western blot, foi determinada a quantidade de proteína total, obtida após a expressão nos sistemas *E. coli* e *S. cerevisiae*, e também após a purificação com a resina de níquel – sepharose, por meio do kit “Protein Assay” (BIO-RAD), baseado no método descrito por BRADFORD (1976), seguindo as instruções do fabricante e usando-se uma solução padrão de soroalbumina bovina com a concentração proteica a 1 mg/mL.

4.9 Purificação das proteínas recombinantes por resina de afinidade de níquel sepharose

O procedimento utilizado na purificação das proteínas recombinantes foi realizado por interação com a resina de afinidade composta por níquel – sepharose, (Ni Sepharose High Performance/Amersham Biosciense, Piscataway, NJ, USA) de acordo com as recomendações do fabricante da resina. Em resumo, o extrato bruto das culturas foi clarificado por meio de centrifugação a 10,000 x g por 10 min a 4°C, e 1 mL do sobrenadante obtido foi misturado com 1ml da resina de níquel-agarose. A mistura foi deixada em contato por 16 h e depois, tratada com o tampão de lavagem e o de eluição contendo 500 mM de Imidazol (Sigma), para remoção das proteínas da matriz de níquel. Após o procedimento de purificação, as preparações foram estocadas a -20°C, sendo determinadas as concentrações protéicas pelo método de BRADFORD (1976), bem como as características imunoquímicas através das técnicas de SDS-PAGE e de western-blot.

4.10 Análise da expressão das proteínas recombinantes através das técnicas de SDS-PAGE e western blot

As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol). Após fervura por 2 min as amostras foram aplicadas em 2 géis de poliacrilamida, sendo 12% a concentração na porção de cada gel de separação. A separação eletroforética foi realizada por eletroforese utilizando-se um sistema de tampão descontínuo, conforme recomendado na técnica descrita por LAEMMLI (1970). As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com “Coomassie Brilliant Blue R-250”, enquanto que o outro gel foi usado para a eletrotransferência na membrana HPVDF (GE Healthcare, USA) seguindo-se a realização da técnica de western-blot.

Para esta foi, em geral, adotado o protocolo de TOWBIN et al. (1979), buscando-se fazer a detecção das proteínas recombinantes, tanto com o anticorpo monoclonal anti-histidina, como com anticorpos policlonais anti-VDN presentes no soro policlonal de aves hiperimunizadas contra esse vírus. Depois de realizada a separação eletroforética, e a eletrotransferência para a membrana, seguiu-se o bloqueio com leite em pó desnatado a 5% em tampão salina saturado em fosfato (PBS). A diluição do anticorpo monoclonal anti-histidina foi de 1:1000 e a do soro hiperimune de galinhas de 1:100, ambas preparadas em PBS acrescido de 10% de LPD. Nesta fase a reação foi incubada sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Os conjugados anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de galinha com a peroxidase (SIGMA) foram utilizados na diluição de 1:1000 em PBS acrescido de 10% de LPD e incubado por 1 h sob agitação, para revelar a ligação antígeno-anticorpo. Na reação com soro policlonal adicionou-se além do leite em pó, extrato celular de células contendo apenas o vetor de expressão, sem inserto, denominado controle positivo (C+), na diluição do soro policlonal e do conjugado anti-IgG de galinha (SIGMA). Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tween

20 (PBST) e PBS, sendo a revelação de cor da reação feita após a adição do substrato cromógeno específico – DAB e uréia (Sigma).

4.11. Concentração do VDN com polietileno-glicol para uso nas técnicas de SDS-PAGE e de western-blot

O vírus foi concentrado conforme a técnica descrita por LANCER e HOWARD (1980) e a partir do LCAi colhido dos ovos SPF onde foi feita a propagação do VDN.

4.12. Preparo de soros de referência contra o VDN

Antissoros contra a estirpe LaSota de referência do VDN foram preparados em 10 galinhas SPF adultas alojadas em isoladores de pressão negativa, seguindo-se o método de ADAIR et al. (1989). As aves foram inoculadas por via oral e nasal com 0,1 mL de líquido córion-alantóide contendo aproximadamente 256 unidades hemaglutinantes do VDN. Decorridas 3 a 4 semanas as aves receberam uma dose adicional de reforço por via nasal e, depois de mais 1 a 2 semanas, foi feita a coleta de sangue sem anticoagulante, para que se pudesse separar o soro de cada uma das aves. Estes foram testados na técnica de HI contra a estirpe homóloga do VDN e aqueles com altos títulos de HI foram reunidos em um pool e separados em pequenas alíquotas e depois armazenados a -20°C.

4.13. Amostras de soros para aplicação em teste de imunodiagnóstico das proteínas recombinantes

A idéia central foi que pudesse ser analisado um painel de amostras mais representativo, tendo sido colhidas amostras de sangue por punção da veia ulnar, de maneira que fosse obtido um painel de amostras de soro sanguíneo mais

abrangente contendo amostras com títulos de anticorpos mais elevados, moderados, ou mais reduzidos, ou ainda, negativos quanto à reatividade com o VDN. Desta forma, foram colhidas amostras de soro de galinhas de postura e de frangos de corte submetidos a esquema usual de vacinação para esses tipos de criações de aves, bem como de galinhas SPF da linhagem White Leghorn, como fornecedoras de amostras negativas para o VDN.

4.13.1. Amostras de soros de galinhas de postura e matrizes

Foram colhidas 141 amostras de sangue de galinhas de postura (linhagens White Leghorn e Lohmann Brown) de granjas da região de Bastos-SP, as quais foram divididas conforme a idade em quatro grupos (I, II, III e IV). Também foram colhidas 99 amostras de matrizes. Todas as aves receberam de três a quatro doses de vacina “viva” atenuada contra o VDN (via ocular e spray), nas idades de 7, 28, 63 e 95 dias, além de oito outras vacinas contra outros diferentes patógenos bacterianos e virais aviários. Quando a colheita de sangue foi realizada, as aves estavam no 94° (grupo I), 151° (grupo II), 182° (grupo III) ou 237° (grupo IV) dia de idade.

4.13.2. Soros de frangos de corte

Foram colhidas 69 amostras de um lote de 960 de aves da linhagem Cobb (corte), os quais foram divididos em 2 grupos (A e B). Todas as aves receberam vacina contra o VDN aos 7 dias de idade. A colheita foi realizada quando as aves estavam com 17 dias de idade, ou seja, 10 dias após vacinação, no grupo A, e com 47 dias de idade, ou seja, 40 dias após vacinação, no grupo B.

4.13.3. Amostras de soros negativos para o VDN

Amostras sanguíneas de 20 aves da linhagem White Leghorn SPF foram usadas para a avaliação de parâmetros do teste de ELISA, como sensibilidade, especificidade e ponto de corte de cada teste sorológico.

4.14. Titulação em bloco para padronização da aplicação das proteínas recombinantes do VDN no teste de ELISA Indireto

Em linhas gerais foi adotado o protocolo descrito por GIBERTONI et al. (2005) (40). Em resumo, placas com 96 cavidades (Costar) foram adsorvidas com 50 μ L de uma solução de cada uma das proteínas recombinantes em concentração crescentes. Para o antígeno HN01 expresso no sistema *E. coli* a titulação variou de 2,5 a 10ug/mL de proteína recombinante adsorvida. Para os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal, também produzidos no sistema procarioto as concentrações testadas foram de 20 a 80ug/mL. Para a proteína HN produzidas no sistema *S. cerevisiae*, as concentrações foram de 2,5 a 20ug/mL de proteína recombinante adsorvida, todas preparadas em tampão PBS pH 7.4. As placas foram então incubadas a 4°C, durante a noite, depois lavadas quatro vezes com PBS-Tween-20 e bloqueadas por 45 min com 100 μ L por cavidade de tampão de bloqueio (10% de leite em pó desnatado, 0,2% Tween 20, 0,02% de azida de sódio em PBS). As placas foram a seguir, lavadas com PBS Tween 20 quatro vezes e foi adicionados 50 μ L por cavidade das amostras de soro de galinha hiperimunizadas contra o VDN, ou SPF, representando controles positivo e negativo do teste, ambos diluídos de 1:50 a 1:1600 em tampão de bloqueio adicionado de 10% de extrato bruto do lisado celular de *E. coli* ER2566 ou INVsc1 *S. cerevisiae*, sendo feita, em seguida a incubação à temperatura de 37°C por 2 h. As placas foram então novamente lavadas com PBS-Tween 20 por quatro vezes e depois foi adicionado, o conjugado imunoenzimático diluído a 1:1000, constituído por IgG de coelho anti-IgG de galinha com a peroxidase, diluído em tampão de

bloqueio com a mesma constituição citada anteriormente. As placas foram, incubadas a 37°C por 2h e, ao final desta etapa foram lavadas por quatro vezes. Em seguida foi feita a adição, de 50µL/cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / Orto-fenileno-diamina-OPD), preparada em tampão citrato-fosfato pH 5.0, deixando a reação se desenvolver por 15 min a temperatura ambiente, quando foi adicionado HCl 2M em volumes de 50uL/cavidade para bloquear a atividade enzimática. As DOs obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD - Modelo 550) no comprimento de onda de 492 nm.

4.15. Aplicação das proteínas recombinantes do VDN no teste de ELISA indireto HN-recombinante

As microplacas de poliestireno (Costar) foram adsorvidas com os antígenos HN N-terminal (ELISA HN N-terminal) e HN C-terminal (ELISA HN C-terminal) na concentração de 40ug/mL preparadas em PBS pH 7.4, as quais foram incubadas O.N. a 4°C. Após lavagens, as placas foram incubadas com tampão de bloqueio (PBST + 10% LPD) por 45 minutos a 37°C. As amostras de soro e os soros de referência positivo e negativo, foram diluídas em tampão de bloqueio acrescido de 10% de lisado bruto de *E. coli* ER2566, na diluição 1:50, e aplicados em duplicata na placa, onde foram incubados por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas para posterior adição do conjugado anti-IgG de galinha com peroxidase (SIGMA, USA) diluído a 1:1000 em tampão de bloqueio acrescido de lisado de *E. coli* e a reação foi incubada por 2 horas a 37°C. No final, após as lavagens, foi adicionado o substrato e a reação foi incubada por 15 minutos. A leitura das densidades ópticas (DOs) foram transformadas em valores de relação amostra / positivo (A/P), tal como recomendam GIBERTONI et al. (2005). O ponto de corte foi estabelecido pela média do valor A/P + 3x desvio-padrão de 20 amostras de soros de galinha negativos para VDN.

4.16. Testes sorológicos de referência

4.16.1 Teste de inibição da hemaglutinação (HI)

Em linhas gerais foi adotado o protocolo descrito pela OIE (2008) para a realização do teste de HI.

Para tanto, inicialmente foram colhidos aproximadamente 5 ml de sangue de aves com anticoagulante (solução Alsever). Em seguida, a quantidade colhida (hemácias + anticoagulante) foi filtrada, utilizando-se funil e algodão; lavada três vezes em PBS pH 7,2; e centrifugada à baixa rotação por 4 minutos. O sedimento resultante foi diluído a 0,5% em PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina e em seguida, foi feita a lise das hemácias utilizando-se 4,5 mL de água destilada e 0,5 mL da suspensão anterior. A DO desejada (0,30 a 0,33) foi mensurada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 545 nm. Posteriormente foi feita a titulação do vírus pela reação de hemaglutinação (HA), que foi realizada em microplacas com fundo em “U”. Em suma, nesse procedimento, foram adicionados 25 µL por cavidade de diluente (PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina) e em seguida, foi realizada diluição seriada na razão 2 de suspensão viral (VDN, estirpe La Sota). A seguir foi adicionada a suspensão de hemácias em todas as cavidades, no volume de 25 µL/cavidade, e após 30-40 minutos procedeu-se a leitura do título do HA, que foi expresso como a recíproca da maior diluição do vírus, onde se verificou o fenômeno da hemaglutinação por completo.

Uma vez determinado o título hemaglutinate do vírus, a próxima etapa foi submeter as amostras de soro ao teste de HI. Para tanto, foram colocados 25 µL de PBS pH 7,2 + albumina em todas as cavidades e, foi adicionado o soro das aves utilizando-se diluição seriada de razão 2. Em seguida, adicionaram-se quatro unidades hemaglutinantes (UHA) do antígeno viral padronizado e a placa foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente. Terminada esta etapa, a suspensão de hemácias de galinhas lavadas a 0,5% em PBS pH 7,2 + albumina foi adicionada às cavidades como sistema revelador da reação e incubou-se por

mais 30 minutos, a temperatura ambiente. O título foi definido como o inverso da maior diluição de soro capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante viral. O ponto de corte utilizado para o teste de HI foi de 8 (2^3 ou Log_{10}), de acordo com o preconizado pela OIE (2008).

4.16.2. Teste Sanduíche-ELISA-Indireto-Concanavalina A (S-ELISA-ConA)

Foi seguido o protocolo geral descrito por BRONZONI et al. (2005), com algumas adaptações resumidas a seguir. As microplacas de poliestireno (Costar) foram adsorvidas com 1mg/mL de Concanavalina A diluída em PBS (pH 7,4) e incubadas a 4°C O.N. Após lavagens com PBS-Tween 20 foi realizado o bloqueio com tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 acrescido de 10% de leite em pó desnatado por 45 minutos a 37°C. A suspensão viral antigênica foi adicionada, diluída 1:2 e incubada a 37°C por 1 hora. Após lavagens, foram adicionadas as amostras séricas a serem testadas e os controles de soros positivo e negativo para o VDN, na diluição 1:500. Foi utilizado o conjugado imunoenzimático anti-IgG de galinha com peroxidase na diluição 1:1000, incubado a 37°C por 2 horas. Após lavagens, foi adicionado o substrato cromógeno (peróxido de hidrogênio, H_2O_2 e orto-fenileno-diamina – OPD) que permaneceu por 15 minutos, quando foi adicionado HCl 2M para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas (DOs) foram mensuradas no leitor de placas Bio Rad modelo 550 no comprimento de onda de 490nm. Para cada amostra de soro teste a DO média das duplicatas (DOMTS) foi expressa em relação à DO média das duplicatas do soro de referência positiva (DOMPRS) e referência negativa (DOMNRS) de acordo com a fórmula $A/P = (\text{DOMTS} - \text{DOMPRS}) / (\text{DOMPRS} - \text{DOMNRS})$. O ponto de corte (cut-off) foi calculado pela média das amostras negativas acrescida de três vezes o valor do desvio padrão das mesmas amostras.

4.17. Análise dos resultados do ELISA indireto

Os níveis de anticorpos (valores A/P) anti-VDN mensurados pelos ELISAs HN-Indiretos foram analisados por regressão linear com os títulos de anticorpos HI mensurados como $\text{Log}_{10}\text{Título-HI}$, bem como com os valores A/P resultantes do teste S-ELISA-ConA, obtidos para cada um dos 329 soros de galinha testados obtendo-se o coeficiente de correlação (r de Pearson) entre ambos testes sorológicos e usando-se o programa EXCELL.

O ponto de corte foi determinado pela média do valor A/P de 20 soros de galinha negativos + 3x o desvio padrão dessas mesmas amostras séricas negativas.

4.18. Avaliação da sensibilidade, especificidade e acurácia

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia para detecção de anticorpos anti-VDN foram determinados comparando-se dois a dois os testes HI e S-ELISA-Con A como descrito abaixo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+c} * 100$$

Onde 'a' é o número de soros positivos em ambos os testes e 'c' é o número de soros positivos no teste referência e negativo no teste ELISA-Indireto HN recombinante.

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b+d} * 100$$

Onde 'd' é o número de soros negativos em ambos os testes e 'b' é o número de soros negativos no teste referência e positivo no teste ELISA-Indireto HN recombinante.

$$\text{Acurácia} = \frac{a+d}{a+b+c+d} * 100$$

Os resultados obtidos dos testes foram analisados com a porcentagem de concordância utilizando o índice Kappa:

$$K = \frac{a+d-P}{1-P}$$

Onde $P=(a+b)(a+c)+(c+d)(b+d)$ e P é a probabilidade, 'a' é o número de amostras positivas para ambos os testes, 'b' é o número de amostras positivas no teste referência mas negativa no ELISA-Indireto HN recombinante, 'c' é o número de amostras negativas no teste referência e positiva no ELISA-Indireto HN recombinante e 'd' é o número de amostras negativas em ambos os testes.

4.19. Soro hiperimune de cabra

Dois animais adultos receberam por via intramuscular, doses de 100ug, das proteínas recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal produzidas no sistema *E. coli* contendo adjuvante completo de Freund. Após 15 dias as cabras receberam reforço com doses de 50ug contendo adjuvante incompleto de Freund, por via subcutânea. As inoculações de 50ug foram repetidas por mais 3 vezes, sendo que ao final de 60 dias da primeira dose, foram colhidos 30mL de sangue dos animais. Os soros foram alicotados e armazenados a -20°C, até o momento do uso.

Para os soros obtidos realizou-se a titulação em bloco conforme protocolo descrito anteriormente, tendo sido adsorvido à placa a concentração de 40ug/mL de cada proteína recombinante. Além disso, realizou-se o protocolo de titulação em bloco tendo sido adsorvido à placa LCAi diluído 1:2 para avaliação da reatividade do antissoro às partículas virais do VDN.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Propagação e titulação da infectividade viral

No procedimento de propagação da estirpe LaSota do VDN em ovos embrionados SPF de galinha, obteve-se um rendimento em termos de massa viral relativamente elevado, caracterizado nesse caso, pelo título hemaglutinante (HA) que foi de 256 e, portanto, suficiente para se empreender, de forma apropriada a execução das etapas subsequentes do desenvolvimento experimental do presente trabalho. A suspensão de LCAi obtida serviu como fonte para a extração de RNA genômico viral que foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA do gene HN do VDN e também foi usada como antígeno viral nas técnicas de hemaglutinação (HA), inibição da hemaglutinação (HI), SDS-PAGE e western blot, tendo sido para as últimas duas técnicas, submetida ao procedimento de concentração de partículas virais com polietileno-glicol.

5.2. Clonagem do gene da glicoproteína HN no sistema eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*

Visando a produção de antígenos recombinantes em um sistema eucariótico, que garante maior fidelidade com relação às modificações pós-traducionais, a glicoproteína HN foi clonada no sistema *Saccharomyces cerevisiae* com o vetor pYES TOPO (Invitrogen).

5.2.1. Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores

Para se obter um melhor resultado na amplificação e confirmar a temperatura adequada para o pareamento dos oligonucleotídeos, foi realizado através do Termociclador MJ RESEARCH®, um gradiente com as seguintes

temperaturas: 53,0°C; 53,3°C; 54,1 °C; 55°C; 56,4°C; 58,2°C; 60,2°C; 61,9°C; 63,2°C; 64,1°C; 64,8°C e 65°C, para o gene HN da estirpe La Sota do VDN (figura 04) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores previamente mencionados (quadro 04).

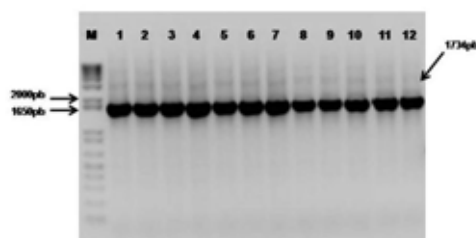


Figura 04: Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao gene da glicoproteína HN com 1734pb, em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) 53°C, (2)53,3°C, (3)54,1°C, (4)55°C, (5)56,4°C, (6)58,2°C, (7)60,2°C, (8) 61,9°C, (9)63,2°C, (10)64,1°C, (11)64,8°C, (12)65°C.

Entre estas, a temperatura que proporcionou a obtenção de produtos amplificados de maior qualidade e isentos da presença de produtos inespecíficos foi 55°C. Dessa forma foi escolhida a temperatura de pareamento que proporcionou a amplificação do gene da proteína HN do VDN com o tamanho esperado de 1734pb (HN).

5.2.2. Amplificação do inserto HN do VDN

A amplificação foi obtida com sucesso a partir de cDNA sintetizado após a extração de RNA viral de LCA de ovos infectados com suspensão viral da estirpe La Sota (figura 05). Após isso, foi realizada a reação de ligação ao vetor pYES 2.1 TOPO (Invitrogen) e a transformação de células *E. coli* DH10b adequadas para a clonagem.

Os plasmídeos recombinantes obtidos foram submetidos à reação de sequenciamento, para posterior transformação das células de leveduras e expressão das proteínas recombinantes.

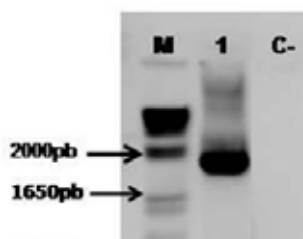


Figura 05. Eletroferograma da amplificação do inserto correspondentes ao gene da glicoproteína HN do VDN. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) glicoproteína HN com 1734pb, C-: controle negativo da reação.

5.2.3. Sequenciamento de nucleotídeos dos insertos nos clones bacterianos transformantes selecionados

A análise de similaridade após o sequenciamento por BLAST revelou altos índices com 99% para o gene HN. A ilustração da análise da homologia está na figura 06.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U01437.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000618.1	Newcastle disease virus B1, complete genome	3121	3121	99%	0.0	99%
AF000619.1	Newcastle disease virus B1/47 hemagglutinin-neuraminidase gene, complete	3121	3121	99%	0.0	99%
AF000620.1	Newcastle disease virus strain DF3Q/Beijing/08 hemagglutinin-neuraminidase	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000621.2	Newcastle disease virus strain JL-1, complete genome	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000622.1	Newcastle disease virus strain JL-1 hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000623.1	Newcastle disease virus mRNA for hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene	3122	3122	99%	0.0	99%
U01438.1	Newcastle disease virus cDNA to complete genomic RNA, clone 30	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000624.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000625.1	Newcastle disease virus strain VG/GA clone 5, complete genome	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000626.1	Newcastle disease virus strain VG/GA, complete genome	3122	3122	99%	0.0	99%
U01439.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	3122	3122	99%	0.0	99%
AF000627.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	3114	3114	99%	0.0	99%
AF000628.1	Newcastle disease virus strain HQ/11aoping/05 hemagglutinin-neuraminidase	3112	3114	99%	0.0	99%
AF000629.1	Synthetic construct isolate rNDV/F3aa/2aag-SARS-S spike S, M protein (M), F	3112	3114	99%	0.0	99%
AF000630.1	Synthetic construct isolate rNDV/F3aa/2aag dsRed protein (dsRed), M protein	3114	3114	99%	0.0	99%
AF000631.1	Newcastle disease virus strain B1 isolate Takaaki, complete genome	3112	3114	99%	0.0	99%
AF000632.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinin-neuraminidase glycopro	3112	3114	99%	0.0	99%
AF000633.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinin-neuraminidase glycopro	3112	3114	99%	0.0	99%
AF000634.1	Newcastle disease virus isolate YC-25-Q7-C haemagglutinin-neuraminidase (I	3109	3109	99%	0.0	99%
AF000635.1	Newcastle disease virus isolate YC-24-Q7-C haemagglutinin-neuraminidase	3109	3109	99%	0.0	99%
AF000636.1	Newcastle disease virus strain HVG801 hemagglutinin-neuraminidase gene, c	3109	3109	99%	0.0	99%
AF000637.1	Newcastle disease virus isolate D58 hemagglutinin-neuraminidase protein ge	3109	3109	99%	0.0	99%

Figura 06. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as seqüências de nucleotídeos seqüenciados dos clones de *E.coli* transformado pelo vetor pYES 2.1 TOPO – Gene HN da estirpe La Sota, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.

5.2.4. Indução da expressão das proteínas recombinantes

A análise dos dados fornecidos pelo seqüenciamento de nucleotídeos, bem como a amplificação utilizando-se as combinações alternadas de oligonucleotídeos, permitiram a confirmação da presença e correta orientação do inserto de interesse.

No presente estudo a análise por SDS-PAGE e western blot, após purificação da fração solúvel do lisado celular, não evidenciou a expressão das proteínas recombinantes.

A inserção de um gene heterólogo em um vetor de expressão não garante um alto nível de produção de proteína heteróloga. A expressão gênica é um processo complexo de muitos passos e problemas podem aparecer em muitos estágios, desde a transcrição até a estabilidade da proteína heteróloga produzida. (ROMANOS et al., 1992)

A eficiência da tradução pode ser controlada primariamente pela taxa de iniciação, que é afetada pela sequência líder 5' do mRNA. Usando um vetor multi-cópia com o promotor GAP491 para expressar o antígeno do vírus da hepatite B (HBcAg) KNISKERN et al (1986) encontraram um acúmulo de produto solúvel de 0,05% de proteína e a deleção da sequência viral 5' forneceu um rendimento de 26% da proteína recombinante. Tal manipulação gênica poderia ter favorecido a expressão da glicoproteína recombinante HN, considerando-se que ambas possuem uma sequência sinal 5', característica do VDN, que permite o transporte destas para a superfície celular da célula infectada.

Em muitos casos, o rendimento da proteína heteróloga produzida usando um promotor de levedura tem sido muito menor que o rendimento da proteína homóloga com o mesmo promotor. Dessa forma, usando-se o promotor fosfoglicerato quinase (PGK) em um vetor multi-cópias várias proteínas acumularam 1-2% proteína celular total, enquanto o gene PGK inteiro, nativo da levedura acumula até 50% de proteína (HOEKEMA et al., 1987).

Tais resultados evidenciam como a sequência de nucleotídeos, inserida após o promotor influencia a maquinaria celular e interfere no processo de produção de proteínas, ou seja, o conteúdo de códons de um gene heterólogo pode influenciar o rendimento de uma proteína (ROMANOS et al., 1992).

O processo de transcrição mostra uma predisposição, algumas vezes sutil, mas significativa, na escolha de qual, entre as trincas degeneradas, será usada para codificar um aminoácido em particular e a escolha dos códons pode ser um dos parâmetros que afetam a expressão (BENNETZEN & HALL, 1982).

Embora o código genético seja degenerado, um uso não aleatório de códons é encontrado em muitos organismos. Assim, genes altamente expressos mostram uma forte preferência por uma subclasse de códons (ROMANOS et al., 1992).

HOEKEMA et al.(1987) observaram que a introdução de códons menos preferenciais gradualmente diminui o nível de expressão da proteína PGK em *S. cerevisiae*. Uma redução de 10x no nível de proteína foi obtida quando 39% de todos os códons foram substituídos por códons raros. O nível de mRNA também declinou gradualmente com o aumento do número de códons raros mas menos severamente, tendo sido reduzido em 3x.

Em uma análise de 1004 códons de aminoácidos por seqüenciamento de DNA em *S. cerevisiae*, BENNETZEN & HALL (1982) verificaram que mais de 96% são codificados por 25 dos 61 códons possíveis. Além disso, o grau de influência dessas 25 trincas preferidas em cada gene está correlacionado com o nível de mRNA no citoplasma. Todos os genes seqüenciados de leveduras mostram a mesma preferência pelos mesmos 25 códons.

Tal influência também foi observada em outros micro-organismos. Altos níveis de expressão gênica foram bem correlacionados com a maior proporção de 22 dos 61 codons possíveis em *E. coli* (BENNETZEN & HALL, 1982)

O padrão, não aleatório, de uso de códons em vários organismos mostra duas características principais: uma forte correlação positiva entre o nível de expressão e o grau de uso de códons preferenciais, e uma relação similar entre o

uso de códons preferenciais e a abundância relativa dos tRNAs correspondentes (HOEKEMA et al., 1987). Dessa forma, esses códons preferenciais, apresentam uma grande variação entre organismos, e podem se constituir em uma importante estratégia para otimização da expressão de proteínas recombinantes heterólogas, pois somente uma subclasse de tRNA é necessária para uma eficiente tradução de genes altamente expressos em culturas com altas taxas de crescimento (ROMANOS et al., 1992). E dentro desse contexto, foi verificado que os tRNA mais abundantes em leveduras são os que permitem a tradução dos códons mais frequentemente usados (BENNETZEN & HALL, 1982).

Além disso, o uso de códons afeta a taxa de elongação da tradução e pode ser considerado um fator potencial que afeta o rendimento da expressão de proteínas recombinantes heterólogas. Codons raros, que são cognatos de tRNA menos abundantes, são traduzidos em baixas taxas em *E. coli*, mas normalmente não afetam o nível de mRNA (ROMANOS et al., 1992). Ainda, a influencia dos códons observada na sequência do mRNA primário pode ser uma função das preferências de seleção atuando no processamento e transporte do mRNA, eficiência da tradução do mRNA, e/ou estrutura secundária e estabilidade do mRNA (BENNETZEN & HALL, 1982).

Em vista de todo o exposto, pode-se considerar que a falta de otimização de códons preferenciais e a distribuição de tRNA em sistemas heterólogos como o *S. cerevisiae* pode explicar o baixo nível de expressão de genes heterólogos observado neste estudo. Para tanto, deve-se considerar que em *S. cerevisiae* como em *E. coli*, códons raros são decodificados por tRNA que estão presentes em concentrações relativamente baixas, de forma que essa limitada disponibilidade de tRNA causaria uma parada do ribossomo nas regiões com códons raros e reduziria enormemente a síntese proteica (HOEKEMA et al., 1987).

O efeito da pausa do ribossomo no mRNA causa desestabilização qualitativamente similar à presença de um stop códon (HOEKEMA et al., 1987). A redução da taxa de elongação da tradução causada pela disponibilidade limitada de tRNA pode ser menos severa em células transformadas com vetores

integrativos do que em células com um alto número de cópias de plasmídeo, como o sistema adotado neste estudo (HOEKEMA et al., 1987).

A presença de sequências repetitivas, diretas ou inversas, maiores do que oito nucleotídeos pode formar uma estrutura secundária no mRNA transcrito o que pode afetar a tradução (LIMA et al. 2001). BAIM et al (1985) mostraram que uma mutação que introduz um 'hairpin loop' próximo à extremidade 5' do mRNA de CYC1 reduz cinco vezes a quantidade de proteína produzida.

Além disso, fatores estruturais na sequência gênica podem ser relevantes para a estabilidade do mRNA e o processo de tradução. Substituições silenciosas na sequência podem causar distúrbios na estrutura do mRNA que afetam a expressão (HOEKEMA et al., 1987). Sequências ricas em AU na extremidade 3' de alguns mRNAs de mamíferos conferem instabilidade, mas não se sabe se isso funciona em leveduras (ROMANOS et al., 1992).

Se a instabilidade do RNA é diagnosticada como um problema, o rendimento poderá ser aumentado com o uso de um promotor forte, com uma rápida cinética de indução, ou sintetizando quimicamente o gene para alterar ou deletar códons que determinam a instabilidade (ROMANOS et al., 1992).

Há também evidências que a presença de alta proporção de sequências de nucleotídeos AT pode ser uma razão para baixo rendimento ou completo fracasso da expressão de genes heterólogos em leveduras. Uma solução para esse problema seria aumentar o conteúdo GC, através da síntese química de genes que oferece as seguintes vantagens: fornece diretamente a sequência exata desejada, as sequências codificadoras e não-codificadoras podem ser removidas ou adicionadas, não há necessidade da etapa de isolamento do mRNA ou DNA genômico e permite a alteração do gene de forma mais simples (LIMA, 2001).

Portanto, deve-se levar em conta que tal estratégia poderá favorecer a expressão da glicoproteína recombinante HN do VDN no sistema *S. cerevisiae*. Possivelmente, as sequências gênicas possuem características intrínsecas incompatíveis com elevados níveis de expressão de proteínas neste sistema, o que exige uma manipulação na composição de nucleotídeos. A substituição das

sequências de nucleotídeos, sem alterar a sequência de aminoácidos, poderá acarretar o aumento da frequência de códons preferenciais e conseqüente favorecimento da expressão. Além disso, pode ser que a sequência contenha fatores que influenciam na estabilidade do mRNA.

Neste estudo, porém, que objetivava, sobretudo, o fornecimento de antígenos recombinantes a serem aplicados no imunodiagnóstico do VDN, diante da dificuldade de expressão das glicoproteínas do VDN em leveduras, optou-se por outra estratégia. Assim, um sistema procarioto, *E. coli* foi escolhido. Contudo, como os sistemas procariotos de expressão, apresentam limitações inerentes aos processos metabólicos celulares, possivelmente incompatíveis com a expressão de genes das glicoproteínas do VDN na fração solúvel, optou-se então, pela delimitação de duas porções da proteína HN que possibilitassem sua aplicação no imunodiagnóstico, bem como fossem mais compatíveis com a expressão em um sistema procarioto.

5.3. Produção de antígenos recombinantes no sistema procariótico *Escherichia coli*

5.3.1 Fragmento HN01

O fragmento denominado HN01, correspondeu à região incluída entre as posições 1044 a 1116 da glicoproteína HN segundo a sequência AJ621747 (“GenBank”). A sequência de aminoácidos produzida a partir desta região gênica está da posição 354-367 e inclui os resíduos MAKSSYKPGRFGGK.

Tal sequência foi previamente utilizada por KAPCZYNSKI (2010) para a produção de anticorpos monoclonais capazes de detectar o VDN em diferentes estirpes, tanto virulentas quanto vacinais, sendo, portanto, uma região altamente conservada e adequada para o diagnóstico da DN. Tal peptídeo, sintetizado e acoplado a uma proteína carreadora através de um agente ‘crosslinker’ como o glutaraldeído, foi inoculado em camundongos imunologicamente competentes, para posterior coleta de esplenócitos ou linfócitos que foram fundidos com células tumorais, para produção de anticorpos monoclonais pela técnica de hidridoma (KOHLER & MILSTEIN, 1975). Tal procedimento foi realizado com outros seis peptídeos e a produção deste painel de anticorpos monoclonais permitiu a geração de um teste diagnóstico capaz de diagnosticar o VDN, bem como diferenciar a presença de estirpes vacinais ou virulentas.

Foi verificado antes que os pequenos peptídeos gerados neste trabalho foram altamente eficientes como imunógenos e adequados para a geração de esplenócitos e linfócitos capazes de gerar anticorpos monoclonais após a fusão com células tumorais. Tal achado mostrou-se muito atraente por ilustrar como pequenos peptídeos podem ser adequados como ferramentas na produção de ensaios para diagnóstico de patologias virais. Além disso, mostrou-se adequado a um sistema de expressão procarioto, pois apresenta pequeno tamanho molecular o que facilitaria a expressão na fração solúvel do lisado celular (KAPCZYNSKI, 2010).

Dada a eficiência relatada dos anticorpos produzidos em detectar e diferenciar o VDN a partir destes peptídeos buscou-se a expressão do fragmento HN01, em outro sistema, utilizando a bactéria *E. coli* e o vetor pET SUMO (Invitrogen), para utilizá-lo como antígeno em um teste indireto de ELISA, acoplado a uma sequência carreadora, a SUMO, visando a detecção do VDN.

Nesse estudo a sequência HN01, com 75pb. foi amplificada com sucesso, utilizando os oligonucleotídeos previamente mencionados (quadro 01), como mostrado na figura 07. A temperatura ideal de pareamento, observada após análise da intensidade de amplificação por gradiente de temperatura (dados não mostrados) foi a de 50°C.

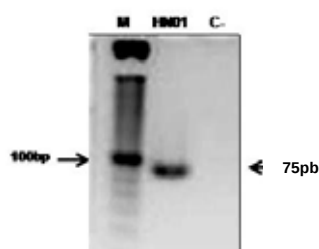


Figura 07. Eletroferograma da amplificação do fragmento HN01. Colunas: M (Marcador 10bp Invitrogen), HN01 (fragmento amplificado), C- (controle negativo da reação)

O fragmento amplificado foi ligado ao vetor pET SUMO (Invitrogen) e o plasmídeo recombinante foi adequadamente transformado em células de *E. coli* DH10b. Após extração do DNA plasmidial e análise da correta inserção do fragmento gênico de interesse, o plasmídeo recombinante gerado foi utilizado na transformação de células de expressão *E. coli* ER 2566.

5.3.1.1 Identificação dos clones bacterianos portadores do inserto

Para análise dos clones transformantes contendo o inserto gênico de interesse na posição correta, foi realizada a técnica de PCR utilizando combinações de oligonucleotídeos do inserto e do vetor. Para isso, o DNA plasmidial extraído

dos clones transformantes foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos do inserto (Inserto-Inserto) e em outra reação foi utilizado o oligonucleotídeo direto do inserto e o oligonucleotídeo reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen) (Inserto-Vetor) gerando um amplicom de 183pb, conforme ilustrado na figura 08.

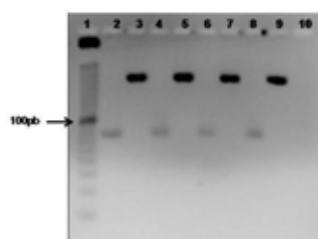


Figura 08: Eletroferograma da amplificação dos clones A9, D8, F4 e F11 para identificação da inserção do fragmento na posição correta através da técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (1): Marcador 100bp(Invitrogen), (2, 4, 6, 8) Clones amplificados com os oligonucleotídeos do inserto, (3, 5, 7, 9) Clones amplificados com o oligonucleotídeo direto do inserto e o oligonucleotídeo reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen), (10) Controle negativo da reação.

5.3.1.2 Indução da expressão do fragmento HN01

Após indução da expressão com 0,1mM e 1mM de IPTG foi obtido o fragmento recombinante, contendo as etiquetas SUMO e poli-his, que foi posteriormente analisado por SDS Page e Western blot conforme ilustrado na figura 09.

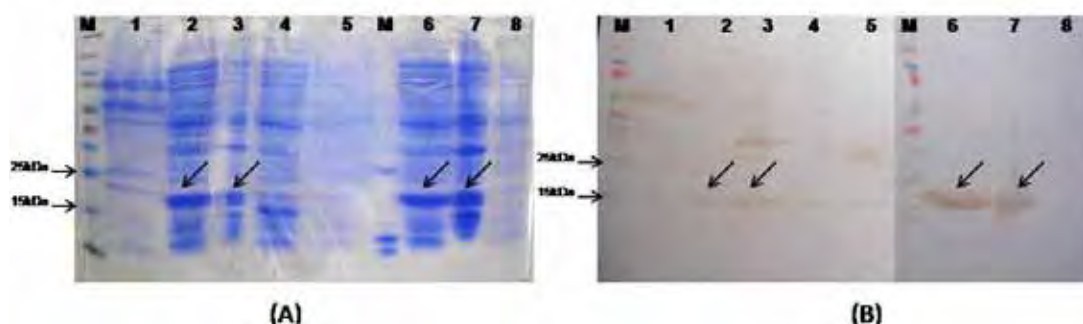


Figura 09. Análise por SDS Page e Western blot do fragmento recombinante HN01 expresso no sistema *E. coli* com o vetor pET SUMO. (A) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. (B)

Avaliação da reatividade do fragmento recombinante com soro policlonal (colunas 1 a 5) e anticorpo monoclonal (colunas 6 a 8). Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) LCA de VDN concentrado, (2) fragmento HN01 expresso após indução com 0,1mM de IPTG, (3) fragmento HN01 expresso após indução com 1mM de IPTG, (4) controle positivo contendo o extrato de células transformadas apenas com o vetor pET SUMO, (5) fração não induzida, (6) fragmento HN01 expresso após indução com 0,1mM de IPTG, (7) fragmento HN01 expresso após indução com 1mM de IPTG, (8) fração não induzida.

Após a expressão do fragmento recombinante, foi realizada a purificação da fração bruta do lisado da cultura celular em resina de Ni-sepharose (GE Healthcare) conforme protocolo descrito anteriormente. A fração purificada obtida foi quantificada pelo método de Bradford, sendo obtida uma concentração de 0,48mg/mL.

A fração purificada foi analisada quanto à sua reatividade com anticorpo monoclonal anti-His e soro policlonal pela técnica de ELISA por titulação em bloco. Foram adsorvidas na microplaca as concentrações de 10ug, 5ug e 2,5ug da proteína recombinante e esta foi comparada com a concentração de 10ug da fração bruta do extrato obtido de células transformadas apenas com o vetor pET SUMO sem inserto (C+). Os resultados obtidos estão mostrados na figura 10.

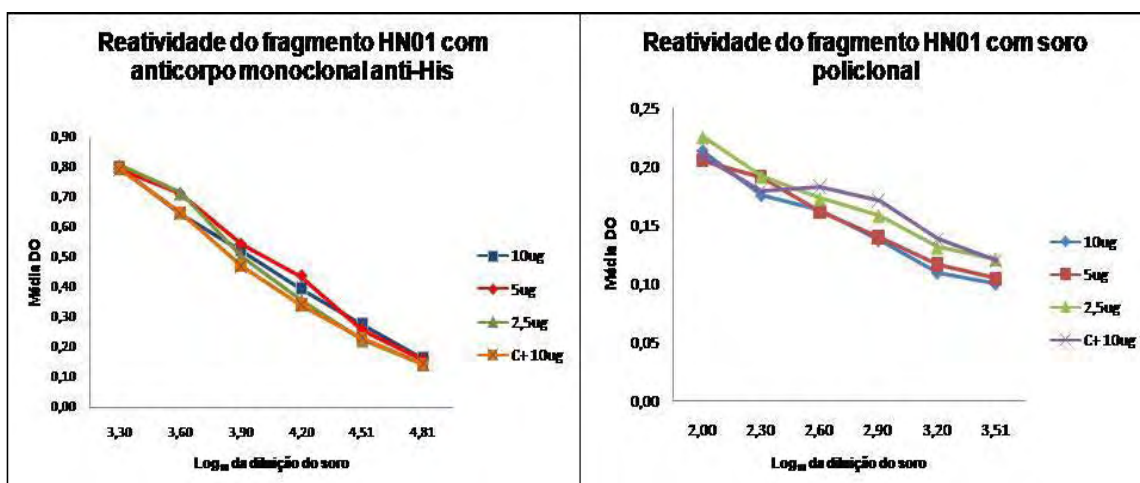


Figura 10: Representação gráfica dos resultados da titulação em bloco com soro policlonal e anticorpo monoclonal anti-histidina, onde foi adsorvido o antígeno denominado HN01 nas concentrações de 2,5, 5 e 10ug/mL.

Foram realizados testes visando a melhora da reatividade do fragmento recombinante através da solubilização com tampões contendo mercaptoetanol e hidrocloreto de guanidina, bem como métodos físicos como fervura, visando a desnaturação total do peptídeo recombinante e exposição do epítipo previamente relatado como específico para o VDN. Contudo, não foi observada melhora na reatividade, sendo esta inclusive, muitas vezes superada pela fração C+, mostrando que a reatividade foi totalmente direcionada às etiquetas expressas juntamente com o fragmento de interesse.

Tal evento foi previsto por KAPCZUNSKI (2010) ao utilizar este peptídeo para imunização de camundongos e produção de anticorpos monoclonais pela técnica de hidridoma. A ligação do peptídeo a um carreador é imprescindível, pois pela sua pequena extensão, ele podia não se mostrar imunogênico o suficiente para gerar uma eficiente população de linfócitos ou esplenócitos que seriam fundidos com células tumorais. Porém, tais carreadores não poderiam mascarar a sequência de aminoácidos de interesse, direcionando a resposta imunológica para si. Com isso, ele utilizou um 'crosslinker' que permitiu introduzir dentro da molécula um espaço de tamanho suficiente para prevenir que a proteína carreadora mascarasse a molécula de peptídeo. O glutaraldeído foi utilizado neste estudo, e as proteínas carreadoras foram soro albumina bovina (BSA), ovoalbumina (OVA), tireoglobulina humana, entre outras.

Em suma, ficou evidenciado que a nossa tentativa de adaptação da substituição da metodologia utilizada da geração de peptídeos sintéticos quimicamente ligados a proteínas carreadoras, pelo sistema de expressão *E. coli* + pET SUMO (Invitrogen) não permitiu a geração de um antígeno adequado à adsorção em microplacas de ELISA e utilização como ferramenta para detecção do VDN.

Em razão disso, buscou-se a produção de antígenos recombinantes contemplando frações maiores da proteína HN, visando conseguir detectar a reatividade de anticorpos para a maior parte dos epítipos da proteína HN e viabilizar a sua utilização no imunodiagnóstico do VDN.

5.3.2 Expressão dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal do VDN

Duas porções da glicoproteína HN foram expressas no sistema *E. coli*, utilizando o vetor pET SUMO (Invitrogen). O fragmento HN N-terminal contendo os primeiros 1050 nucleotídeos do gene codificador da proteína HN (350 resíduos de aminoácidos), e o fragmento HN C-terminal com os 693 nucleotídeos restantes desse mesmo gene (231 resíduos de aminoácidos).

5.3.2.1 Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores

Para se obter um melhor resultado na amplificação e confirmar da temperatura adequada para o pareamento dos oligonucleotídeos, foi realizado através do Termociclador MJ RESEARCH®, um gradiente com as seguintes temperaturas: 50,0°C; 50,4°C; 51,2 °C; 52,3°C; 53,9°C; 56°C; 58,3°C; 60,3°C; 61,9 °C; 62,9°C; 63,7°C e 64°C, para o fragmento N-terminal. Para o fragmento C-terminal, as temperaturas testadas foram: 53,0°C; 53,3°C; 54,1 °C; 55,0°C; 56,4°C; 58,2°C; 60,2°C; 61,9°C; 63,2 °C; 64,1°C; 64,8°C e 65°C. Entre estas, as temperaturas que proporcionaram a obtenção de produtos amplificados de maior qualidade e isentos da presença de produtos inespecíficos foram 50°C para o fragmento HN N-terminal e 55°C para o fragmento HN C-terminal. Dessa forma foi escolhida a temperatura de pareamento que proporcionou a amplificação dos fragmentos de interesse a partir do gene HN do VDN com os tamanhos esperados de 1050 e 693 pb (Figuras 11 e 12).

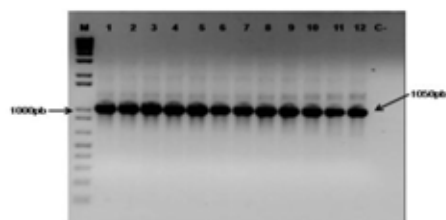


Figura 11: Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao fragmento HN N-terminal em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1)50°C, (2)50,4°C, (3)51,2°C, (4)52,3°C, (5)53,9°C, (6)56°C, (7)58,3°C, (8)60,3°C, (9)61,9°C, (10)62,9°C, (11)63,7°C, (12)64°C, Controle negativo da reação.

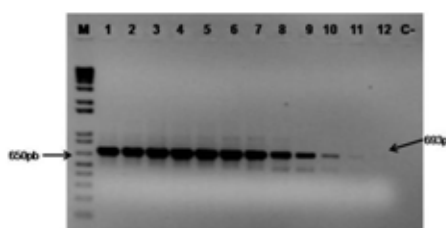


Figura 12: Eletroferograma da amplificação do inserto correspondente ao fragmento HN C-terminal em gradiente de temperaturas. Colunas: (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (1) 53°C, (2)53,3°C, (3)54,1°C, (4)55°C, (5)56,4°C, (6)58,2°C, (7)60,2°C, (8) 61,9°C, (9)63,2°C, (10)64,1°C, (11)64,8°C, (12)65°C, Controle negativo da reação.

5.3.2.2 Amplificação dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal

Após a otimização das temperaturas ideais para amplificação através da realização dos gradientes de temperatura e estabelecimento das temperaturas de 50°C e 55°C para amplificação dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal, estes foram novamente amplificados a partir do RNA viral para produção de uma quantidade de produto de PCR adequada para a realização da reação de ligação ao vetor pET SUMO (Invitrogen) e posterior transformação em células adequadas à clonagem de plasmídeos *E. coli* DH10b (figura 13).

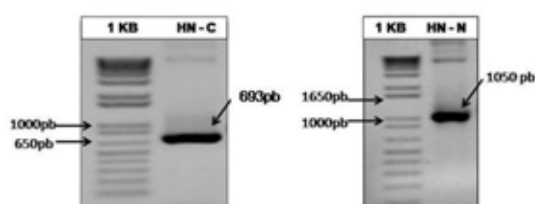


Figura 13: Eletroferograma da amplificação dos fragmentos HN C-terminal e HN N-terminal da glicoproteína HN.

5.3.2.3 Análise dos clones transformantes

Para verificação da inserção dos fragmentos gênicos HN N-terminal e HN C-terminal, bem como a correta orientação destes, foi realizada inicialmente a reação de PCR com jogo de oligonucleotídeos a partir do DNA plasmidial extraído dos clones transformantes, seguida pela análise eletroforética em gel de agarose (figuras 14 e 15). Com isso, foram escolhidos aleatoriamente três clones, sendo dois correspondentes ao fragmento HN N-terminal e um do fragmento C-terminal. Para a verificação da presença do inserto foi realizada a reação de PCR com os oligonucleotídeos da cada inserto (quadro 01), e para verificar a correta orientação destes, foram realizadas as reações de PCR utilizando o oligonucleotídeo direto do inserto e o oligonucleotídeo reverso do vetor (IV) e/ou o oligonucleotídeo direto do vetor com o reverso do inserto (VI).

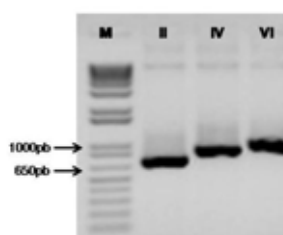


Figura 14. Eletroferograma da análise do clone transformante C7 pela técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (II) amplificação do fragmento utilizando os oligonucleotídeos direto e reverso do inserto com 692pb, (IV) amplificação utilizando os oligonucleotídeo direto do inserto e reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen) com 841pb, (VI) amplificação utilizando os oligonucleotídeos direto do vetor pET SUMO (Invitrogen) e o reverso do inserto com 946pb.

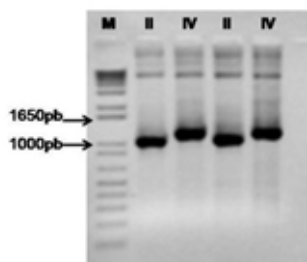


Figura 15. Eletroferograma da análise dos clones transformantes A3 e B10 pela técnica de PCR com jogo de oligonucleotídeos. Colunas: (M) 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (II) amplificação do fragmento utilizando os oligonucleotídeos direto e reverso do inserto com 1050pb, (IV) amplificação utilizando os oligonucleotídeos direto do inserto e reverso do vetor pET SUMO (Invitrogen) com 1200pb.

Após a reação de ligação dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal do gene HN do VDN ao vetor pET SUMO (Invitrogen), foi realizada a transformação de células adequadas à expressão das proteínas recombinantes, tendo sido escolhida a linhagem *E. coli* ER2566.

Para a realização de ligação foi realizada a amplificação dos fragmentos à partir do DNA plasmidial extraído dos clones previamente analisados e identificados como portadores dos insertos, bem como da correta orientação de inserção destes (figura 16).

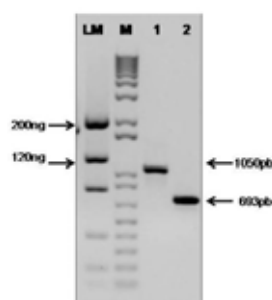


Figura 16. Eletroferograma da análise dos fragmentos amplificados para ligação no vetor pET SUMO. Colunas: (LM) Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), (M) 1Kb plus DNA Ladder, (1) Inserto correspondente ao fragmento N-terminal do gene da glicoproteína HN, (2) Inserto correspondente ao fragmento C-terminal do gene da glicoproteína HN.

Foram colhidos 48 clones transformantes da linhagem *E. coli* ER2566, que cresceram no meio seletivo contendo kanamicina. Quatro desses clones

transformantes foram então selecionados para a análise da presença do vetor contendo o inserto HN N-terminal e HN C-terminal, por meio da detecção dos produtos amplificados na PCR com a combinação de iniciadores específicos para o gene de interesse ou para o vetor pET SUMO (Invitrogen) em amostras do DNA plasmidial extraídas desses mesmos clones. Para todos os clones testados, foi verificado que, na reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores flanqueando os fragmentos gênicos de interesse, houve a amplificação e geração de um fragmento com o tamanho esperado. Além disso, houve amplificação em cada uma das combinações (II, IV) nos tamanhos esperados. Tal análise prévia serviu para selecionar clones adequados a serem submetidos ao seqüenciamento de nucleotídeos e posterior indução da expressão das proteínas recombinantes.

5.3.2.4 Sequenciamento de nucleotídeos dos insertos nos clones bacterianos transformantes selecionados

Com o produto obtido a partir da extração do DNA plasmidial dos clones F7 (contendo o inserto HN N-terminal) e G3 (contendo o fragmento HN C-terminal) realizou-se o seqüenciamento de nucleotídeos dos insertos. Para a análise das seqüências utilizou-se o programa "BLAST 2 sequences" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) , onde foi possível constatar a homologia de 100% existente entre a seqüência de nucleotídeos da proteína HN da estirpe LaSota com o inserto HN C-terminal e similaridade de 100% para o inserto HN N-terminal em comparação com a proteína HN da estirpe La Sota do VDN (Figuras 17 e 18). Na verdade essa análise demonstrou que a identidade da seqüência de nucleotídeos desses clones transformante variou de um máximo de 100%, obtido com relação ao gene HN da estirpes LaSota do VDN, a um mínimo de 87% de identidade, que foi obtido na comparação com algumas seqüências do gene HN oriundas de isolados de aves silvestres. Foram também encontradas escores de 100% de identidade com relação ao gene HN da estirpe B1 do VDN. Tal estirpe caracteriza-se por também ser utilizada na forma atenuada como

vacina, e demonstra identidade também na sequência de nucleotídeos da glicoproteína HN.

Além disso, a análise pelo sequenciamento de nucleotídeos mostrou que o ATG encontra-se na fase correta de leitura (“in frame”) e na posição “downstream” em relação às seqüências do gene promotor e da etiqueta SUMO-Poli-Histidina.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
F559192.1	Newcastle disease virus strain DF3Q/Beijing/08 hemagglutinin-neuraminidase	1929	1929	100%	0.0	99%
GU296152.2	Newcastle disease virus strain JL-1, complete genome	1929	1929	100%	0.0	99%
GU296151.1	Newcastle disease virus strain JL-1 hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene	1929	1929	100%	0.0	99%
Y18886.1	Newcastle disease virus cDNA to complete genomic RNA, clone 30	1929	1929	100%	0.0	99%
AC017811.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	1929	1929	100%	0.0	99%
JF950215.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	1929	1929	100%	0.0	99%
F2608159.1	Newcastle disease virus strain HQ/Liaoning/05 hemagglutinin-neuraminidase	1923	1923	100%	0.0	99%
F2600542.1	Newcastle disease virus strain HN0801 hemagglutinin-neuraminidase gene, c	1923	1923	100%	0.0	99%
GU296157.1	Newcastle disease virus isolate D58 hemagglutinin-neuraminidase protein ge	1923	1923	100%	0.0	99%
A6182641.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinine neuraminidase glycopro	1923	1923	100%	0.0	99%
GU296221.1	Newcastle disease virus isolate YC-25-07-C hemagglutinin-neuraminidase (i	1917	1917	100%	0.0	99%
GU296222.1	Newcastle disease virus isolate YC-24-07-Ch hemagglutinin-neuraminidase	1917	1917	100%	0.0	99%
GU296223.1	Newcastle disease virus isolate XZ-8-08-Ch hemagglutinin-neuraminidase (i	1917	1917	100%	0.0	99%
GU296224.1	Newcastle disease virus isolate HA-3-07-Ch hemagglutinin-neuraminidase (i	1917	1917	100%	0.0	99%
F2608152.1	Newcastle disease virus strain TYQ/Shanxi/07 hemagglutinin-neuraminidase	1917	1917	100%	0.0	99%
F2608153.1	Newcastle disease virus strain LaSota hemagglutinin-neuraminidase gene, c	1917	1917	100%	0.0	99%
A6182638.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinine neuraminidase glycopro	1917	1917	100%	0.0	99%
GU296147.1	Newcastle disease virus mRNA for hemagglutinin-neuraminidase (HN gene)	1917	1917	100%	0.0	99%
A1222115.1	Newcastle disease virus strain HB92 isolate V4, complete genome	1917	1917	100%	0.0	99%
JF735011.1	Newcastle disease virus strain HX01, complete genome	1916	1916	100%	0.0	99%
GU296224.1	Newcastle disease virus isolate YZ-27-07-Ch hemagglutinin-neuraminidase	1912	1912	100%	0.0	99%
F2608151.1	Newcastle disease virus strain sparrow/Guangxi/HN10/07 nucleocapsid prote	1912	1912	100%	0.0	99%
F2608150.1	Newcastle disease virus strain KQ/Liaoning/06 hemagglutinin-neuraminidase	1912	1912	100%	0.0	99%
GU296150.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	1912	1912	100%	0.0	99%
GU296220.1	Newcastle disease virus isolate XZ-33-07-Ch hemagglutinin-neuraminidase	1906	1906	100%	0.0	99%
GU296229.1	Newcastle disease virus isolate XZ-30-07-Ch hemagglutinin-neuraminidase	1906	1906	100%	0.0	99%

Figura 17. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as seqüências de nucleotídeos seqüenciados do clone F7 de *E.coli* transformado pelo vetor pET SUMO – Fragmento HN N-terminal da estirpe LaSota do, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores identidade máxima com relação às seqüências do gene HN da estirpe La Sota do VDN.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Overlappage	E value	Max idn
EU729729.1	Newcastle disease virus strain VG/GA clone 3, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729728.1	Newcastle disease virus strain VG/GA, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus B1, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
U17197.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
NC01081.1	Newcastle disease virus B1/47 hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729729.1	Synthetic construct isolate rNDV/F3aa/2seg-SAKS-S spike S, M protein (M), F	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729728.1	Synthetic construct isolate rNDV/F3aa/2seg dsRed protein (dsRed), H protein	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus B1/47 isolate Takaaki, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus strain HET53 hemagglutinin-neuraminidase protein N	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) mRNA, complete	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 626 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 625 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 624 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 599 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 671 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate 472 fusion protein gene, partial cds; hemaggl	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus turkey/USA/VGGA/89 fusion protein and hemagglut	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
U17193.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729729.1	Newcastle disease virus strain B1 isolate Namakhal HN protein (HN) gene, co	1122	1122	99%	0.0	99%
EU729729.1	Newcastle disease virus isolate XZ-30-07-Ch haemagglutinin-neuraminidase	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729729.1	Newcastle disease virus strain JL-1, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
EU729729.1	Newcastle disease virus strain JL-1 hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinin-neuraminidase glycopro	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus HN gene for hemagglutinin-neuraminidase glycopro	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus cDNA to complete genome RNA, clone 30	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) mRNA, complete	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate VC-28-07-C haemagglutinin-neuraminidase (H	1122	1122	100%	0.0	99%
AF792419.1	Newcastle disease virus isolate VC-24-07-Ch haemagglutinin-neuraminidase	1122	1122	100%	0.0	99%

Figura 18. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos seqüenciados do clone G3 de *E.coli* transformado pelo vetor pET SUMO – Fragmento HN C-terminal da estirpe LaSota do, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores identidade máxima com relação às sequências do gene HN das estirpes La Sota e B1 do VDN.

5.3.2.5 Indução da expressão das proteínas recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal

A produção de altos níveis de proteínas recombinantes depende de muitos fatores. Os principais estão relacionados com a escolha do sistema de expressão, que afeta tanto o processo de produção, quanto o rendimento do produto, além de questões relacionadas ao custo e tempo de produção (MAKRIDES, 1996).

O sistema para a produção de proteínas heterólogas recombinantes em *Escherichia coli*, tem sido o mais utilizado para essa finalidade, em razão desse micro-organismo depois de transformado, continuar apresentando um rápido crescimento em cultura, e por se adequar a uma manipulação relativamente mais simples do que ocorre com outros sistemas de clonagem e expressão (TSUMOTO *et al.*, 2003; SINGH & PANDA, 2005). Em adição a isso, a genética da *E. coli* é bem conhecida, e há disponibilidade de um número cada vez maior de vetores de

clonagem e linhagens mutantes para esse micro-organismo (BANEYX, 1999). Todas essas características tornam o sistema de expressão em *E. coli* um dos mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, que não necessitam de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, para que a proteína exerça sua função biológica específica (SINGH & PANDA, 2005).

Dessa forma, ao se reunir todas as informações das análises dos clones transformantes pela técnica de PCR realizada com a combinação de oligonucleotídeos iniciadores do inserto e do vetor, com o resultado do seqüenciamento de nucleotídeos do DNA plasmidial desses mesmos clones, constatou-se que os clones F7 e G3 estavam adequados para a indução da expressão das proteínas recombinantes.

Todos os procedimentos de aplicação das proteínas recombinantes obtidas após a indução da expressão gênica foram realizados utilizando-se apenas a fração solúvel obtida após a lise das células. Isto porque, a principal característica do vetor pET SUMO (Invitrogen) é aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes produzidas, propriedade esta que foi também verificada também por ZUO et al., (2005) que obtiveram maior quantidade de proteínas na fração solúvel do que na fração insolúvel para o mesmo sistema hospedeiro de clonagem e expressão da NP de um coronavírus.

Os produtos obtidos da purificação em resina de Níquel-Agarose foram quantificados pelo método de BRADFORD, sendo obtida uma concentração média de proteína purificada de 0,35mg/mL.

5.3.2.6 Análise por SDS-Page e Western blot das proteínas produzidas

Os dois clones (F7 e G3) que foram selecionados e cultivados para a indução da expressão dos insertos gênicos HN N-terminal e HN C-terminal, após a adição de IPTG, na concentração de 0,5 mM, produziram em seus extratos solúveis as proteínas HN N-terminal e HN C-terminal, nos tamanhos esperados,

de aproximadamente 54 kDa e 38kDa, respectivamente, sendo 15kDa correspondentes ao polipeptídeo SUMO junto com a Poli-Histidina.

Esta análise foi realizada pelas técnicas de SDS-Page e 'western blot' (figura 19) utilizando, para a detecção da última, anticorpo monoclonal anti-histidina ou soro policlonal de aves hiperimunizadas contra o VDN.

A análise por 'western blot' utilizando anticorpos monoclonais anti-histidina e conjugado anti-IgG de camundongo como sistema de detecção permitiu a confirmação da expressão das proteínas recombinantes nos tamanhos esperados, demonstrando o sucesso na construção dos clones recombinantes.

Os testes incluíram a adição de extrato bruto da cultura de *E. coli* ER2566 onde não foi adicionado IPTG, ou seja, uma fração não induzida. Ainda, com o objetivo de suprimir dúvidas e de permitir que fosse identificada com mais certeza a expressão e reatividade das proteínas recombinantes foi utilizada a aplicação de um extrato controle que consistiu em clones de *E. coli* ER2566 transformados apenas com o vetor pET SUMO (Invitrogen) e submetidas ao protocolo de indução da expressão (C+) na absorção da reatividade inespecífica do soro policlonal e conjugado anti-IgG da galinha, através da adição de 10% em volume na diluição deste.

As proteínas recombinantes obtidas em nosso estudo, por meio de clonagem e expressão no sistema pET SUMO - *E. coli* e que foram, posteriormente, purificadas em resina de Níquel-Agarose, demonstraram a capacidade de se combinar de forma específica com anticorpos de aves hiperimunizadas com a estirpe LaSota do VDN, sugerindo que a integridade antigênica foi mantida nessas proteínas recombinantes e ainda que elas preservaram os principais epítomos demonstrados pela proteína nativa do VDN. Dessa forma, pode-se considerar que as proteínas HN N-terminal e HN C-terminal do VDN aqui produzidas têm atributos satisfatórios para serem produzidas em larga escala a fim de serem aplicadas em técnicas de imunodiagnóstico para o VDN. Com relação a este mesmo soro, verifica-se que houve a marcação de bandas na fração não induzida da cultura devido muito provavelmente à presença

de anticorpos contra antígenos de *E. coli* no soro de aves hiperimunizadas com o VDN, o qual foi usado, na técnica de “western-blot”, como fonte de anticorpos policlonais contra os principais componentes antigênicos do VDN.

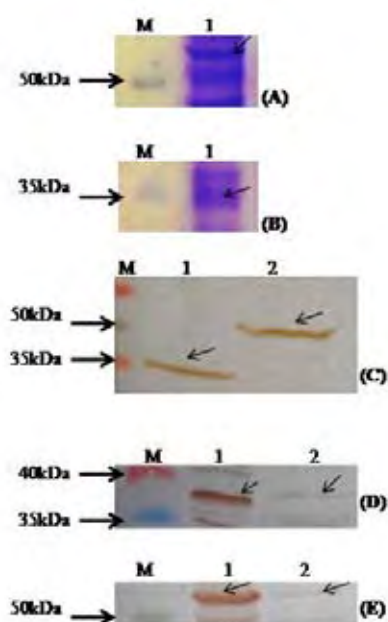


Figura 19. Análise por SDS Page e Western blot dos fragmentos HN N-terminal e HN C-terminal expresso no sistema *E. coli* com o vetor pET SUMO. (A) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. Colunas: (M) marcado de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN C-terminal. (B) Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue. Colunas: (M) marcado de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN N-terminal. (C) Avaliação da reatividade dos fragmentos recombinantes com anticorpo monoclonal anti-histidina . Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) fragmento HN C-terminal, (2) fragmento HN N-terminal. (D) Avaliação da reatividade do fragmento recombinante HN C-terminal com soro policlonal. Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) Fração bruta do lisado celular, (2) fração purificada do lisado celular solúvel. (E) Avaliação da reatividade do fragmento recombinante HN N-terminal com soro policlonal. Colunas: (M) marcador de tamanho molecular (Fermentas), (1) Fração bruta do lisado celular, (2) fração purificada do lisado celular solúvel.

5.3.2.7 Desenvolvimento de um método indireto de ELISA com as proteínas recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal

Os resultados da mensuração de anticorpos contra o VDN obtidos nos testes de HI e ELISA têm sido constantemente avaliados e correlacionados no sorodiagnóstico da DN, tendo ficado evidente, na maioria dos estudos, valores moderados a elevados de correlação, sensibilidade e especificidade (BROWN, 1990; CZIFRA et al., 1998).

Dada a antigenicidade previamente constatada dos fragmentos obtidos, tanto com anticorpos monoclonais quanto com soro policlonal, os polipeptídeos foram avaliados pela técnica de ELISA para viabilizar sua aplicação no imunodiagnóstico.

Inicialmente foi realizada a titulação de ambos os antígenos utilizando soros de referência positivo e negativo. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 20.

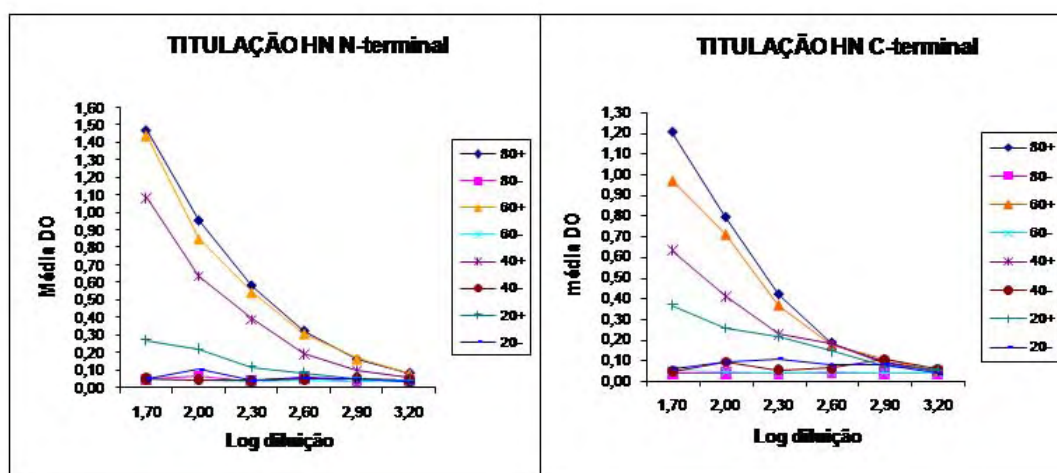


Figura 20. Representação gráfica da titulação dos antígenos HN N-terminal e HN C-terminal pela técnica de ELISA, adsorvidos na microplaca nas concentrações de 80, 40, 20 e 10ug/mL, e utilizando-se soros de referência positivo e negativo diluídos de 1:50 até 1:1600.

Os testes ELISA HN N-terminal e ELISA HN C-terminal foram padronizados a partir de uma titulação em bloco, colocando-se para reagir as concentrações de 80, 60, 40 e 20ug/mL das proteínas recombinantes, previamente adsorvidas às cavidades da microplaca com diferentes diluições dos soros de galinha positivo e negativo de referência para o VDN, abrangendo desde a diluição 1:50 até 1: 1600.

Verificou-se que os resultados, mensurados como densidades ópticas (DOs) apresentaram uma variação do tipo dose-resposta, isso significa que foram maiores, para as maiores concentrações das proteínas recombinantes, utilizadas como antígenos, sendo que este ensaio imunoenzimático permitiu de forma clara e segura a distinção entre os soros de referência positivo e negativo.

Em face desses resultados foram definidas as condições ideais de realização dos testes ELISA HN-Indireto, as quais corresponderam a uma concentração de 40ug/mL de cada proteína recombinante, como antígeno a ser adsorvido à fase sólida da reação e a diluição única de 1:50 dos soros de galinhas.

Ainda, a análise de 20 amostras de soros de aves do controle negativo (SPF) revelou ponto de corte em valor A/P de 0,136 para o teste ELISA HN C-terminal e 0,72 para o teste ELISA HN N-terminal (média do valor A/P + 3x desvio padrão).

Após a titulação e otimização das condições ideais para aplicação das proteínas recombinantes no imunodiagnóstico da DN, foram testadas 329 amostras de aves de postura e também de corte para avaliação dos parâmetros de especificidade, sensibilidade e acurácia, fornecidos no teste de ELISA HN-Indireto utilizando os antígenos recombinantes. Além disso, foi analisada a correlação dos resultados obtidos com as mesmas amostras testadas pelo método padrão de HI e também por um Sanduiche ELISA Indireto utilizando concanavalina A.

5.3.2.8 Relações entre os resultados do ELISA HN N-terminal e ELISA HN C-terminal e os testes sorológicos de referência HI e S-ELISA-ConA

Os resultados obtidos no teste HI, tido como padrão-ouro para a detecção e/ou mensuração de anticorpos contra o VDN, mostraram que as aves de postura produziram quantidades relevantes de anticorpos após as imunizações contra o VDN. Todos os testes realizados detectaram no soro sanguíneo das aves de postura níveis de anticorpos anti-VDN variando de moderado a elevado. Isso ocorreu, principalmente, devido ao fato de terem sido testadas amostras obtidas de aves que haviam recebido quatro doses de vacinas atenuadas contra o VDN o que pode ser considerado um protocolo de indução de hiperimunização, a qual em condições experimentais levou a produção de altos títulos de anticorpos contra o VDN o que é importante para a indústria avícola por garantir altos títulos de anticorpos maternos nos pintinhos (VILLEGAS & AVELLANEDA,1992).

Paralelamente à aplicação dos ensaios imunoenzimáticos na sorologia da DN, torna-se fundamental a determinação de pontos de corte adequados para o estabelecimento de índices de sensibilidade e especificidade do teste (GREINER et al., 1995). A determinação do ponto de corte baseou-se na média acrescida de três desvios padrão, similar ao que foi realizado por SOUSA et al. (2000).

SOUSA et al. (1999) testarem soros de aves de corte vacinadas contra o VDN e ao comparar os resultados entre o Sanduíche ELISA com Duplo Anticorpo (DAS-ELISA) e HI, verificaram uma acurácia para o DAS-ELISA relativa ao teste de HI de 88,8%, ligeiramente superior à verificada no presente estudo na comparação com o teste ELISA HN N-terminal (88,45%) e inferior à verificada em comparação com o teste ELISA HN C-terminal (96,05%). Porém uma especificidade de 100% foi constatada, o mesmo índice obtido na comparação com o teste ELISA HN C-terminal com o HI. E a sensibilidade de 88,80%, encontrada por SOUSA et al. (1999) foi superior ao índice obtido pelo ELISA HN N-terminal (84,07%) e inferior ao ELISA HN N-terminal (94,25%) em relação ao HI.

Ademais, em um outro trabalho de SOUSA (2000), quando o ponto de corte do ELISA foi determinado por análise do programa TGROC e não se baseou na média acrescida de três desvios padrão, tal como foi realizado no presente estudo, foram observados resultados um pouco melhores de sensibilidade relativa do ELISA frente ao HI (90,91%), mas a especificidade relativa sofreu um ligeiro decréscimo para 91,18% e, ainda, o nível de acurácia entre os dois testes foi de 91,02%, e os valores preditivos positivo e negativo foram de 93,02% e 88,57%, respectivamente.

Ainda em relação aos resultados da análise comparativa entre os testes sorológicos de ELISA HN N-terminal e ELISA HN C-terminal com o HI, verifica-se que os ELISAs desenvolvidos nesse estudo demonstraram uma ótima concordância com o teste de HI. (Tabela 3). A propósito, CZIFRA et al. (1998) relataram uma menor concordância ($k = 0,67$) entre o método competitivo de bloqueio de ELISA e o HI, assim como BROWN et al.(1990), KOCH et al. (1998), na análise de soros de galinhas e SOUSA et al. (2000), na análise de soros de ratitas, encontraram valores inferiores ($k = 0,84$; $k = 0,85$ e $k = 0,82$).

Tabela 01.

Valores de soros concordantes e discordantes positivos e negativos no teste ELISA HN N-terminal em relação aos testes HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A.

	HI			Sanduíche-ELISA-Indireto Conc A		
	+	-	Total	+	-	Total
ELISA HN N- terminal						
+	190	2	192	191	0	213
-	36	101	137	26	112	116
Total	226	103	329	217	112	329

Tabela 02.

Valores de soros concordantes e discordantes positivos e negativos no teste ELISA HN C-terminal em relação aos testes HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A

	HI			Sanduíche-ELISA-Indireto Conc A		
	+	-	Total	+	-	Total
ELISA HN C-terminal						
+	213	0	213	209	4	213
-	13	103	116	8	108	116
Total	226	103	329	217	112	329

Tabela 03.

Valores concordantes positivos e negativos para os antígenos nos testes ELISA C-terminal e ELISA N-terminal.

	ELISA HN N-terminal		
	+	-	Total
ELISA HN C-terminal			
+	190	23	213
-	2	114	116
Total	192	137	329

Tabela 04.

Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia dos ensaios de ELISA C-terminal e ELISA N-terminal usando o teste HI e Sanduíche-ELISA-Indireto Concanavalina A como referenciais.

	ELISA HN N-terminal		ELISA HN C-terminal	
	HI	S-ELISA-Conc A	HI	S-ELISA-Conc A
Sensibilidade	84,1%	88%	94,2%	96,3%
Especificidade	98,1%	100%	100%	96,4%
Acurácia	88,4%	92,1	96,0%	96,4%
Valor Kappa	0,75	0,83	0,91	0,92
Índice de Correlação (r)	0,74	0,78	0,81	0,87

Sabe-se que testes sorológicos baseados em proteínas recombinantes podem apresentar alta sensibilidade e especificidade quando o antígeno alvo é imuno-dominante e desprovido de qualquer molécula não-específica presente na preparação de cultivos celulares. Proteínas de nucleocapsídeo expressas em baculovírus têm sido usadas como antígenos em diferentes métodos de ELISA para a detecção de anticorpos contra o vírus do sarampo, o vírus da peste bovina, o vírus da estomatite vesicular, e o VDN (ERRINGTON et al., 1995, MAKKAY et al., 1999). MAKKAY et al. (1999) fizeram a clonagem e produziram a proteína NP da estirpe Hitchner B1 do VDN em um sistema baculovírus de expressão sendo a proteína recombinante obtida utilizada no desenvolvimento de um método de ELISA que proporcionou um índice de sensibilidade de 94,8% e especificidade de 100% em relação a um kit comercial de ELISA. MOHAN et al. (2006) desenvolveram um teste de ELISA baseado na adsorção de um antígeno recombinante de 27kDa da glicoproteína HN, expresso em sistema bacteriano e obteve índices de sensibilidade de 95,3% e especificidade de 94,3% em comparação ao teste padrão HI.

O sistema de expressão procarioto adotado neste estudo apresenta vantagens significativas que incluem o baixo custo e a facilidade e rapidez de cultivo de *E. coli*, em relação a sistemas de expressão em eucariotos. Porém, o conhecimento sobre as propriedades imunológicas das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* ainda é limitado. Os sítios antigênicos da glicoproteína HN mostram necessidades específicas com relação a dobramentos e glicosilação da molécula, indicando a importância primária de modificações pós traducionais para a formação de sítios antigênicos adequados, o que pode ter sido comprometido neste sistema de expressão (NIISHIKAWA et al., 1986). Além disso, em estudos anteriores, as proteínas HN recombinantes produzidas foram submetidas a tratamentos com fortes agentes desnaturantes, como uréia e Triton-X, pois as proteínas produzidas foram incluídas em corpúsculos de inclusão, o que pode ter comprometido ainda mais as propriedades antigênicas das proteínas recombinantes. O sistema de expressão *E. coli* ER 2566 utilizando o vetor de

expressão pET SUMO (Invitrogen), aqui adotado permitiu a recuperação dos antígenos a partir da fração solúvel da cultura, sem necessidade de tratamentos de solubilização.

Estudos prévios elucidaram a existência de quatro sítios antigênicos na seqüência de aminoácidos da glicoproteína HN, utilizando anticorpos monoclonais, sendo estes localizados nos resíduos 193 a 201, 345 a 353, 513 a 521, além de 494 a 569 (IORIO et al., 1991). Os antígenos produzidos neste estudo incluíram a porção N-terminal contendo os dois primeiros sítios antigênicos e a porção C-terminal com os dois últimos sítios. A região 345 a 353, contida no fragmento N-terminal, está localizada na região mais hidrofílica da molécula e é provavelmente o domínio imunodominante em HN (IORIO et al., 1991).

No entanto, o ELISA HN C-terminal apresentou os melhores índices de sensibilidade e especificidade em comparação ao teste padrão HI, e ao teste Sanduíche ELISA-indireto ConA, sendo 94,25% e 96,31% de sensibilidade e 100% e 96,43% de especificidade. Ao contrário o ELISA HN N-terminal mostrou o menor índice de sensibilidade obtido em comparação ao teste HI, de 84,07% mas apresentou 88% de sensibilidade em comparação do S-ELISA-ConA. A especificidade obtida na comparação do método de ELISA HN N-terminal foi de 98,06% e 100%, respectivamente, em comparação ao teste de HI e S-ELISA-ConA. Essa menor especificidade do ELISA utilizando como antígeno a porção N-terminal da proteína HN pode justificar-se por ela incluir regiões altamente conservadas entre os paramixovírus. Estudos anteriores relataram que os resíduos 193 a 201 e 234 a 239 mostram significativo grau de conservação, sendo os resíduos 195, 196, 198 e 199 quase completamente conservados neste mesmo grupo.

Os coeficientes de correlação obtidos nos métodos de ELISA HN N-terminal e no ELISA HN C-terminal em comparação ao teste HI foram de 74% e 81%, respectivamente e na comparação com o teste Sanduíche ELISA-Indireto ConA, foram de 78% e 87% respectivamente (figura 21). Os maiores coeficientes de correlação obtidos entre o ELISA HN C-terminal e os títulos de HI são uma boa

indicação de que ambos os testes detectam tendências similares na formação de anticorpos por aves expostas ao VDN. Contudo, como o método de S-ELISA-ConA é mais sensível que o teste HI e tem a habilidade de detectar anticorpos em amostras de campo que não são detectáveis pelo teste HI, e ele proporcionou um coeficiente de correlação mais elevado quando foi usado na comparação com o método de ELISA HN C-terminal, tal como havia sido observado por MOHAN et al., (2006). O teste ELISA HN C-terminal oferece ainda a vantagem de maior sensibilidade, o que é especialmente importante na detecção da resposta imune mais precoce que ocorre após a infecção ou imunização pelo VDN. Dessa forma, os resultados gerados pelo método de ELISA HN C-terminal possibilitam uma vigilância ativa mais eficiente dos plantéis avícolas industriais, bem como uma melhor avaliação da imunidade pós vacinal desses mesmos tipos de aves (OLIVEIRA et al., 2007).

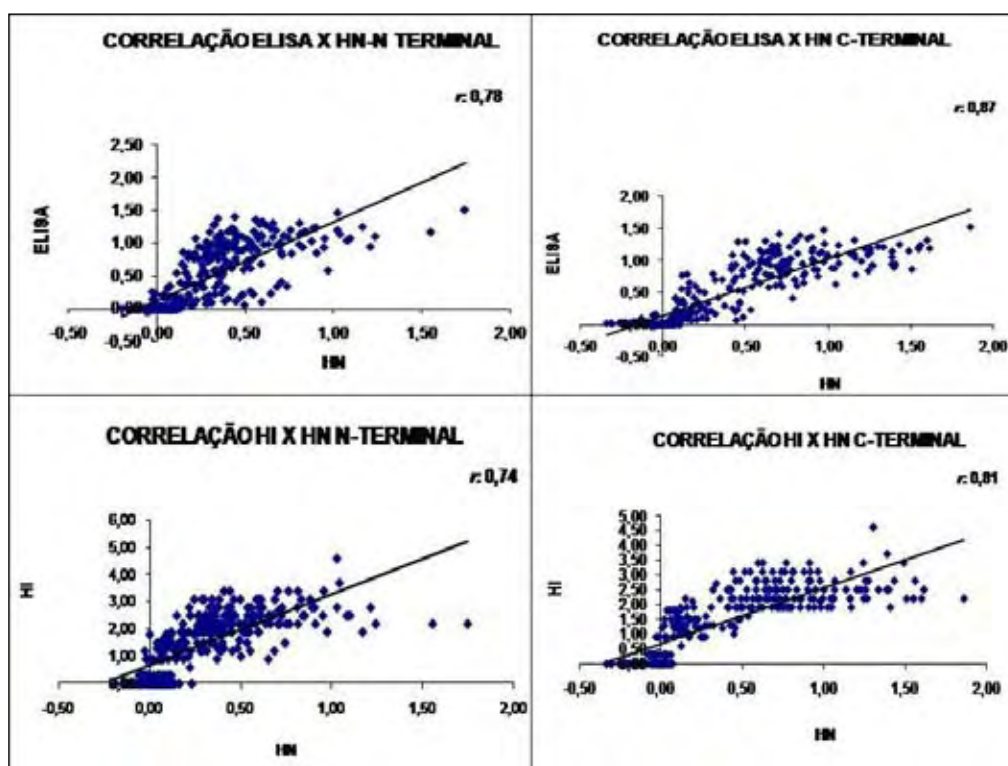


Figura 21: Avaliação da correlação entre os testes de ELISA indireto utilizando os antígenos recombinantes HN N-terminal e HN C-terminal produzidos no sistema *E. coli*, com os ensaios de ELISA ConA e HI.

Com isso, o ELISA baseado em um antígeno recombinante da porção C-terminal da glicoproteína HN, e no uso de uma única diluição dos soros testes que foi desenvolvido neste estudo demonstrou ser sensível, específico e acurado quando comparado com o teste sorológico padrão, o HI e também a uma técnica de maior sensibilidade como o S-ELISA-ConA, demonstrando vantagens relevantes sobre outros métodos de sorodiagnóstico da DN.

5.3.2.9 Produção de soros de cabras hiperimunizadas com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal

Além da aplicação no teste de ELISA indireto, que mostrou resultados satisfatórios, os antígenos foram utilizados para imunização de cabras, visando a obtenção de um anti-soro hiperimune que poderá ser utilizado em teste de ELISA no formato competitivo, o que permitirá a aplicação dos antígenos para imodiagnóstico de outras aves, cujos, conjugados comerciais não se encontram disponíveis, impedindo sua avaliação pela técnica de ELISA.

A imunização de duas cabras foi realizada em intervalos de 15 dias, sendo a primeira imunização realizada com 100ug de cada proteína acrescida de adjuvante completo de Freund. Cada antígeno foi previamente purificado e analisado por SDS-PAGE e 'western blot' (figura 22). As três imunizações posteriores foram realizadas com 50 ug de cada proteína, acrescida de adjuvante incompleto de Freund.

Os 4 soros obtidos ao final de 45 dias foram titulados pela técnica de ELISA conforme mostrado nas figura 22.

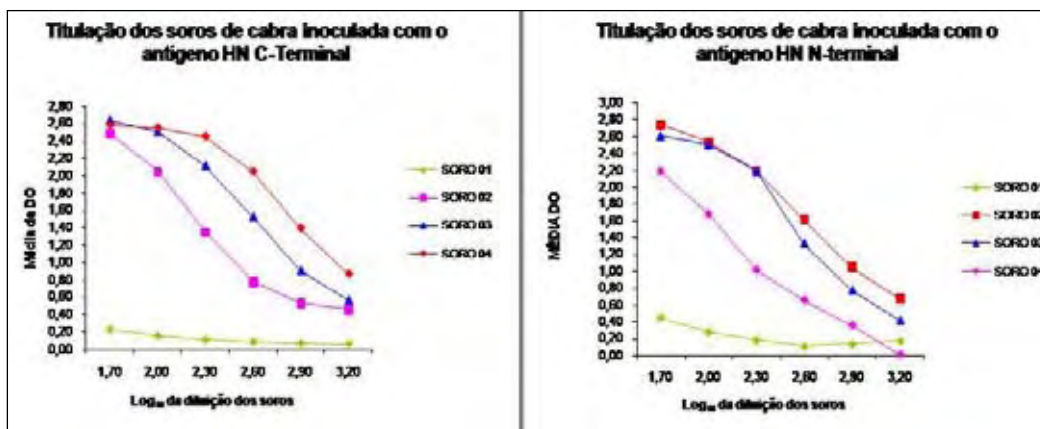


Figura 22. Representação gráfica da titulação em bloco realizada com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal para avaliação da reatividade dos soros de cabra que foram inoculadas com os mesmos antígenos. O soro 01 refere-se ao controle negativo, colhido antes da primeira inoculação. O soro 2 refere-se ao material colhido após 15 dias da primeira inoculação. O soro 03 refere-se ao material colhido após 15 dias da segunda inoculação e o soro 04 após a terceira inoculação.

A análise da titulação permitiu concluir que as inoculações consecutivas permitiram um aumento gradual no título de anticorpos anti-HN N-terminal e anti HN C-terminal até a terceira inoculação. Nota-se pelos gráficos que após dois reforços o título de anticorpos atinge os níveis máximos em cada animal, onde posteriores inoculações não causariam aumentos significativos na reatividade. Com isso, foi realizada apenas mais uma inoculação e posteriormente um volume de 30mL de soro de cada animal foi colhido e armazenado para posterior aplicações em ensaios sorológicos para imunodiagnóstico do VDN.

Além disso, análise por titulação em bloco permitiu mais uma avaliação dos antígenos recombinantes gerados (figura 23). Através desta técnica pode-se avaliar a homologia antigênica entre os fragmentos da glicoproteína HN expressos no sistema *E. coli* e a partícula viral íntegra do VDN. Para isso, conforme descrito anteriormente, as microplacas foram adsorvidas com LCAi diluído 1:2 e as amostras dos soros gerados após as quatro inoculações foram testadas em diluições seriadas de 1:50 a 1:1600. De posse destes resultados pode-se observar que os soros gerados pelo animal inoculado com o antígeno HN N-terminal não permitiu um reatividade coerente com a suspensão viral, denunciando que os anticorpos gerados devem ter sido direcionados para as etiquetas SUMO e poli-

histidina, e o fragmento recombinante, deve ter sido produzido de maneira não similar à estrutura da proteína HN nativa, considerando-se a ausência de modificações pós-traducionais do sistema *E. coli*. Porém, para os soros gerados pelo animal inoculado com o antígeno HN C-terminal, a reatividade foi coerente e pode-se observar inclusive, o aumento do título de anticorpos específicos contra o VDN ao longo das sucessivas inoculações. Assim o soro do animal após as quatro inoculações mostrou as maiores DOs para o VDN em todas as diluições. Pode-se observar que o sistema *E. coli*, mesmo não tendo eficiência em modificações pós-traducionais, permitiu a geração de um antígeno com homologia antigênica à glicoproteína HN, e principalmente cuja reatividade não foi totalmente direcionada às etiquetas do vetor de expressão.

Isto evidencia a geração de uma importante ferramenta para o imunodiagnóstico do VDN que poderá ser aplicado em testes sorológicos para detecção do vírus, bem como ensaios sorológicos competitivos.

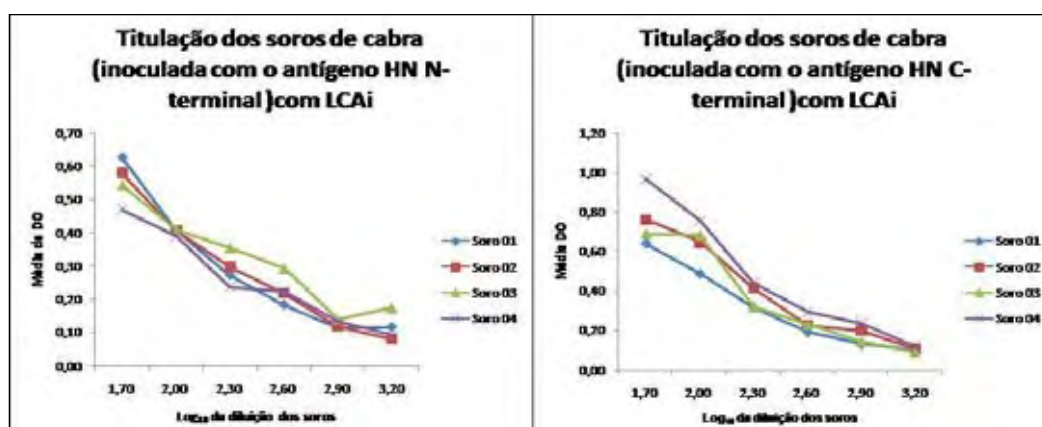


Figura 23. Representação gráfica da titulação em bloco realizada com LCAi adsorvido às microplacasa para avaliação da reatividade dos soros de cabra que foram inoculadas com os antígenos HN N-terminal e HN C-terminal. O soro 01 refere-se material colhido após 15 dias da primeira inoculação. O soro 02 refere-se ao material colhido após 15 dias da segunda inoculação, o soro 03 após a terceira inoculação e o soro 04 após a quarta inoculação.

VI. CONCLUSÕES

6.1. A clonagem e expressão do gene HN no sistema *S. cerevisiae* – pYES 2.1 TOPO (Invitrogen) gera um grande número de clones contendo o inserto, que avaliado por sequenciamento, revela altos níveis de similaridade com o gene HN da estirpe La Sota do VDN. No entanto, a indução, em pequena escala, da expressão dessa proteína recombinante não leva à produção de níveis significativos da proteína recombinante, o que pode ser inerente à sequência gênica da proteína.

6.2. A produção do antígeno HN01 no sistema *E. coli* – pET SUMO (Invitrogen), embora gere níveis satisfatórios do peptídeo recombinante não se mostra eficaz na aplicação em um ensaio sorológico do tipo ELISA Indireto.

6.3. O sistema de expressão constituído pelo vetor pET-SUMO (Invitrogen) e *Escherichia coli* demonstra sua eficiência para a clonagem e a expressão de níveis relevantes das proteínas HN N-terminal e HN C-terminal da estirpe LaSota do VDN e estas demonstram por análise imunoquímica, a antigenicidade similar à proteína HN da estirpe La Sota do VDN.

6.4. Os ensaios ELISA HN N-terminal e ELISA HN C-terminal desenvolvidos com os fragmentos gerados no sistema *E. coli* – pET SUMO (Invitrogen) são capazes de detectar e mensurar com eficiência os anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em soros de galinhas de postura ou de frangos de corte, obtidos em diferentes faixas etárias e frequências de vacinação contra esse vírus, o que fica caracterizado pelo coeficiente de correlação, e pelos níveis de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância, em relação ao teste padrão HI, e ao teste S-ELISA-ConA. Neste contexto, o ELISA HN C-terminal é o mais eficiente levando a inferir também sobre o bom potencial de utilização deste teste para o sorodiagnóstico ou para o monitoramento da infecção com o VDN nos

plantéis avícolas, considerando sua maior especificidade e possibilidade de avaliar, de forma mais rápida e prática, um maior número de amostras séricas.

VII. REFERÊNCIAS

ADAIR, B. M.; et al. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. **18**, p. 175-92, 1989.

AHMAD, D. S.; et al. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. **Virology**, New York, v. 192, n. 1, p. 207-216, 1993.

ALAMARES, J.G.; LI, J.; IORIO, R.M. Monoclonal antibody routinely used to identify avirulent strains of Newcastle disease virus binds to an epitope at the carboxy terminus of the hemagglutinin-neuraminidase protein and recognizes individual mesogenic and velogenic strains. **J. Clin. Microb.**, v.43, p. 4229-4233, 2005.

ALDOUS E.W.; ALEXANDER D.J. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, p. 117–128, 2001.

ALDOUS E.W.; et al. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Vet. Microbiol.**, v. 80, p. 201–212, 2000.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G; MARSHALL, R. Infection of fowls with Newcastle Disease Virus by food contaminated with pigeons faeces. **Vet. Record.**, Huntingdon, v. 115, p. 601-602, 1984.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease vírus – an avian paramyxovirus. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic. p. 11- 22, 1988

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Hofstad, M. S.; Barnes, H. J.; Calnek, B. W.; Reid, W. M.; Yoder, H. N. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 496-519, 1991.

ALEXANDER, D.J. HOFSTAD, M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YODER, H.N, Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 541-569, 1997.

ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J.; In: ALEXANDER, D.J. Proceedings of the joint eighth annual meetings of the national Newcastle disease and avian influenza laboratories of countries of the European union. Italy, 2002.

ALEXANDER D.J. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections: Newcastle disease. In: **Dis. of Poultry**, Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, USA, 64–87, 2003.

ARAÚJO F. A. A. et al. Inquérito sorológico em aves migratórias and residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental and outros vírus. **Bol. Elet. Epid.** 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim_eletronico_02_ano04.pdf Acesso em dezembro de 2010.

ALEXANDER, D.J., BELL, J.G., ALDERS, R.G. **Thecnol. Review: Newcastle Disease**. Roma, FAO. p161, 2004

ALEXANDER, D.J. Doença de Newcastle. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P (Orgs). **Patol. Aviária**, São Paulo: Editora Manole Ltda. P. 219-228, 2009.

ARNS, C. W. et. al Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Ed UFSM, p 659-687, 2007

AZAD, A.A.; McKERN, N.M.; MACREADIE, I.G.; FAILLA, P.; HEINE, H.G.; CHAPMAN, A.; WARD, C.W.; FAHEY, K.J. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. **Vaccine**, v.9, p. 715-722, 1991.

BACK, A. **Manual de doenças das aves**. Ed. Coluna do saber, Cascavel, PR, p. 222, 2004.

BAIM, S.B.; PIETRA, S.D.F.; EUSTICE, P.C.; SHERMAN, F. A mutation allowing an mRNA secondary structure diminishes translation of *Saccharomyces cerevisiae* iso-I-cytochrome. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 1839-1846, 1985.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BEARD, C. W. Velogenic Newcastle disease. **USDA, ARS, Southeast Poultry Research Laboratory**. Athens, GA. 2008. Disponível em http://www.vet.uga.edu/VPP_gray_book_02/fod/vnd.php Acesso em maio de 2010.

BEARD, C.W., HANSON, R.P. Newcastle disease. In: HOTSTAD, M.S.; et al (ed.), **Dis. of Poultry**, 8^o ed Ames: Iowa State University Press, Ames, p. 452–470, 1984.

BENNETZEN, J.L.; HALL, B.D. Codon selection in yeast. **J. Biol. Chem.** v. 257, p. 3026-3031, 1982.

BOURSNELL, M. E. G. et al. Insertion of the fusion gene from NDV into a non-essential region in the terminal repeats of fowpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 621-628, 1990

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Brasília, 52p, 2007.

BRENTANO, L.; et al. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas em matrizes de corte no Brasil. **Rev. Bras. De Ciên. Avícola**, v.2, n.2, p. 157-179, 2000.

BRONZONI, R.V.M.; MONTASSIER, M.F.S.; PEREIRA, G.T.; GAMA, N.M.S.Q.; SAKAI, V.; MONTASSIER, J.J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a ConcanavalinA-Sanduiche-ELISA. **Viral. Immunol.**, v.18, p. 569-578, 2005.

BROWN, J; RESURRECCION, R. S.; DICKSON, T.G. The relationship between the hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. **Avian Dis.** v. 34, p.585-587, 1990.

CAMENISCH, G.; BANDLI, R.; HOOP, R. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR. **J. Wildlife Disease**, V. 44, n. 3, p. 772-776, 2008.

CHEN, H.; COOTE, B.; HISCOX, J. A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon v. 32, n. 5, p. 519-526, 2003.

CLAVIJO, A.; ROBINSON, Y., BOOTH, T.; MUNROE, F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa. v.41, p.404-406, 2000.

CORREA, O. Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos. **Viroses dos Animais**. Rio de Janeiro. v.3, p.88-99, 1970

COSSET, F. et al. Newcastle disease virus (NDV) vaccine based on immunization with avian cells expressing the NDV hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. **Viol.**, v.185, p. 862-866, 1991.

CREELAN J.L., GRAHAM D.A.; MCCULLOUGH S.J. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 31, p. 493–499, 2002.

CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. Isolamento e identificação do vírus da doença de Newcastle no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Med. Vet.**, Rio de Janeiro. v.23, p.17-33, 1955.

CZIFRA, G.; et al. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 25, p. 691-703, 1996.

CZIFRA, G. et al. Detection of NDV- specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens. **Avian Pathology**. Huntingdon, v. 27, p. 526-565, 1998.

DOMINGO, E. Quasispecies Theory in Virology. **J. of Virology**. v.76, p 463-465, 2002

EDBAUER, C.; WEINBERG, R.; TAYLOR, J.; SENELONGE, A.R.; BOUQUET, J.F.; DESMETTRE, P. ; POLETTI, E. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. **Viol.** , v.179, p. 901-904, 1990.

ERRINGTON, W.; STEWARD, M.; EMMERSON, P.T. A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. **J. of Virol. Methods**, Amsterdam, v.55, n.3 p. 357-365, 1995.

HECKERT, R.A. et al. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle Disease Virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. **Avian Dis.**, v.40, p. 770-777, 1995.

GIBERTONI, A.M.; GONÇALVES, M.C.M.; MONTASSIER, M.F.S.; FERNANDES, C.C.; MONTASSIER, H.J. Clonagem, expressão e caracterização da nucleoproteína recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, p. 1-9, 2010.

GIBERTONI, A.M. et al. Development and Application of a *Saccharomyces cerevisiae*-Expressed Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against Infectious Bronchitis Virus. **J. of Clin. Microb.**, Washington, v. 43, n.4, p. 1982-1984, 2005.

GOHM, D.S.; THUR, B.; HOFMANN, M.A. Detection of Newcastle disease virus in

organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, p. 143-152, 2000.

GRAVEL, K.A.; MCGINNIS, L.W.; REITTER, J.; MORRISON, T.G. The transmembrane domain sequence affects the structure and function of the Newcastle disease virus fusion protein. **J. Virol.**, v.85, p. 3486-3497, 1990.

GREINER, M; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of sero-diagnostic tests. **J. of Immunol. Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v.166, p. 557-580, 1983.

HANSON, R. P.; BRANDLY, C. A. Identification of vaccine strain of Newcastle disease virus. **Science**, vol 122, p. 156-157, 1955.

HERNÁNDEZ, M. S.; et al. Pesquisa serologica sobre el virus de la enfermedad de Newcastle em obreros avícolas y um grupo control. **Rev. Cubana de Hig. e Epid.**, v.25, n.1, p. 77-84, 1987.

HOCHULI, E.; PIESECKI, S. Interaction of hexahistidine fusion proteins with nitrilotriacetic acid-chelated Ni^{2+} ions. **Methods**. v.4, p. 68-72, 1992.

HOEKEMA, A.; KASTELEIN, R.A.; VASSER, M.; BOER, H. Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. **Mol Cel. Biol.**, v. 7, p. 2914-2924, 1987.

HUANG, Z.; et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. **J. of Virology**. v.78, n.8, p.4176-4184, 2004.

HUMMEL, K.B.; ERDMAN, D.; HEATH, J.; BELLINI, W. J. Baculovirus expression of the nucleoprotein gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2874-2880, 1992.

ICTV – The International Committee on Taxonomy of viruses. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>>. Acesso em janeiro de 2011.

IORIO, R.M.; SYDDALL, R.J.; SHEEHAN, J.P.; BRATT, M.A.; GLICKMAN, R.L.; RIEL, A.M. Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. **J. Virol**. v. 65, p. 4999-5006, 1991.

IRITANI, Y.; AOYAMA, S.; TAKIGAMI, S.; HAYASHI, Y.; OGAWA, R.; YANAGIDA, N.; SAEKI, S.; KAMOGAWA, K. Antibody response to Newcastle disease vírus (NDV) of recombinant fowlpox vírus (FPV) expressing a hemagglutinin-neuraminidase of NDV into chickens in the presence of antibody to NDV or FPV. **Avian Dis**. v.35, p. 659-661, 1991.

JORGE, M. A.; et al. Reação respiratória forte não é indicação de melhor resposta imune na vacinação contra a Doença de Newcastle. **Rev. Brasileira de Ciência Avícola**. v.3, p.95, 2002.

KANT, A.; et al. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 837-849, 1997.

KAPCZYNSKI, D.R. Newcastle disease virus monoclonal antibodies. In: **United States Patent**, patent n° US 7.794.714B2, 2012.

KHO, C. L.; TAN, W, S; YUSOFF, K. Production of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in *Escherichia coli* and its assembly into Ring- and nucleocapsid-like particles. **J. Microbiol.**, Korea, v. 39, n. 4, p. 293-299, 2001.

KNISKERN. P.J.; HAGOPIAN, A.; MONTGOMERY, D.L.; BURKE, P.; DUNN, N.R.; HOFMANN, K.J.; MILLER, W.J.; ELLIS, R.W. Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevesiae*. **Gene**, v. 46, p. 135-141, 1986.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T₄ bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-681, 1970.

LANCASTER, H. J. E. Newcastle disease control by vaccination. **Veterinary Bulletin**, Oxon, v. 34, n. 2, p. 57-76, 1964.

LANCASTER, J. E.; ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease: virus and spread: a review of some of the literature.** Ottawa: Departament of Agriculture, 1975.

LANCER, J.A, HOWARD, C.R.The polypeptides of infectious Bronchitis Virus (IBV-41 strain). **J. Gen Virol. Reading**, v.46, p. 349-361,1980.

LEEuw, O.; PEETERS, B; Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. **J. of General Virol.**, v.80, n.131-139, 1999

LIMA, B.D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biotec. Ciên. Desen.**, v. 23, p. 28-31, 2001.

LINDE, G. A.; GRANSTROM, M.; ORVELL, C. Immunoglobulin class and Immunoglobulin G subclass enzymelinked immunosorbent assays compared with microneutralization assay for serodiagnosis of mumps infection and determination of immunity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, n. 9, p. 1653-1658, 1987.

LOA, C. C. et al., Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

LOKE, C.F. et al. Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. **Veter. Immunol. Immunopat.**, v. 106, p. 259-267, 2005.

MAKKAY, A. M.; KRELL P.J.; NAGY E. Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. **Vet Microbiol.**, v. 66, p. 209-222, 1998.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **American Society of Microbiol.** V. 60(3), p. 512-538, 1996.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático**. São Paulo. p.132-133, 1999.

McNULTY, M. S.; ADAÍR, B. M.; O'LOAN, C. J.; ALLAN, G. M. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. **Avian Pathology**, n. 17, p. 509-513, 1988.

MERZ, D. V.; SCHEID, A. S.; CHOPPIN, P.W. Immunological Studies of the Functions of Paramyxovirus Glycoproteins. **Virology**, V. 109, p 94-96, 1981.

MIERS, L.A.; BANKOWSKI, R.A.; ZEE, Y.C. Optimizing the Enzyme-linked Immunosorbent Assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. **Avian Dis.**, v.27, p.1112-1125, 1994.

MIRZA, A.M.; DENG, R.; IORIO, R.M. Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein effects on antigenic structure and function. **J. Virol.**, v. 68, p. 5093-3099, 1994.

MOHAN, C.M.; DEY, S.; RAI, A.; KATARIA, J.M. Recombinant haemagglutinin-neuraminidase antigen-based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling of Newcastle disease virus. **J. Virol. Method.**, v. 138, p. 117-122, 2006.

NAGY, E.; DERBYSHIRE, J.B.; DOBOS, P.; KRELL, P.J. Cloning and expression on NDV hemagglutinin-neuraminidase cDNA in a baculovirus expression vector-system. **Virol.** v. 176, p. 426-438, 1990.

NDIFUNA, A.; WATERS, A. K.; ZHOU, M.; COLLISSON, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 37-44, 1998.

NISHIKAWA, K.; MORISHIMA, R.; TOYODA, R.; MIYADAI, R.; YOKOCHI, R.; YOSHIDA, R.; NAGAI, T. Topological and operational delineation of antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus and their structural requirements. **J. Virol.** v.60, p. 987-993, 1986.

NISHINO, Y.; NIKURA, M.; SUWA, T.; ONUMA, M.; GOTOH, B.; NAGAI, Y.; MIKAMI, T. Analysis of the protective effect of the haemagglutinin-neuraminidase protein in Newcastle disease virus infection. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 1187-1190, 1991.

NISHIZAWA, M.; et al. Newcastle disease in pekin ducks : response to experimental vaccination and challenge. **Rev. Brasileira de Ciên. Avícola/ Brazilian J. of Poultry Science**, v.09, p.123-125, 2007.

NUNES, J. E. S.; et al. Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina do vírus da Doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.**, v.54, 2002.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. (OIE). Newcastle Disease, In: Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines. 2008. Disponível em: [#Sec8](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_59.HTM) Acesso em novembro de 2009.

OLIVEIRA, D.D.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; FLATSCHART, R.B.; RESENDE, J.S. Elisa indireto para detecção de IgG antivírus da doença de Newcastle em soro de codorna. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p. 1344-1347, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G. et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no estado do Rio de Janeiro. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 33, n.2, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G. et al. Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (Neta SP) no Rio de Janeiro. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 35, n.4, 2005.

ONG, H.K.A.; ALI, A.M.; OMAR, A.R.; YUSOFF, K. Cloning and expression of the HN gene from the velogenic viscerotropic Newcastle disease virus strain AF2240 in Sf9 insect cells. **Cytotechnology**, v. 32, p. 243-251, 2000.

ORSI, M. A. L. et al. Prevalence of NDV in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Brazilian J. of Microbiol.** 41:349-357, 2010.

PAULILLO, A.C.; JÚNIOR, L.D. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA. p.267-276, 2009.

PHAM, H. M.; et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strain in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method. **Arch. of Virology**, Austria, v. 149, p. 1559-1569, 2004.

PHAM, H. M.; et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, p. 1646-1650, 2005.

PRABAKARAN, M.; et al. Development of epitope-clocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. **Plos One**, v. 4, n. 2, 2009.

PEEPLES, M. E. Newcastle disease virus replication. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle Disease**, Ed Baston: Kluwer Academic Publishers, p 45-78, 1988.

PEETERS, B. P. H.; et al. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Vaccine**. V. 19, 1616-1627, 2001

PEIRIS, J.S.M.; JONG, M.D.; GUAN, Y. Avian Influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 20, n. 2, p. 243-267, 2007.

PERALES, C. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **J. Mol. Bio.**, V. 345, p. 451-459, 2005.

REID-SANDEN, F.L.; et al. Rabies diagnostic reagentes prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus (published erratum appears in) **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 5, p. 858-863, 1990.

RICTHZENHAIN, J. L.; et al. Relation between the hemagglutination inhibition test and indirect ELISA in serologic monitoring of laying Hens submitted to different sytems of vaccination against Newcastle disease. **Rev. Microbiol.**, Sao Paulo, v.24, p.187-91, 1993.

RIVETZ, B.; et al. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. **Avian Dis.** Kennet Square, v 29, p.929-942, 1985.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v.8, p. 423-488, 1992.

ROWE, T.; ABERNATHY, R.A.; PRIMMER, J.H.; THOMPSON, W.W.; LU, X.; LIM, W.; FUKUDA, K.; COX, N.J.; KATZ, J.M. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. **J. of Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 4, p. 937-943, 1999.

SAMSON, A. C. R. Virus structure. In: ALEXANDER, D. J., ed. **Newcastle Disease**. Boston: Kluwer Academic, p.23-44, 1988.

SANTOS, J. A. A ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). **Rev. de Prod. Animal**, v. 1, n. 1, p. 5 -12, 1954.

SEAL, B.; et al. Phylogenic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **J. Clin. Microbiol.**, Washington v. 36, p.1141-5, 1998.

SEAL, B. S; KING, D. J; SELLERS, H.S. The avian response to Newcastle disease virus. **Developmental & Immunology**, v. 24, p. 257-268, 2000.

SICK, H. **Ornitol. Brasileira**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. p.118, 2001.

SILVA, J. S. A. et al. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) captured in poultry farms of agreste region of the State of Pernambuco. **Rev. Bras. de Ciên. Avícolas**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, K.R., et al. Estudo comparativo entre os testes de HI e o ELISA-lectina para a detecção de anticorpos contra o VDN em frangos de corte vacinados. **Rev. Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.88, 2009.

SINGH, S.M., PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **J. of Biosc.and Bioengineering** 99(4): 303-310, 2005.

SNOECK C. J., et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strain Identified in non-comercial farms. **Arch. Virol.**, DOI: 10.1007/s00705-008-0269-5, 2008.

SOUSA, R. L. M., et al. Comparison between the Indirect ELISA, Sandwich ELISA and Hemagglutination Inhibition Test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus. **Rev. Bras. de Ciênc. Avícolas / Brazilian J. of Poultry Science**, Brasil, v. 01, n. 01, p. 43-47, 1999.

SOUSA, R. L. M. Avaliação do estado imune humoral de emas (*Rhea americana*) e avestruzes (*Struthio camelus*) frente ao vírus da doença de Newcastle através do método de bloqueio em fase líquida do ELISA. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – **Universidade de São Paulo**, São Paulo, SP. 78 p, 2000.

TAYLOR, J.; et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowpox virus recombinant confers protection in chickens. **J. Virol.**, v. 64, 1990

THAYER, S. G.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Comparasion of two commercial Enzyme-Likeed Assays and conventional methods for avian serology. **Avian Dis**, v. 31, n. 1, p. 120-124, 1986.

TOWBIN, H.T. et al. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, Washington, v. 76, n. 1, p. 4350-4354, 1979.

TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., ARAKAWA, T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312:1383-1386, 2003.

YUSOFF, K.; TAN, W.S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, p. 439-455, 2001.

VERNOERD, D. J. Ostrich diseases. **Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.**, v. 19, n.2, p. 638-661, 2000.

VIANNA, J. S. M.; et al. Identificação e caracterização biomolecular do vírus da doença de Newcastle pela técnica de RT-PCR. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 22, n. 4, 2000.

VILLEGAS, P.; AVELLANEDA, G. Interpretacion de resultados serológicos em bronquitis infecciosa. **Avicultura Professional**, v.10, n.1, 1992.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals**: biochemistry and biotechnology. London: Wiley, p. 94, 1998.

WEICKERT, M.J.; DOHERTY, D.H.; BEST, E.A.; OLINS, P.O. Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli. **Current Opin. Biotechnol.**, v.7, p. 494-499, 1996.

WILSON, R.A., et al. **An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens**, 1984.

ZOTH, S.C.; GOMEZ, E.; CARBALLEDA, J.M.; CARRILLO, E.; BERINSTEIN, A. Expression of a secreted version of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus its evaluation as a diagnostic reagent. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 23, p. 519-523, 2011.

ZUO, X., et al. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. Elsevier. **Prot. Expr. & Purif.** Amsterdam, v. 42, p. 100-110, 2005