

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE  
JABOTICABAL**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA DO  
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EM SISTEMAS  
HOSPEDEIROS EUCARIOTO (*Pichia pastoris*) E PROCARIOTO  
(*Escherichia coli*)**

**Aliandra Maura Gibertoni**  
Biomédica

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA DO  
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EM SISTEMAS  
HOSPEDEIROS EUCARIOTO (*Pichia pastoris*) E PROCARIOTO  
(*Escherichia coli*)**

**Aliandra Maura Gibertoni**

**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

Fevereiro – 2009

G445c Gibertoni, Aliandra Maura  
Clonagem e expressão do gene da nucleoproteína do vírus da  
bronquite infecciosa em sistemas hospedeiros eucarioto (*Pichia  
pastoris*) e procarioto (*Escherichia coli*) / Aliandra Maura Gibertoni. – –  
Jaboticabal, 2009  
xiii, 129 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Hélio José Montassier

Banca examinadora: Ricardo Luiz Moro de Souza, José Moacir  
Marin, Eduardo Hilário, Maria da Glória Buzinaro

Bibliografia

1. Vírus da bronquite infecciosa. 2. Expressão. 3. Proteína  
recombinante. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias.

CDU 616.998.73

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**

### **ALIANDRA MAURA GIBERTONI-**

nascida em 10 de maio de 1975, em Taquaritinga, São Paulo, filha de Agide Gibertoni e Aparecida Borzi Gibertoni. Graduiu-se em Ciências Biológicas, Modalidade Médica, pela União das Faculdades Barão de Mauá, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, em julho de 1997. É reconhecido pelo Decreto Federal nº 73.894/74. Em março de 2002, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia, na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-se em agosto de 2004. Ingressou em março de 2005 no Curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária, na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-se em fevereiro de 2009.



**“Ao Poderoso Santo Expedito”**

*Ao meu marido Rogério pelo companheirismo e pelo incessante apoio e compreensão,*

*Com amor*

*DEDICO*

*Aos meus pais Aparecida e Agide (in memoriam);  
Aos meus irmãos Alessandro e Adriano;  
À minha sobrinha Maria Vitória;*

*Com carinho*

*OFEREÇO*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, na Sua Trindade Santa, Pai, Filho e Espírito Santo: “A minha vida sempre esteve nas mãos de Deus”;

À minha família, que sempre me apoiou, estimulou, incentivou e participou do aprimoramento de minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela oportunidade, confiança e credibilidade em sua orientação;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Célia Bertolini, pela atenção, e ajuda dispensada no início deste projeto;

Ao pesquisador Dr. Eduardo Hilário, pela atenção, disponibilidade e conselhos;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pela constante disponibilidade no uso das facilidades de seu laboratório;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, pela concessão do aparelho de ultrassom de seu laboratório;

Aos queridos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia (IMUNOVIR): Maria de Fátima, Maria de Lourdes, Mariana, Camila, Igor, Cíntia, Aline, Andressa, Phillip, Filipe e Kheterson, pela ajuda em diversos momentos na execução da tese e pelos momentos de alegria e descontração que dividimos;

À amiga Telma Trovó Fabiano, pela grande amizade e companheirismo;

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal, em especial, a Agda, pela ajuda prestada;

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP/Jaboticabal;

As funcionárias da Pós-Graduação da FCAV/UNESP-Jaboticabal pela atenção e ajuda durante o curso de doutorado;

À todos os colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia Agropecuária da FCAV/Unesp/Jaboticabal, em especial a secretária Edna, pelo carinho, amizade ;

Aos membros da Comissão Examinadora pela disponibilidade em participar da banca visando contribuições para este trabalho;

À Merial- Saúde Animal, pela doação de ovos embrionados SPF;

Ao auxílio financeiro da FAPESP pela bolsa de doutorado concedida, processos números- 05/54275-4 e 01/14650-3;

Ao CNPq pela concessão de parte dos recursos financeiros necessários à realização do presente projeto, processo número 477140/2003-3;

A todos aquele que de alguma forma contribuíram em mais esta importante etapa de minha vida, meu muito obrigada!

<b>SUMÁRIO</b>	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xviii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xix
<b>RESUMO</b> .....	xx
<b>SUMMARY</b> .....	xxii
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	1
1.1 Aspectos gerais da bronquite infecciosa das galinhas.....	6
1.2 Controle da BI .....	16
1.3 Sistemas de clonagem e expressão de proteínas virais recombinantes.....	18
1.4 Referências.....	21
<b>CAPÍTULO 2 – SISTEMAS HOSPEDEIROS EUCARIÓTICO (<i>Pichia pastoris</i>) E PROCARIÓTICOS (<i>Escherichia coli</i>) PARA CLONAGEM E EXPRESSÃO, DA NUCLEOCAPSÍDEO DO VIRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA</b> .....	31
2.1 Introdução.....	32
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Propagação viral e preparação do RNA.....	34
2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase-PCR.....	35
2.2.3 Clonagem do gene que codifica para a proteína N.....	36
2.2.4 Indução da expressão da proteína N recombinante nos clones recombinantes de <i>E. coli</i> .....	37
2.2.5 Expressão da proteína N recombinante nos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> .....	37
2.2.6 Lise das células e detecção da proteína.....	38
2.2.7 Purificação da proteína N recombinante em <i>E. coli</i> .....	39
2.2.8 Análise por SDS-PAGE e Western blotting.....	39
2.3.2 Indução da expressão da proteína N recombinante nos sistemas heterólogos de <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> .....	45

2.4 Conclusão.....	51
2.5 Referências.....	52
<b>CAPÍTULO 3 - APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DOS TESTES IgG / IgM-ELISA COM A NUCLEOPROTEÍNA VIRAL RECOMBINANTE.....</b>	<b>55</b>
3.1 Introdução.....	56
3.2 Material e Métodos.....	58
3.2.1 Antígeno para o ELISA (Proteína N recombinante).....	58
3.2.2 Método indireto de ELISA com a proteína N recombinante para a detecção de anticorpos Anti-VBI dos isótipos IgM e IgG (IgM / IgG - Ec-N- ELISA).....	59
3.2.3 Soros de referência anti-VBI.....	60
3.2.4 Amostras de soro de aves de corte infectadas experimentalmente com a estirpe M-41 do VBI para a determinação da cinética da produção de anticorpos anti-virais específicos dos isótipos IgG e IgM.....	60
3.2.5 Amostras séricas de campo.....	60
3.3 Resultados.....	62
3.3.1 Titulação em bloco da proteína N recombinante e dos soros...	62
3.3.2 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA-VBI para a detecção de anticorpos específicos de em aves experimentalmente infectadas....	64
3.3.3 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA-VBI para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em amostras séricas de campo.....	65
3.4 Discussão.....	67
3.5 Conclusão.....	71
3.6 Referências.....	72
<b>CAPÍTULO 4 - EXPRESSÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DA PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO RECOMBINANTE DE UM NOVO ISOLADO DE CAMPO NO BRASIL DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA.....</b>	<b>75</b>
4.1 Introdução.....	76
4.2 Material e Métodos.....	79
4.2.1. Vírus.....	79
4.2.2 Extração do RNA, RT-PCR e Clonagem do gene da nucleoproteína.....	79

4.2.3 Produção e purificação da proteína N recombinante do novo isolado de campo no Brasil (IBVPR05).....	80
4.2.4 Amostras de soros de galinha positivos e negativos para o VBI.....	81
4.2.5 Amostras de soros de aves de campo suspeitas de infecção pelo VBI.....	81
4.2.6 Método Indireto de ELISA com a Proteína N Recombinante do Novo Isolado de Campo no Brasil do VBI (Ec-Nv-ELISA).....	82
4.3 Resultados.....	84
4.3.1 Clonagem e Análise das sequencias de nucleotídeos do gene N do novo isolado de campo no Brasil do VBI.....	84
4.3.2 Expressão do gene N do novo isolado de campo no Brasil do VBI em <i>E. coli</i> (Nv).....	86
4.3.3 Padronização do ELISA Indireto com a proteína N recombinante expressa em <i>E. coli</i> (Ec-N-ELISA).....	89
4.3.4 Aplicação das proteínas N do isolado de campo variante e proteína N da estirpe M41 no método indireto de ELISA para a detecção de anticorpos anti-VBI específicos.....	91
4.3.5 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA para a detecção de anticorpos específicos em amostras de soros de aves infectadas com o VBI.....	91
4.4 Discussão.....	97
4.5 Conclusão.....	102
4.6 Referências.....	103
<b>CAPITULO - 5 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO DE AVES COM A PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO DO VIRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EXPRESSA EM <i>Escherichia coli</i></b> .....	106
5.1 Introdução.....	107
5.2 Material e Métodos.....	110
5.2.1 Antígeno recombinante.....	110
5.2.2 Desenho experimental para a imunização das aves com a proteína N recombinante.....	110
5.2.3 Detecção do VBI por RT-PCR.....	111
5.2.3.1 Extração de RNA genômico.....	111

5.2.3.2. RT-PCR.....	112
5.2.4 Avaliação da Integridade do movimento ciliar da traquéia.....	113
5.2.5 Método indireto de ELISA para a detecção do isótipo IgG de anticorpos das aves imunizadas com a proteína N recombinante.....	113
5.3 Resultados e Discussão.....	115
5.3.1 Resposta imune humoral na secreção lacrimal de aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI.....	115
5.3.2 Resposta imune humoral no soro sanguíneo de aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI.....	115
5.3.3. Avaliação da proteção traqueal em aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI.....	118
5.4 Conclusão.....	122
5.5 Referências.....	123
<b>CAPÍTULO 6 – IMPLICAÇÕES.....</b>	<b>126</b>

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa. São destacadas as proteínas estruturais; N, proteína fosforilada de nucleocapsídeo, a glicoproteína de membrana (M) a glicoproteína de superfície do envelope viral (S) e a proteína pequena de membrana (E).....	7
<b>Figura 2.</b> (A e B) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amplificação dos segmentos gênicos do gene da proteína N.....	41
<b>Figura 3.</b> Alinhamento de sequências. Alinhamento entre a sequência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína da estirpe M41 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso M28566 ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html</a> ).....	42
<b>Figura 4.</b> (A e B) Fragmentos de DNA correspondentes ao produto de amplificação do gene N das construções plasmidiais dos clones 1.1 e 2.2 de <i>E. coli</i> linhagem DH10B, com os iniciadores T7 promoter e T7 terminator do vetor pET-28a, e os iniciadores, Pet-A e Pet-B do gene N.....	43
<b>Figura 5.</b> (A e B) Fragmentos de DNA correspondentes ao produto de amplificação do gene N das construções plasmidiais dos clones A6 e D8 de <i>E. coli</i> da linhagem DH10B, com os iniciadores FLD1 e AOX 1 do vetor e os iniciadores Pic-A e Pic-B do gene N.....	44
<b>Figura 6.</b> Análise da produção da proteína N recombinante no sistema de expressão que utiliza células de <i>E. coli</i> da linhagem BL21. (A) SDS-PAGE (B) Western blotting. Foi usado o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:25000.....	46
<b>Figura 7.</b> Visualização em membrana de PVDF- Western blotting da amostra do extrato bruto da cultura de <i>E. coli</i> , após indução da expressão, em pequena escala. Foi usado o soro policlonal hiperimune anti-VBI.....	47
<b>Figura 8.</b> Análise da produção heteróloga através da técnica de SDS-PAGE (A) e Western-blotting (B) da fração bruta da proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI em <i>P. pastoris</i> , utilizando o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina.....	49

- Figura 9.** Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de soros de galinha positivos e negativos de referência para o VBI, frente a diferentes concentrações de proteína N recombinante produzida em *E. coli* da linhagem BL21 e transformados com a construção plasmidial pET28a-N-M41 para a detecção dos isótipos IgG (A) e IgM (B) de anticorpos contra o VBI..... 63
- Figura 10.** Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgG ou IgM em aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI determinada pelo IgG / IgM -Ec-N-ELISA usando a proteína N recombinante produzida em *E. coli* linhagem BL21 e transformados com a construção plasmidial pET28a-N-M41. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios  $\pm$  D.P..... 65
- Figura 11.** Amplificação dos segmentos gênicos do gene que codifica para a proteína N..... 84
- Figura 12.** Alinhamento entre a sequência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína do novo isolado de campo no Brasil IBVPR05 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso M28566 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html))..... 85
- Figura 13.** Alinhamento entre a sequência de aminoácidos da proteína N deduzida a partir da ORF completa do gene codificador dessa proteína de um novo isolado de campo no Brasil (IBVPR05) do VBI que foi clonado no vetor pGEM- T Easy com sequências de aminoácidos deduzidas dessa mesma proteína a partir dos genes codificadores correspondentes às estirpes M41, H120, TW1171, JP8443, K234-02 e CK/CHLHLJ/99I do VBI depositadas no Gene Bank e identificadas sob os números de acesso M28566, AY28296, DQ646406, AY363967, AY790352 e AY842864..... 87
- Figura 14.** Análise pela técnica de SDS-PAGE (A) e de Western-blotting (B) da fração purificada da proteína recombinante N do isolado de campo IBVPR05 produzida em *E. coli* utilizando o anticorpo monoclonal anti-polihistidina, através da técnica de cromatografia em resina “Ni-Sepharose High performance” de níquel-sepharose..... 88

- Figura 15.** Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA da proteína N recombinante produzida em *E. coli* da linhagem BL21 de um novo isolado de campo no Brasil (IBVPR05) frente a antissoros hiperimunes de galinha positivos homólogo (anti-IBVPR05)(A) e heterólogo (anti-M41) (B) e negativos para o VBI..... 90
- Figura 16.** Correlação entre os níveis de anticorpos contra o VBI (valor A/P) obtidos no Ec-Nv- ELISA e no Ec-N-M41-ELISA para o VBI..... 93
- Figura 17.** Perfis de níveis de anticorpos contra as nucleoproteínas recombinantes Nv e N-M41 determinados pelos métodos indiretos de ELISA em amostras de soros de aves de granjas comerciais em diferentes condições de infecção pelo VBI ou de vacinação contra esse mesmo vírus. (A) Aves de corte infectadas por variante do VBI e não vacinadas; (B) Aves de corte não infectadas pelo VBI e vacinadas 2 vezes..... 95
- Figura 18.** Perfis de níveis de anticorpos contra as nucleoproteínas recombinantes Nv e N-M41 determinados pelos métodos indiretos de ELISA em amostras de soros de aves de granjas comerciais em diferentes condições de infecção pelo VBI ou de vacinação contra esse mesmo vírus. (C) Aves de corte infectadas por variante do VBI e vacinadas 2 vezes e (D) Aves de Postura infectadas por variante do VBI e vacinadas mais de 2 vezes..... 96
- Figura 19.** Títulos médios de anticorpos anti-VBI em amostras de secreção lacrimal colhidas antes e depois do desafio com a estirpe virulenta do VBI, de aves imunizadas com a proteína N recombinante..... 117
- Figura 20.** Títulos médios de anticorpos anti-VBI em amostras de soro sanguíneo colhidas antes e depois do desafio com a estirpe virulenta do VBI, de aves imunizadas com a proteína N recombinante..... 118
- Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Produtos amplificados a partir da RT-PCR. M Tamanho Molecular 1kb Plus DNA Ladder..... 119

<b>LISTA DE TABELAS</b>	Página
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene N.....	35
<b>Tabela 2.</b> Composição dos grupos de aves de campo para a colheita de amostras séricas, segundo a presença de infecção pelo VBI e de uso de vacinas.....	61
<b>Tabela 3.</b> Resultados do Ec-N-ELISA para detecção de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG e IgM em amostras de soro de aves infectadas pelo VBI.....	66
<b>Tabela 4.</b> Composição dos grupos de aves de campo para a colheita de amostras séricas, segundo a presença ou não de infecção pelo VBI e de uso de vacinas.....	82
<b>Tabela 5.</b> Comparação entre os resultados do Ec-Nv-ELISA e do Ec-N-M41-ELISA para a detecção de anticorpos contra o VBI presentes no soro de galinhas.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BIG – Bronquite Infecciosa das Galinhas  
cDNA – DNA complementar  
EDTA – ethylene diamine tetracetic acid  
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
DIE – Dose Infectante Embrionária  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
d.p.i – Dia pós-infecção  
H120 – Holland 120  
HI - Inibição de Hemaglutinação  
IPTG - isopropyl-1-thio- $\beta$ -galactoside  
ICTV – International Committee for the Taxonomy of Virus  
Kb – Quilobases ou 1000 unidades de base  
kDa - Quilo daltons  
LCA – Líquido Cório Alantóide  
M41 – Massachussets 41  
ORF – “Open Reading Frame”  
pb –Pares de base  
PCR – “Polimerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase  
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride  
RNP - Ribonucleoproteína  
RNA – Ácido ribonucléico  
RT – “Reverse transcription” – Transcrição Reversa  
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase precedida da transcrição reversa  
OIE- Organização Mundial para Saúde Animal  
Tris-HCl – Trishydroxymethylaminomethane hydrochloride  
SPF - “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos  
UTR - “Untranslated region”  
VN - Vírus-Neutralização  
VBI - Vírus da Bronquite Infecciosa

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA DO VÍRUS DA  
BRONQUITE INFECCIOSA EM SISTEMAS HOSPEDEIROS EUCARIOTO  
(*Pichia pastoris*) E PROCARIOTO (*Escherichia coli*)**

**RESUMO** - Foram realizadas a clonagem e expressão do gene da nucleoproteína (N) de uma estirpe vacinal de referência M41 do vírus da bronquite infecciosa (VBI), como proteína recombinante de fusão, contendo uma cauda de poli-histidina na extremidade carboxi-terminal, em 2 sistemas hospedeiros; na levedura metilotrófica, *Pichia pastoris* e na bactéria *Escherichia coli*. A proteína N derivada de um isolado variante do VBI de surtos a campo no Brasil, também foi expressa em *E. coli*. As características bioquímicas e imunológicas de tais proteínas recombinantes, foram determinadas, tendo sido evidenciado maior eficiência de produção no sistema hospedeiro constituído por *E. coli*, comparativamente ao sistema composto por *P. pastoris*. Uma vez obtidas, caracterizadas e purificadas, através da técnica de cromatografia de afinidade em resina de níquel-sepharose, as preparações de proteína N recombinante expressas em *E. coli* e derivadas ou da estirpe de referência M41 ou do novo isolado de campo no Brasil, foram utilizadas de forma bem sucedida, como antígenos alvo de ensaios indiretos de ELISA, que foram aplicados na detecção e mensuração de anticorpos dos isótipos IgG e IgM em aves infectadas com estirpes homóloga ou variantes do VBI. Foi, também, investigada a atividade imunogênica da proteína N recombinante em aves, que depois de imunizadas e re-imunizadas com essas proteínas recombinantes, produziram no soro sanguíneo e na secreção lacrimal quantidades elevadas de anticorpos anti-VBI específicos, mas não desenvolveram proteção efetiva contra o desafio com a estirpe homóloga desse vírus. Concluindo, a proteína N recombinante do VBI expressa pela *E. coli* possui elevada imunogenicidade, no sentido de induzir altos níveis de anticorpos específicos, e reatividade cruzada com proteínas N de outras variantes desse vírus, tendo um grande potencial de ser aplicada em técnicas de imunodiagnóstico da BI.

**Palavras-chave:** Virus da bronquite infecciosa, clonagem, expressão, proteína recombinante, ELISA.

**CLONING AND EXPRESSION OF GENE THE NUCLEOCAPSID PROTEIN  
FROM INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN HOST SYSTEMS EUCARIOTIC  
*Pichia pastoris* AND PROCARIOTIC *Escherichia coli***

**SUMMARY** - Two host systems, represented by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* were used for cloning and protein expression of the nucleoprotein (N) gene of M41 strain of infectious bronchitis virus (IBV) as a fusion recombinant protein containing a poli-histidine tag. The N protein from a new variant Brazilian field isolate was also cloned and expressed by *E. coli* system. The biochemical and immunochemical properties of these recombinant N proteins were determined and higher efficiency on protein production was achieved by using the *E. coli* expression system. Both recombinant N proteins expressed by *E. coli* were purified in nickel-sepharose resin and used as antigen in indirect ELISA methods for the detection of IgG and IgM antibodies in birds infected with homologous and variant IBVs. The immunogenicity of N recombinant protein was also evaluated by immunizing and re-immunizing birds and high antibody levels were generated in lachrymal secretion and serum, but no effective protection against challenge with homologous virulent stain of IBV was induced. Concluding, the recombinant N IBV protein expressed by *E. coli* is highly immunogenic for inducing specific and cross-reactive antibodies, and can be applied in the immuno-diagnosis of IB.

**Key-words:** infectious bronchitis virus, cloning, protein expression, recombinant protein, ELISA

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), causa uma enfermidade aguda e altamente contagiosa em galinhas, afetando de forma mais acentuada os sistemas respiratório e uro-genital desses animais. A infecção pelo VBI está distribuída amplamente em várias regiões do mundo, o que faz com que este vírus se constitua em um dos mais importantes patógenos virais, cujas consequências da doença por ele produzida, trazem sérios prejuízos econômicos à atividade avícola industrial (KING & CAVANAGH, 1991).

Assim, a aplicação de método rápidos para o diagnóstico da BI, juntamente com a utilização de técnicas, objetivando a determinação do estado imune após a administração de vacinas contra essa doença infecciosa, são de enorme importância para se conseguir um controle mais efetivo de surtos da infecção pelo vírus, tanto nos matrizeiros, como nas criações de galinhas de postura e de frangos de corte. Nesse sentido e, particularmente no que concerne às ferramentas de imunodiagnóstico ou monitoramento de imunidade humoral disponíveis, os ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA), desde que executados com padrões apropriados, conseguem gerar indicadores bastante acurados dos níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou imunizadas com o VBI, facilitando, dessa forma, a avaliação do estado imune em granjas onde está sendo criado um número muito grande de aves (MARQUARDT et al, 1981; SNYDER et al., 1983).

No momento, preparações de partículas virais purificadas ainda têm sido extensivamente usadas como antígeno para a adsorção à fase sólida, particularmente nos kits comerciais de ELISA que estão disponíveis para tal finalidade. A purificação do VBI exige, por sua vez, que o vírus seja propagado em grande escala e, nesse caso, é necessário a utilização de um grande número de ovos embrionados livres de patógenos específicos ("Specific Pathogen Free" - SPF). Além disso, como o VBI contém proteínas de envelope altamente glicosiladas, os procedimentos de purificação se tornam mais complexos, demorados e onerosos e, muitas vezes, com um baixo rendimento. Sendo assim, a clonagem e a expressão do gene da proteína N do VBI pode trazer algumas

vantagens para o preparo de antígenos a serem utilizados em testes sorológicos, principalmente em razão de essa proteína ser bastante conservada, entre diferentes estirpes desse vírus, que se notabiliza por uma elevada capacidade de variação genética e antigênica (NDIFUNA et al., 1998).

O VBI é um membro da família *Coronaviridae*, sendo constituído por um genoma composto por um RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6 kb e que codifica a produção de quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007).

Foi demonstrado que a proteína N do VBI, a qual se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus. Além disso, foi constatado que essa proteína tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre importantes estirpes de referência do VBI, além de ser altamente imunogênica. Ainda, dentro desse contexto, foi verificado que essa proteína é capaz de induzir a produção de anticorpos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SEO et al., 1997). Portanto, a proteína N do VBI reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupo desse vírus (NDIFUNA et al., 1998).

Dentre os procedimentos de clonagem e expressão de gene de proteínas estruturais de vírus em geral e do VBI, em particular, constata-se que existem várias possibilidades que já foram exploradas, quer seja com o uso de sistemas de hospedeiros procariotos, como a *E. coli* (NDIFUNA et al., 1998, LOA et al., 2004), ou eucariotos, como células de insetos transfectadas com vetores de baculovírus (GUY et al., 2002; CHEN et al., 2003). No entanto, a utilização de células de levedura dos gêneros *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, como sistemas hospedeiros eucariotos para a clonagem e expressão de genes de proteínas heterólogas, embora tenham sido anteriormente acessado de forma bem sucedida para proteínas de importantes patógenos virais humanos, não foram, ou não têm sido empregados com

freqüência, para a clonagem e a expressão de proteínas derivadas da maioria dos vírus aviários.

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 e vírus da doença de Newcastle e do próprio VBI, 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; ERRINGTON et al., 1995; NDIFUNA et al., 1998; CHEN et al., 2003 ; LOA et al., 2004 ; GIBERTONI et al., 2005).

Técnicas de clonagem e expressão em procariotos como a *E. coli* e em cultivos de células eucariotas transfectadas com vetores constituídos por baculovírus ou com vetores para *S. cerevisiae* (NDIFUNA et al., 1998, CHEN et al., 2003) e infectadas com vetores virais apropriados, foram, consoante antes mencionado, usadas para a produção da proteína N das estirpes Gray, Beaudette e M41 do VBI, respectivamente. No entanto, outras estirpes importantes desse mesmo vírus, como eventuais isolados de campo de uma dada região ou país adicionado ainda da necessidade de otimização de alguns parâmetros relacionados a esses sistemas vetores - hospedeiros de clonagem e expressão de proteínas heterólogas persistem, de forma que os procedimentos propostos no presente estudo, isto é, a clonagem e a expressão do gene N desse vírus em células de *E. coli* e da levedura *P. pastoris* poderão oferecer alternativas interessantes e viáveis para a preparação, inclusive em maior escala, de uma importante proteína estrutural viral, como se configura a proteína N do VBI, e que tenha o potencial de ser utilizada na detecção e mensuração dos níveis de anticorpos produzidos em aves como resposta à infecção pelo VBI, ou na possível indução de imunidade parcial de proteção ao desafio contra esse mesmo vírus em aves.

Se por um lado os sistemas procariotos são detentores de inúmeras vantagens, com destaque para a sua maior simplicidade e grande capacidade de produção de proteínas heterólogas, podem não funcionarem apropriadamente, na dependência do tipo de proteína ser expressa e, especialmente, quando tal proteína requer

modificações pós-traducionais,. Nessas circunstâncias, os sistemas eucariotos de expressão passam a ser mais vantajosos por possuírem mecanismos intracelulares e vias biossintéticas para efetuar as modificações pós-traducionais, que existem em sistemas de expressão em eucariotos, tal como a glicosilação, a formação de pontes dissulfeto e possíveis processamentos proteolíticos pós-traducionais, os quais podem ser realizados em leveduras (TRIMBLE et al., 1991). Assim sendo, é necessário avaliar melhor a performance de cada um desses sistemas de células hospedeiras para fazer a expressão da nucleoproteína N recombinante do VBI.

O sistema de clonagem e expressão constituído pelo vetor pYES2.1/V5-His-TOPO - células da levedura *S. cerevisiae* foi usado de forma eficaz para a produção da proteína N da estirpe M41 do VBI, provando assim, ser um método alternativo excelente para a produção da proteína de nucleocapsídeo N do VBI e de sua utilização na detecção de anticorpos de galinha contra esse mesmo vírus de proteínas (GIBERTONI, et al., 2005).

Vale a pena ressaltar que nenhuma abordagem consta na literatura sobre o uso do sistema *Pichia pastoris* para a expressão da proteína N recombinante do VBI, embora ele tenha sido usado para a expressão das proteínas estruturais N e S1 do coronavírus da SARS (LIU et al., 2004, LU et al., 2006)

As leveduras da espécie *P. pastoris*, por sua vez, têm ganho cada vez mais popularidade como organismos hospedeiros para a produção, através de processos de recombinação gênica, de uma grande variedade de proteínas heterólogas, uma vez que oferece um conjunto considerável de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão gênica. Uma dessas vantagens é que esses microrganismos não produzem endotoxinas (lipopolissacárides - LPS), sendo, portanto reconhecidos como microrganismos seguros para a produção de alimentos, medicamentos ou imunobiológicos. Ademais, a produção em larga escala e o processamento de produtos derivados de bio-fermentação em *P. pastoris* são processos já bem estabelecidos e podem facilmente ser adaptados para a produção de proteínas heterólogas em maior escala (DAS & SCHULTZ, 1987, SAKAMOTO et al., 1999).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi inicialmente desenvolver e comparar dois sistemas hospedeiros heterólogos de células eucarióticas de levedura da espécie *P. pastoris*, e também de células procarióticas de *E. coli* para a expressão do gene da nucleoproteína da estirpe M41 e de uma estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, obtido a partir do produto amplificado desse mesmo gene por RT-PCR a partir do RNA genômico desse vírus, para que depois de devidamente caracterizadas bioquímica e imunoquimicamente, as preparações dessa proteína recombinante N pudessem ser aplicadas como antígenos nos ensaios de imunodiagnóstico como o ELISA e também fossem avaliadas quanto a sua atividade imunogênica em formulações de vacinas experimentais de vacinas recombinantes.

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

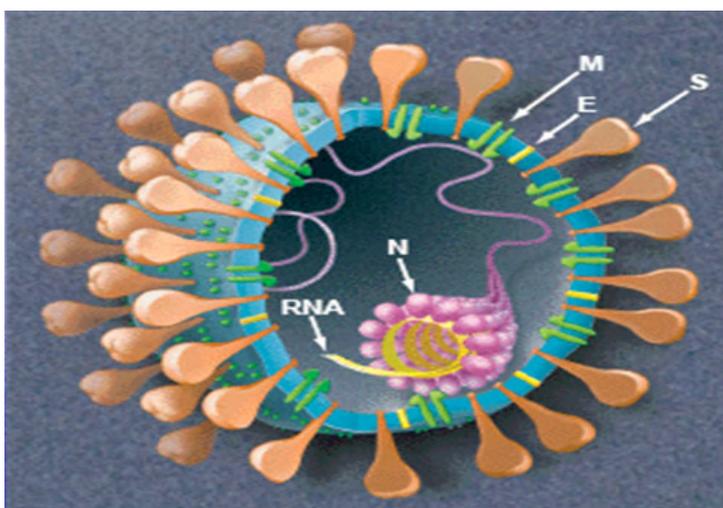
O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus de aves domésticas (espécie *Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves (CAVANAGH, 2007). A BI se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e altamente infecciosa, acompanhada, não raro, por lesões significativas dos tratos respiratório e uro-genital. Tal situação compromete de diferentes maneiras o estado sanitário das aves acometidas e facilita o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, principalmente por *Escherichia coli* e *Mycoplasma gallisepticum*, resultando, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou de aves reprodutoras.

Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com conseqüentes perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola.

O VBI, que é o agente etiológico da BI, pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus* e é o protótipo dessa família. Dentro do gênero *Coronavirus*, faz parte do grupo 3, conforme estabeleceu a classificação do ICTV (International Committee for the Taxonomy of Vírus), em 2005, a qual tomou como base as propriedades antigênicas e sorológicas, utilizando anticorpos poli e monoclonais, sendo que tais resultados foram posteriormente confirmados pelo sequenciamento genômico dos sorotipos mais relevantes desse vírus (CAVANAGH, 2005). Deve-se esclarecer, ainda, que os grupos 1, 2, e 4 incluem coronavírus de mamíferos, enquanto que o grupo 3 reúne coronavírus isolados de aves, como o VBI e outros geneticamente assemelhados a este mesmo vírus, ficando assim constituída: Coronavírus da bronquite infecciosa (VBI), Coronavírus dos perus (TCoV), Coronavírus de faisões (PhCoV), Coronavírus de gansos, Coronavírus de marrecos, Coronavírus de pombos e outros que ainda estão sendo estudados (CAVANAGH et al., 1994, 1995, CAVANAGH 2005, 2007).

As partículas do VBI são pleomórficas, com aproximadamente 120 nm de diâmetro e apresentam um envelope lipoprotéico provido de projeções bem demarcadas (espículas - glicoproteína de S) e distribuídas por toda a superfície do vírion. Tais espículas possuem cerca de 20 nm de comprimento e são responsáveis pela aparência de coroa do virion á microscopia eletrônica (BOURNELL et al., 1987).

O VBI apresenta, ainda, quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S), glicoproteína integral de membrana (M), proteína pequena de membrana (E), e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa. São destacadas as proteínas estruturais; N, proteína fosforilada de nucleocapsídeo, a glicoproteína de membrana (M) a glicoproteína de superfície do envelope viral (S) e a proteína pequena de membrana (E).

A glicoproteína peplomérica S tem cerca de 1160 resíduos de aminoácidos (174 kDa) e é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades: amino-terminal S1 (92 kDa) e carboxi-terminal S2 (84 kDa), com cerca de 500 e 600 resíduos de aminoácidos cada uma delas, respectivamente. A proteína S pode ser dimérica ou trimérica e é ancorada através da porção carboxi-terminal da subunidade S2, no envelope viral através de um pequeno segmento transmembrana hidrofóbico, formando o suporte da espícula, enquanto a subunidade S1 é globular e forma a parte do bulbo presente no ectodomínio dessa proteína (KANT et al., 1992; CAVANAGH, 2007).

A proteína de nucleocapsídeo (N) é constituída por aproximadamente 420 resíduos de aminoácidos e se localiza na parte mais interna do vírion, encontrando-se diretamente associada com o RNA genômico viral (ribonucleoproteína RNP). Além disso, foi relatado que tal proteína exerce, durante o ciclo de infecção intra-celular, um papel importante nos processos de replicação e montagem de novas partículas do VBI (COLLISON et al., 1992, SAPATS et al., 1996). Está também envolvida na indução de respostas imunes cito-mediadas de proteção, uma vez que contém em sua estrutura epítomos para a interação com células T citotóxicas específicas, as quais contribuem decisivamente para a restrição da disseminação da infecção pelo VBI dentro do organismo hospedeiro (SEO et al., 1997). Nesse sentido, os resíduos de aminoácidos presentes na porção carboxi-terminal da proteína N se revelaram críticos para a indução de células T citotóxicas efectoras contra esse patógeno viral e, em adição a isso, foram reconhecidos outros importantes epítomos dessa mesma proteína para a interação com o MHC de classe II e com os linfócitos T auxiliares (BOOTS et al., 1991).

Duas outras proteínas estruturais foram também descritas e caracterizadas, como é o caso da glicoproteína de membrana (M) e da proteína não glicosilada de membrana (E). Assim, foi constatado que todos os coronavírus possuem um grande número de cópias de uma pequena glicoproteína integrada à membrana, a proteína M, com aproximadamente 230 resíduos de aminoácidos. Além dela, foi detectada, de forma associada ao envelope viral, uma baixa quantidade de uma outra proteína de massa molecular pequena, com cerca de 100 resíduos de aminoácidos e não glicosilada; a proteína de membrana E. Essas duas proteínas adicionais de envelope (M

e E) revelaram ser importantes para formação da partícula viral, tendo sido demonstrado que a proteína S interage, durante a montagem de novos vírions, com a região transmembrana da proteína M (LAI & CAVANAGH, 1997).

As proteínas M e N contêm, via de regra, epítomos mais conservados, os quais constituem os antígenos grupo-específicos do VBI. Embora tenha sido evidenciado que a proteína N apresente composição de aminoácidos bastante conservada dentro de um dado sorogrupo desse vírus, ela pode apresentar variabilidade relativamente elevada entre estirpes ou isolados pertencentes a diferentes sorogrupos de coronavírus. Nesse sentido, foram encontradas modificações significativas, tanto no que concerne ao tamanho como a composição de resíduos de aminoácidos dessa proteína quando se comparou o gene codificador da proteína N dos principais sorogrupos desse mesmo vírus (WILLIAMS et al., 1992).

O VBI foi o primeiro coronavírus a ser completamente sequenciado. O seu genoma é um dos maiores entre os RNA-vírus e tem cerca de 27,6 Kb de comprimento sendo constituído por uma molécula de RNA, não segmentado, de fita simples e sentido positivo (RNA genômico tem a função de RNA mensageiro, é infectante). É organizado em 6 regiões principais, cada uma delas contendo uma ou mais fases de leitura ("open reading frames" - ORF's), as quais são separadas por sequências intergênicas (IG) que possuem sinais para a transcrição de RNAs mensageiros subgenômicos específicos (LAI & CAVANAGH, 1997).

Os principais genes se distribuem no genoma do VBI, sendo que estão organizados da extremidade 5' para a 3', da seguinte maneira: (1-) gene codificador da RNA Polimerase, ocupando quase 2/3 de todo o genoma viral e com duas ORF's (ORF1a e ORF1b) sobrepostas; (2-) gene codificador da glicoproteína S (gene 2); (3-) gene codificador da proteína E (gene 3); que é constituído por três ORF's, as quais codificam as proteínas 3a, 3b e 3c, onde 3c, sendo que esta última é a proteína E; (4-) gene codificador da glicoproteína M (gene 4); (5-) gene 5, que é a região codificadora de duas proteínas não estruturais; a 5a e a 5b e, finalmente, (6-) gene codificador da nucleoproteína N (gene 6). Ainda, junto a cada uma das extremidades 5' e 3'

encontram-se duas sequências não traduzidas (“Untranslated region” – UTR) com cerca de 500 nucleotídeos cada uma delas (LAI & CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2007).

A replicação do VBI ocorre inicialmente nas células ciliadas da mucosa das vias aéreas superiores e em células secretoras de muco, embora na continuidade do processo infeccioso células epiteliais de outros órgãos poderão ser infectadas (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). O vírus adere e funde-se através da proteína S1 aos receptores específicos da membrana citoplasmática das células alvo. O ciclo de replicação ocorre inteiramente no citoplasma das células hospedeiras infectadas. Nesse processo, o RNA genômico se liga aos ribossomos para sintetizar a enzima RNA polimerase-RNA dependente, sendo que o RNA genômico é transcrito especificamente por esta enzima para formar uma fita negativa de RNA complementar. A fita negativa de RNA serve como molde para a síntese de um novo RNA genômico e dos RNAs mensageiros subgenômicos (RNArng). Os RNArng são produzidos por um dos mecanismos de transcrição descontínuo (“leader-priming”), os quais passam a funcionar como replicons e podem gerar genomas recombinantes. A produção de tais RNAs se constitui em uma das características marcantes da família *Coronaviridae* (LAI & CAVANAGH, 1997).

A tradução de cada RNAm vírus específico produz apenas um peptídeo que é codificado no final 5' do RNAm. A proteína de nucleocapsídeo (N) e as proteínas não estruturais são sintetizadas em polissomos na matriz citoplasmática. A síntese das glicoproteínas S e M ocorre em polissomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A glicoproteína S é inserida co-traducionalmente para o interior das membranas do RER e aí ocorre a glicosilação na cadeia crescente de polipeptídeo. A proteína S é então transportada do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática e cerca de dois a três glico-peptídeos S constituem a espícula. A glicoproteína M também é sintetizada em polissomos ligados à membrana do RER, sendo depois transportada para o Complexo de Golgi, onde se acumula e não para a membrana plasmática (TOMLEY et al., 1987).

O nucleocapsídeo helicoidal do VBI é formado no citoplasma das células infectadas através da interação dos RNAs genômicos recém-formados e a proteína de

nucleocapsídeo N. O nucleocapsídeo tem uma certa flexibilidade e é fracamente espiralado e suas dimensões são provavelmente determinadas pelas propriedades da ligação de N (SIDEELL, 1983). O brotamento das partículas virais ocorre nas membranas do Complexo de Golgi e do RER. No sítio de brotamento, as fitas de nucleocapsídeos se alinham em arranjos ordenados junto à superfície citoplasmática dessas membranas, em áreas que possuem as glicoproteínas virais M e S e é principalmente mediada pelas interações entre as proteínas N e M (STURMAN & HOLMES, 1983). As partículas virais com nucleocapsídeo são liberadas no lúmen do RER e do Complexo de Golgi e, neste último caso, depois da passagem por esta organela os vírions são transportados em vesículas que migram para a periferia da célula. Essas vesículas se fundem com a membrana citoplasmática na periferia da célula e ocorre a liberação de numerosas partículas virais (LAI & CAVANAGH, 1997).

Decorridas três a quatro horas do início da infecção começam a ser liberados quantidades apreciáveis de partículas virais das células infectadas, sendo que muitos vírions adsorvem-se à membrana citoplasmática e, deste local, podem interagir e estimular os diversos mediadores celulares do sistema imune. Essa característica dos coronavírus de serem liberados das células infectadas sem que ocorra a lise dessas mesmas células, parece ser um dos fatores responsáveis pela infecção persistente que este vírus pode estabelecer nos organismos hospedeiros (OSHIRO, 1973). No entanto, este fenômeno só foi comprovadamente demonstrado para alguns isolados nefrotrópicos (CHANG & APOSTOLOV, 1982) e enterotrópicos do VBI (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). Ainda, foi verificado que o nível máximo de geração de novas partículas virais durante o ciclo de replicação dos coronavírus ocorre geralmente após 12 horas do início da infecção (CAVANAGH & NAQI, 2003).

O VBI infecta inicialmente o trato respiratório superior e, preferencialmente as células ciliadas e secretoras de muco desse sistema (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). O título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas do nariz e traquéia, aos três dias após o início da infecção; permanecendo nesses patamares por mais dois a cinco dias (HOFSTAD & YODER, 1996). Com relação a capacidade de o VBI infectar

outros órgãos do trato respiratório, estudos revelaram a presença de títulos virais similarmente elevados, nos pulmões e nos sacos aéreos (CAVANAGH, 2007).

Apesar de a nomenclatura do VBI sugerir que se trata de um patógeno apenas do trato respiratório, este vírus, além de se replicar em tecidos e órgãos desse sistema (nariz, traquéia, pulmão e sacos aéreos), e causar lesões proeminentes nesses tecidos ou órgãos; os quais funcionam também, como porta de entrada para esse agente, apresenta também tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais, incluindo as que estão presentes na constituição dos rins, das células do oviduto ou dos testículos e muitas outros tipos celulares do trato gastro-intestinal, que constituem por exemplo o esôfago, o proventrículo, o duodeno, o jejuno, a bursa de Fabrício, as tonsilas cecais, o reto e a cloaca (CAVANAGH, 2005). Infecções de tecidos entéricos geralmente não se manifestam clinicamente e patologicamente, não obstante quadros de proventriculite ou enterite podem ser desencadeados por determinadas estirpes do VBI (YU et al., 2001, CAVANAGH, 2005, 2007). Por outro lado, algumas estirpes do VBI são predominantemente nefropatogênicas, isto é: quando inoculadas em pintinhos de um dia de idade, reproduzem experimentalmente um quadro franco de nefrite, que culmina em elevada mortalidade. Alternativamente a esses patotipos do VBI, foram descritas algumas outras estirpes com uma predileção mais acentuada para replicação em tecidos gonadais, onde desencadeiam lesões e comprometimento do funcionamento normal desses órgãos, especialmente de ovários, ovidutos, e testículos (PENSAERT et al., 1994; COOK et al., 2001; LI & YANG, 2001).

Dessa forma, foi claramente demonstrado que as conseqüências mais deletérias da bronquite infecciosa são de elevada relevância, pelo fato de que, no curso dessa enfermidade, são geradas lesões significantes nos sistemas respiratórios, urinário e reprodutor de aves de todas as idades, as quais podem causar severas perdas econômicas à indústria avícola. (CAVANAGH & NAQI, 2003; CAVANAGH, 2007).

No que concerne ao diagnóstico laboratorial da BI, verifica-se que o mesmo depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e de identificação genômica ou fenotípica (sorotipos, protectotipos e patotipos) do vírus, e/ou de métodos indiretos destinados à detecção de anticorpos específicos para antígenos desse vírus, que são produzidos pelos organismos hospedeiros infectados.

Assim, os ensaios de vírus-neutralização (VN) e de inibição de hemaglutinação (HI), historicamente importantes, podem ser usados para monitorar a grande variabilidade que ocorre entre as estirpes do VBI, possibilitando a classificação das mesmas em diferentes sorotipos. A primeira técnica (VN) geralmente é realizada em ovos embrionados, ou em anéis traqueais, mas tem como desvantagens: a necessidade de adaptação do vírus ao sistema de cultivo, a infectividade do vírus é baseada no encontro de lesões no embrião e é necessário uma grande quantidade de ovos para a realização dos testes (COWEN & HITCHNER, 1975). Ademais, deve-se considerar que passagens sucessivas do vírus necessárias para a adaptação do vírus à propagação em ovos embrionados, podem provocar alterações em suas características genéticas e antigênicas (OTSUKI et al, 1982). O método de cultivo do VBI em anéis de traquéia de embriões de galinha não requer adaptação prévia desse vírus, porém a dificuldade reside no processo de preparação dos anéis (CHERRY & TAYLOR-ROBINSON, 1970, DARBYSHIRE, 1980). O teste de HI também pode ser usado com esse propósito porque consegue fazer a diferenciação antigênica das amostras do VBI. Contudo, essa técnica necessita de antissoros monoespecíficos, produzidos, via de regra com uma ou no máximo duas imunizações, sendo que é difícil conciliar bons títulos e especificidade dos anticorpos HI, pois imunizações seguidas induzem a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com maior intensidade (BROWN & BRACEWELL, 1985).

Existem outras técnicas aplicadas no diagnóstico da BI, tais como a microscopia eletrônica, as reações de imunofluorescência, a imunodifusão em gel de ágar, a imunoperoxidase e os ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-linked immunosorbent assay -ELISA) (De WIT, 2000) e ainda dos métodos de biologia molecular, os quais são úteis para fazer o diagnóstico direto e/ou a genotipagem do VBI. Dentre esses métodos destacam-se a Transcrição Reversa e a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), a

análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição (RFLP), e também o seqüenciamento de nucleotídeos dos genes mais importantes desse patógeno viral (CAVANAGH, NAQI).

As infecções pelo VBI podem também ser diagnosticadas através da detecção do aparecimento ou da elevação no título de anticorpos anti-virais específicos. Geralmente e com a finalidade de se correlacionar um problema clínico sugestivo da infecção com o VBI é necessário serem testadas amostras pareadas de soros, sendo que a primeira amostra é colhida na fase inicial da doença e a segunda amostra de duas a quatro semanas depois. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos é indicativo de soroconversão e de presença de infecção pelo VBI (De WIT, 2000).

Existem várias técnicas sorológicas recomendadas para aplicação no sorodiagnóstico da infecção pelo VBI, destacando-se os testes grupo-específicos e sorotipo-específicos. Dentre os do primeiro tipo estão as técnicas de ágar gel precipitação e de ELISA, notadamente onde são usados preparações enriquecidas ou que contêm somente a nucleoproteína N do VBI. Dentre os testes sorotipo-específicos, os mais utilizados são a técnica de vírus-neutralização e o teste de inibição da hemaglutinação, podendo, ainda, em algumas circunstâncias, serem usadas alguns métodos de ELISA competitivo ou de bloqueio com anticorpos monoclonais com atividade vírus-neutralizante (De WIT, 2000).

Ademais, deve ser considerado que o diagnóstico rápido e a determinação do estado de imunidade de um plantel de aves são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da BI. Para tanto, foi comprovado que os ensaios imunoenzimáticos quando realizados com padrões apropriados, indicam com elevada acurácia as concentrações de anticorpos específicos anti-VBI e podem facilitar o monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (MARQUARDT et al ,1981; SNYDER et al. , 1983). Atualmente, suspensão purificada por ultra-centrifugação de partículas do VBI é usada para ser adsorvida, na primeira etapa da reação, ao suporte sólido (superfície da cavidade da microplaca), dentro do desenho dos atuais kits comerciais de ELISA. A purificação de partículas do VBI requer, por sua vez, a propagação frequente desse vírus em sistemas de células eucarióticas,

no caso específico, em ovos embrionados SPF e, em adição a isso, os imuno-reagentes mais confiáveis para serem usados nos ensaios imuno-enzimáticos, exigem a utilização de preparações altamente purificadas desse vírus, o que se torna bastante difícil e oneroso para um vírus envelopado e com elevada labilidade no que tange à conservação da estrutura nativa dos seus mais importantes antígenos; especialmente as glicoproteínas das espículas de superfície (NDIFUNA et al. , 1998).

Com respeito à utilização de proteínas de nucleocapsídeo (proteínas N) sabe-se que várias preparações desse tipo de antígeno estrutural derivadas de diversos vírus como o vírus da caxumba, o vírus da raiva, o vírus da estomatite vesicular e o vírus da doença de Newcastle e o próprio VBI, 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; AHAMAD et al., 1993; ERRINGTON et al., 1995; NDIFUNA et al. , 1998; CHEN et al., 2003 e LOA et al., 2004), GIBERTONI et al., 2005.

Foi demonstrado que a proteína N do VBI, que se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus. Além disso, foi constatado que essa proteína tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre importantes estirpes de referência do VBI e é altamente imunogênica (NDIFUNA et al., 1998). Dessa forma, a proteína N do VBI reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupo desse vírus (NDIFUNA et al. , 1998).

## 1.2 CONTROLE DA BI

As medidas que têm sido mais amplamente adotadas para o controle da BI fundamentam-se na combinação de abordagens higiênico-sanitárias, juntamente com programas imunoproliféricos realizados por meio de vacinas “vivas” atenuadas ou de vacinas inativadas, que são administradas de acordo com as particularidades de cada região e tipo e idade das aves.

As vacinas “vivas” empregadas têm na sua composição estirpes atenuadas de VBI, sendo que a atenuação é feita por meio de múltiplas e seriadas passagens em ovos embrionados de galinha, podendo ser ou não clonadas em cultivo primário de células de embrião de galinha. Já, as vacinas inativadas podem conter as mesmas estirpes de VBI usadas nas vacinas atenuadas, exceto que as suspensões virais são nesse caso tratadas com agentes químicos inativantes e são acrescidas de adjuvantes (emulsões oleosas), ou alternativamente, podem ser formuladas com estirpes patogênicas desde que submetidas ao mesmo tratamento inativante. Essas últimas preparações são mais recomendadas para uso regional ou autóctone. Ainda as vacinas vivas se destinam mais ao uso em jovens ou período de crescimento (frangos de corte, poedeiras e reprodutoras em fase de recria) em uma ou duas administrações intervaladas de 20-30 dias, devendo ser aplicadas preferencialmente por meio de aerossol a um grande número de aves. As vacinas inativadas oleosas se destinam mais ao uso em aves de ciclo longo de vida, como galinhas de postura e reprodutoras e devem ser aplicadas de um a dois meses antes da puberdade e se recomenda que sejam administradas após a aplicação prévia de vacinas atenuadas (CAVANAGH & NAQI, 2003).

Na imunização contra o VBI a atenção primária foi direcionada para a glicoproteína S1, uma vez que ela contém os principais sítios antigênicos alvos de anticorpos neutralizantes desse vírus. No entanto, esta proteína está sujeita a sofrer uma enorme variabilidade na composição de aminoácidos de algumas de suas regiões, que faz com que as variantes do VBI escapem do processo de neutralização por anticorpos contra S1. A proteína N por sua vez não induz a formação de anticorpos

neutralizantes e é mais conservada e parece estar envolvida na indução de respostas imunes humorais e principalmente cito-mediadas, como a ação de células T citotóxicas, que podem ser exploradas e precisam ser melhor investigadas (SEO et al., 1997).

Inclusive dentro desse mesmo contexto, foi verificado em alguns estudos que preparações de DNA plasmidial contendo o inserto de toda a ORF ou parte do gene N podem induzir estado de proteção efetiva contra o desafio moderado feito com estirpe virulenta do VBI (SEO et al., 1997). No entanto, com relação à utilização da proteína N diretamente em protocolos de imunização, os dados, são um tanto conflitantes. O estudo de BOOTS et al. (1992) demonstrou que a imunização com a proteína N recombinante produzida em *E. coli*, seguida por re-imunização com vacina contendo partículas virais inativadas do VBI induzem estado de proteção efetiva em aves experimentalmente desafiadas. Por outro lado, IGNJATOVIC & GALLI (1994), trabalhando com preparações purificadas por cromatografia de afinidade da proteína N oriunda de partículas do VBI, não conseguiram induzir nenhuma proteção em aves experimentalmente imunizadas com essa proteína N e em seguida desafiadas com estirpe virulenta do VBI.

### 1.3 SISTEMAS DE CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS RECOMBINANTES

Atualmente, uma gama de sistemas de expressão de proteínas heterólogas foram desenvolvidos e alguns deles estão disponíveis no mercado, com destaque para os constituídos por bactérias; especialmente a *E. coli*, as leveduras, e células eucarióticas de mamíferos, aves e de insetos, transfectadas com vetores virais apropriados (WALSH, 1998). A escolha do bio-processo para a síntese e purificação de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de fatores, dentre os quais, destacam-se as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, a finalidade de sua obtenção e a viabilidade econômica do método.

A expressão de proteínas recombinantes através do sistema baculovírus – células de insetos têm sido usada e é mais recomendada para ser empregada para a obtenção de grandes quantidades de proteínas em células eucariotas. Esse sistema se caracteriza também por oferecer diversas vantagens em relação à expressão de proteínas em células procariontas, às células eucariotas de leveduras ou mesmo a outros sistemas constituídos por células de mamíferos. 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 de aves, com a vantagem adicional de ser produzida em quantidades muito superiores e com custos significativamente menores ao que seria conseguido utilizando células de mamíferos ou de aves (HOCHULI, 1992). No entanto, este sistema requer o cultivo *in vitro* de células de inseto, sendo mais exposto à contaminação bacteriana e fúngica; a proteína requer períodos maiores para ser expressa 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 (KREUTZ, 2000).

As bactérias, por sua vez, são hospedeiras mais comuns para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto processamento de proteínas a serem expressas (SUDBERY, 1996; CREGG, 1999). Assim, quando o

interesse é produzir 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 de várias proteínas (HIGGINS, 1998; CREGG, 1999).

*S. cerevisiae* foi a primeira levedura utilizada com propósito de produzir proteínas exógenas devido ao grande conhecimento sobre a genética e a fisiologia desse organismo, além da aceitação dessa levedura em experiência para benefício humano. Entretanto *S. cerevisiae* apresenta algumas limitações, como a alta glicosilação das proteínas recombinantes, modificando a imunogenicidade e a antigenicidade da proteína recombinante, ou produzindo uma conformação não-funcional. A produção de etanol durante a fermentação por essa levedura, pode ser tóxico, e essas limitações pode tornar essa levedura uma hospedeira inadequada para expressão de algumas proteínas heterólogas (CREGG et. al., 1993).

Em comparação com *S. cerevisiae*, a levedura *Pichia pastoris* apresenta a vantagem na glicosilação de proteínas secretadas porque não há hiperglicosilação. Além disso, a purificação da proteína secretada é facilitada pelo fato de que esta levedura secreta baixos níveis de proteínas nativas para o meio extracelular (VOZZA, et al., 1996). Há um número significativo de estudos que têm empregado com sucesso leveduras dessa espécie para fazer a expressão de uma gama de diferentes antígenos virais como HIV, papilomavirus, vírus da influenza, vírus da raiva (CARTER et al., 1991; KLEPFER et al., 1993; LIU et al., 1998; SAELENS et al., 1999).

Uma característica importante de *P. pastoris* é que essa levedura não é considerada uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae* e, portanto, rende mais biomassa e não gera etanol como produto, que acumulado atinge rapidamente níveis tóxicos, consoante foi mencionado anteriormente.

O sucesso do sistema de expressão *Pichia* está relacionado em grande parte ao promotor AOX1 do gene codificador para a enzima álcool oxidase que é reprimido no meio de cultura contendo glicerol, e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como única fonte de carbono (HINGGS, 1998; GREGG,

1999; BOETTNER, et al., 2002). A enzima AOX, é a primeira enzima na via de utilização de metanol e constitui cerca de 30% do total de proteínas solúveis nas células crescendo em meio com metanol como fonte de carbono. Isso permitiu constatar que a síntese da enzima AOX é regulada em nível transcricional e que o promotor desse gene pode ser eficientemente empregado para controlar a expressão de genes exógenos (CREGG et al., 1993 ).

Por outro lado, as bactérias, particularmente, *E. coli*, são certamente os sistemas mais comumente usados na produção de proteínas recombinantes heterólogas. Atualmente são utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como por exemplo, a insulina, hormônio do crescimento humano, entre outros, com altos níveis de expressão (WALSH, 1998). Isto certamente se deve ao fato de serem de fácil manipulação, crescerem rapidamente e exigirem meios relativamente simples. Os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos e apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *E. coli* tem apresentado grande êxito ao serem utilizadas em testes sorológicos (NDIFUNA et al., 1998; CHEN et al., 2003; WOO, et al., 2005, LUGOVSKAYA et al., 2006)

#### 1.4 REFERÊNCIAS

AHMAD, D. S.; BASSIRI, M.; BANERJEE, A. K.; YILMA, T. 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.

BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. High-throughput screening for the expression heterologus proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **J. Biotechnol**, Amsterdam, v. 99, n. 1, 51-62, 2002.

BOOTS, A. M. Van; LIEROP, M. J.; KUSTERS, J. G.; KOOTEN, P. J. Van; ZEIJST, B. A. Van Der; HENSEN, E. J. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. **Immunology**, Oxford, v. 74, n.1, p. 8-13, 1991.

BOOTS, A. M. H.; BERNAISSE-TROUW, B. J.; HESSLINK, W.; RIJKE, E.; SCHRIER, C.; HENSN, E. J. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avain coronavirus nucelocapsid protein. **Vaccine**, v. 10, p. 119-124, 1992.

BOURSNELL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; FOULDS, I. J.; GREEN, P. F.; TOMLEY, F. M.; BINNS, M. M. Completion of the sequence of the genome of coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, London, v. 68, p. 55-77, 1987.

BROWN, A. J.; BRACEWELL, C. D. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. **Vet. Rec.**, London, v. 116, n. 2, p. 47-48, 1985.

CARTER, J. J.; YAEGASHI, N.; JENISON, G. A.; GALLOWAY, D. A. Expression of human papillovirus protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae* . **Virology**, Duluth, v. 182, n. 2, p. 513-521, 1991.

CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A.; ENJUANES, L.; HOLMES, K. V.; HORZINEK, M. C.; LAI, M. M. C.; LAUDE, H.; PLGEMANN, P. G. W.; DDELL, S.; SPAAN, W. J. M.; TAGUCHI, F.; TALBOT, P. J. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus e Arterivirus genera. **Arch. Virol.**, New York, v. 135, n. 1-2, p. 227 - 237, 1994.

CAVANAGH, D. Coronavirus surface glycoprotein. In: CAVANAGH, D. **The Coronaviridae** (Ed.). New York : Plenum, 1995 p. 73-133.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.N.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; Mc DOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**, 10<sup>th</sup> ed. Ames: University Press, 1997. p. 511-526.

CAVANAGH, D, NAQI S. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003, p. 101-119.

CAVANAGH, D. Coronaviruse in poutry and other birds. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

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

CHERRY, J .D.; TAYLOR-ROBISON, D. Large quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and mycoplasma studies. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 19, n. 4, p. 658-662, 1970.

CREEG, J. M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris* – a review. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 905-910, 1993.

CREEG, J. M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Ed.). **Gene expression systems: using nature for the art of expression**. New York: Academic Press., 1999, p. 157-209.

COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; WANG, L.; WILLIAMS, A. K. An overview of molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poult. Sci. Rev.**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 41-55, 1992.

COOK, J. K. A. Coronaviridae. In: JORDAN, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T (Ed.). **Poultry diseases**. 5. ed. London: W.B. Saunders, 2001, p. 298-306.

COWEN, B. S., HITCHNER, S. B. Serotyping of avian infectious bronchitis virus by the virus neutralization test. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 19, n. 3, p. 583-595, 1975.

CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, Edinburgh, v. 92, n. 1, p. 199-211, 1982.

DARBYSHIRE, J. H.; ROWEL, J. G.; COOK, J. K. A.; PETERS, R. W. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheal organ cultures. **Arch. Virol.**, New York, v. 61, n. 3, p. 227-228, 1980.

DAS, R. C.; SCHULTZ, J. L. Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Prog.**, New York, v. 3, n.1, p. 43-48, 1987.

De WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n. 1, p. 71-93, 2000.

DHINAKAR-RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 677-706, 1997.

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. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 357-365, 1995.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F.; SENA, J. A.; GIVISIEZ, P. E.; FURUYAMA, C. R.; MONTASSIER, H. J. Development and application of a *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

GUY, J. S.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. J.; PAKPINYO, S. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of turkey coronavirus antibodies. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 46, n. 2, p. 334-341, 2002.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction in *Pichia pastoris*. In: HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. (Ed.). **Methods in molecular biology: Pichia** Protocols. New Jersey: Humana Press- Totowa, 1998, p. 1-15.

HOCHULI, E. Purification techniques for biological products. **Pure Appl. Chem.**, London, v. 64, n. 64, p. 169-184, 1992.

HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 10, n. 2, p. 230-239, 1966.

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.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, New York, v. 138, n. 1-2, p. 117-138, 1994.

KANT, A.; KOCH, G.; ROOZELAAR, D. J. VAN.; KUSTER, J. G.; POELWIJK, F. A. J.; ZEIJST, B. A. M. VAN DER. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **J.Gen.Virol.**, London, v. 73, n. 3, p. 591-519, 1992.

KING, D.J.; CAVANAGH, D. Infectious Bronchitis . In: CALNEK, B. W. (Ed.). **Diseases of poultry**, 9<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa University Press, 1991. p. 471-484.

KLEPFER, S. R.; DEBOUCK, C.; UFFELMAN, J.; BOLLEN A.; JONES. E. V. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. **Arch. Virol.**, Viena, v. 128, n. 3-4, p. 269-286, 1993.

KREUTZ, L. C. Clonagem e expressão de genes em *Escherichia coli* e Baculovirus. In: CURSO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À SAÚDE ANIMAL, 1., 2000, Campo Grande. **Anais....**Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. p. 75-85.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, Amsterdam, v. 48, p. 1-100, 1997.

LI, R.; YANG, H. C. Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, n. 5, p. 535-541, 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.

LIU, W. F.; GAO, D.; WANG, Z.N. Expression of the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and its fusion with beta -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 5, n. 3, p. 592-594, 1998.

LIU, S. W.; ZHANG, Q. X.; CHEN, J. D.; HAN, Z. X.; LIU, X.; FENG.; SHAO, Y. H.; RONG, J. G.; KONG, X. G.; TONG, G. Z. Genetics diversity of infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. **Arch. Virol.**, New York, v. 151, n. 6, p. 1133-1148, 2004.

LOA, C. C. LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

LU, H.; YANG, G.; FEI, X.; GUO, H.; TAN, YADI.; CHEN, H.; GUO, A. Modification of SARS-CoV S1 gene render expression in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, Norwell, v. 33, n. 3, p. 329-335, 2006.

LUGOVSKAYA, N. N.; SCHERBAKOV, A. V.; YAKOVLEVA, A. S.; TSYVANYUK, M. A.; MUDRAK, N. S.; DRYGIN, V. V.; BORISOV, A. V. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 292-296, 2006.

MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 25, n. 3, p. 713-722, 1981.

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.

OSHIRO, L. S. Coronaviruses. In: DALTON, A.; HAGUENAU, F. (Ed.). **Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages**: an atlas. New York: Academic, 1973. cap. 18, p. 331-341.

OTSUKI, K.; TAGAWA, Y.; TSUBOKURA, M. Antigenic variation of avian bronchitis virus during replication in BHK-21 cells. **Arch. Virol.**, New York, v. 73, n. 1, p. 75-78, 1982.

PENSAERT, M.; LAMBRECHTS, C. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 23, n. 4, p. 631-641, 1994.

REID-SANDEN, F.L.; SUMMER, J. W.; SMITH, J. S.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J. H.; BELLINI, W. J. 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.

SAELENS, X.; PETER VANLANDSCHOOT, P.; MARTINET, W.; MARAS, M.; NEIRYNCK, S.; CONTRERAS, R.; FIERS, W.; JOU, W. M. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secret influenza virus hemagglutinin. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 260, n. 1, p. 166-175, 1999.

SAKAMOTO, S. I.; SACCHIO, T. I.; NAKAO, T. J.; HAMADA, F.; YAMAMOTO, M.; GROSBY, J. A.; NI, Y.; KAWAI, A. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogus produced in yeast cells. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 205-218, 1999.

SAPATS, S. I.; ASHTON, F.; WRIGHT, P. J.; IGNJATOVIC, J. Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. **J. Gen. Virol.**, London, v. 77, n. 3, p. 413-418, 1996.

SEO, S. H.; WANG, H. L.; SMITH, R.; COLLISON, E. W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapside induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SIDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, London, v. 64, n. 4, p. 761-776, 1983.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, E. T.; SAVAGE, P. K.; ALLEN, D. C. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis , infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 25, p. 213-222, 1983.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v. 28, n. 1, p. 35-112, 1983.

SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 7, p. 517-524, 1996.

TRIMBLE, R.B.; ATKINSON, P. H.; TSCHMPP, R. R.; MALEY, F. Structure of oligosaccharides on saccharomyces SUC2 invertase secreted by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 226, n. 34, p. 22807-22817, 1991.

TOMLEY, F. M.; MOCKETT, A. P. A.; BOURSNELL, M. E.; BINNS, M. M.; COOK, J. K. A.; BROWN, T. D. K.; SMITH, G. L. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. **J. Gen. Virol.**, London, v. 68, n. 9, p. 2291-2298, 1987.

VOZZA, L. A.; WITTEWER, L.; HIGGINS, D. R.; PURCELL, T. J.; BERGSEID, M.; COLLINS-RACIE, L. A.; LAVALLIE, E. L.; HOEFFLER, J. P. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, New York, v. 14, n.1, p. 77-81, 1996.

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

WILLIAMS, A. K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; WONG, B. H. L.; TSOI, H.; FUNG, A. M. Y.; KAO, R. Y. T.; CHAN, K.; PEIRIS, J. S. M.; YUEN, K. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3054-3058, 2005.

YU, L.; WANG, Z.; JIANG, Y.; LOW, S.; KWANG, J. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolates from China and Southeast Asia. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 45, n. 1, p. 201-209, 2001.

## **CAPÍTULO - 2 SISTEMAS HOSPEDEIROS EUCARIÓTICO (*Pichia pastoris*) E PROCARIÓTICO (*Escherichia coli*) PARA CLONAGEM E EXPRESSÃO DA NUCLEOPROTEÍNA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA**

**RESUMO** - Produtos amplificados da ORF completa do gene da nucleoproteína (N), com 1230 pb da estirpe M41 do VBI, foram obtidos através da RT-PCR a partir do RNA da estirpe M41 do VBI, usando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo os sítios de restrição compatíveis com a clonagem direcionada dentro dos vetores de expressão em *E. coli* (pET28a) e em *P. pastoris* (pFLD). Para tanto, inicialmente foi feita a pré-clonagem dos “amplicons” no plasmídeo pGEM-T Easy, de onde os insertos do gene N foram, em seguida, digeridos com enzimas de restrição apropriadas, purificados e subclonados dentro de um dos vetores de expressão, pET28a e pFLD, que foram usados na transformação de células de *E. coli* da linhagem BL21, ou células de *P. pastoris* da linhagem GS115, respectivamente. Os clones transformantes bacterianos e de levedura obtidos foram submetidos aos processos de indução apropriados, sendo avaliadas a expressão e as propriedades das preparações de proteína N recombinante produzidas. A clonagem no vetor pET28a-N-M41- *E. coli* levou a produção de quantidades apreciáveis (3,4mg/mL) da proteína recombinante fusionada com cauda de poli-histidina, com massa molecular estimada de 54 kDa, que na técnica de Western-blotting revelou elevada identidade antigênica com a proteína N do VBI. Por outro lado, a construção plasmidial pFLD-N-M41 para *P. pastoris*, embora tenha passado por processos apropriados de clonagem e transformação, expressou quantidades muito reduzidas da proteína N recombinante fusionada com a cauda de poli-histidina. Assim, o sistema de expressão procarioto permitiu obter maiores taxas de produção da proteína N da estirpe M41 do VBI, tendo, portanto, um grande potencial para ser aplicada no imunodiagnóstico ou em estudos de imunização da infecção por esse vírus.

**Palavras-chave:** Vírus da Bronquite Infecciosa, clonagem, expressão, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*

## 2.1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus de aves domésticas (espécie *Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves. O VBI é um membro da família *Coronaviridae*, sendo constituído por um genoma composto por um RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6 Kb e que codifica a produção de quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007). A proteína N do VBI, que se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus. Essa proteína tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes do VBI (WILLIAMS et al., 1992), além de ser altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SNEED et al., 1989, SEO, et al., 1997). Dessa forma, a proteína N do VBI reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupo desse vírus (NDIFUNA et al., 1998).

As técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas de procariotos e eucariotos são técnicas alternativas para a produção de antígenos isolados e, ainda, podem contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios (NDIFUNA et al., 1998, LOA et al., 2004).

Para tanto existem sistemas constituídos por procariotos, como a *E. coli*, ou por eucariotos, como as leveduras *Saccharomyces spp.*, *Pichia spp.*, acrescentando-se ainda, da possibilidade de serem usados vetores virais como Poxvírus, Baculovírus juntamente com células animais em culturas *in vitro* (CHANG, et.al., 1998).

Dentre os procedimentos de clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas estruturais de vírus em geral e do VBI, em particular, constata-se que existem

várias possibilidades que já foram exploradas, quer seja com o uso de sistemas de hospedeiros procariotos, como a *E. coli* (NDIFUNA et al., 1998, LOA et al., 2004 LUGOVSKAYA et al., 2006), ou eucariotos, como células de insetos transfectadas com vetores de baculovírus (GUY et al., 2002; CHEN et al., 2003). Ainda, foi demonstrado também que as leveduras *S. cerevisiae* foram utilizadas na expressão da proteína N desse mesmo vírus (GIBERTONI et al., 2005), bem como as leveduras da espécie *P. pastoris* foram usadas para a expressão de proteínas estruturais S1 e N de um outro importante coronavírus, o vírus da SARS (LIU et al., 2004, LU et al., 2006). No entanto, não há informações sobre a clonagem e a expressão da proteína N do VBI nessa espécie de leveduras, nem sobre a avaliação comparativa com outros sistemas de expressão.

Assim, foi desenvolvido o presente estudo com o objetivo principal de clonar e expressar o gene da proteína do nucleocapsídeo N da estirpe M 41 do VBI em dois sistemas de expressão, constituídos por *E. coli* e por *P. pastoris*, e comparar o desempenho desses sistemas, no sentido de tornar disponível essa proteína recombinante para ser utilizada como antígeno em técnicas de sorodiagnóstico da infecção pelo VIB, ou em estudos da avaliação da imunidade contra esse vírus.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Propagação viral e preparação do RNA

A estirpe vacinal de referência Massachusetts 41 (M 41- CNPSA – EMBRAPA – Concórdia-SC) do VBI foi propagada com base na descrição de OWEN et al. (1991). O vírus foi inoculado em ovos embrionados SPF com 9 dias de incubação, na cavidade córion-alantóide (CA), no volume de 200µL/ovo. Aproximadamente 36 horas pós-inoculação, os ovos foram refrigerados por no mínimo quatro horas à temperatura e 4 °C. Em seguida, o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido, distribuído em alíquotas e estocado a -70°C, até o momento do uso. O ácido nucléico das amostras obtidos de suspensões oriundas do LCA, foi extraído com a utilização de Trizol LS Reagent®, de acordo com as recomendações do fabricante. Com exceção da quantidade da amostra, a qual foi utilizada na proporção de 50%, bem como a adição do clorofórmio-álcool isoamílico.

### 2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Com base na sequencia do gene da proteína N da estirpe M41 do VBI (“GenBank” nº de acesso-M28566) foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1), de maneira a se anelarem com as extremidades 5’ e 3’ de toda a ORF do gene N (1230 pb) e possuírem, sítios para clivagem com as enzimas de restrição compatíveis com a clonagem direcionada nos vetores pET28a (sistema – *E. coli*) e pFLD (sistema – *P. pastoris*), conforme a descrição na Tabela 1.

A partir do RNA viral extraído da suspensão de LCA infectado com a estirpe M41 do VBI, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT), usando “Random Primers”, para em seguida ser amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), toda a ORF do gene da proteína N, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos acima e o kit da enzima “Taq High Fidelity” (Invitrogen), sendo as condições da PCR constituídas por um primeiro ciclo a 95°C por 5 minutos, seguido de outro ciclo a 70°C por 2 minutos,

seguido de outros 35 ciclos, cada um composto por três passos; 94°C por 1 minuto, para promover a desnaturação da hélice dupla do DNA, 48°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a por 2 minutos e 30 segundos, para a polimerização e extensão das fitas. Foi feita uma extensão final de 10 minutos a 68°C.

Depois da reação de amplificação, 5 µl do produto final da PCR, foi aplicado em gel de agarose (0,8%) imerso em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma diferença de potencial adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm). A visualização do produto amplificado, no gel de agarose, foi realizada através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene N

Oligos	Sequencias de nucleotídeos
	<i>Nde</i> I
Oligo- Pet -A +	5'-GGAATTCCATATGGCAAGCGGTAAGGC- 3'
	<i>Xho</i> I
Oligo- Pet-B -	5'-CCGCTCGAGAAGTTCATTCTCTCCTAG-3'
	<i>Xho</i> I
Oligo - Pic-A +	5'-CCGCTCGAGGTCATGGCAAGCGGTAA-3'
	<i>Apa</i> I
Oligo- Pic-B -	5'-ATTATTGGGCCCAAGTTCATTCTCTCCTAG-3'

\* (+) sense (-) antisense

### 2.2.3 Clonagem do gene que codifica para a proteína N

Os produtos amplificados contendo 1249 pb (pET-28a) e 1252 pb (pFLD), foram purificados com o “kit” comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante, para depois serem clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), o qual foi usado para transformar células de *E. coli* da linhagem DH10B. Clones transformantes foram selecionados em placas contendo o meio LB (1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 1% NaCl) contendo 50µg/ml de ampicilina.

Ao final dessa etapa, preparações de DNA plasmidial obtidas a partir dos clones transformantes foram digeridas com as endonucleases específicas identificadas na Tabela 1, de acordo com a estratégia usada para subclonar estes fragmentos nos vetores pET28a ou pFLD. O produto da reação de digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose. Após a extração do DNA dos clones bacterianos recombinantes, a verificação da presença de plasmídeos contendo o inserto do gene N do VBI e a determinação da quantidade de DNA, em espectrofotômetro UV, nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, cada uma dessas preparações de DNA plasmidial foi submetida ao sequenciamento de DNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 Promoter e SP6 Reverse e o kit “Big Dye Terminutosator” (Perkin Elmer), para confirmar a homologia das sequencias de nucleotídeos dos genes N amplificados e clonados.

A partir de um dos clones confirmados como portador do inserto do gene N da estirpe M41 do VBI foi feita a extração do DNA plasmidial que foi submetido à digestão com as mesmas enzimas anteriormente citadas e específicas para a clonagem direcional nos vetores de expressão, pET-28a e pFLD, que também passaram pelo mesmo processo de digestão, de forma que, no final, as duas preparações da ORF completa do gene N fossem ligadas a cada um desses vetores que foram então usados para a transformação das células de *E. coli* da linhagem BL21 (DE) pLys, segundo o procedimento descrito por SAMBROOK et. al. (2001) e da linhagem GS115 de *P. pastoris*, tendo sido antes linearizado, o vetor pFLD + gene N, com a enzima *Cla* I e

usando-se a eletroporação, conforme a metodologia do fornecedor (“pFLD and pFLD $\alpha$  - *Pichia pastoris* expression vectors” - Invitrogen).

A construção plasmidial final para a produção de proteína N recombinante em *E. coli* foi denominada de pET28a-N-M41, enquanto a construção para a produção intracelular em *P. pastoris* foi denominada pFLD-N-M41.

#### **2.2.4 Indução da expressão da proteína N recombinante nos clones recombinantes de *E. coli***

Clones transformantes de *E. coli* da linhagem BL21(DE) pLys foram selecionados das placas e, em seguida cultivados em 10mL de meio LB contendo 100 $\mu$ g/mL kanamicina, sob agitação de 250 rpm a 37°C, durante 16 horas. Em seguida o volume total (10 mL) foi transferido para 200 mL de meio LB contendo kanamicina, sendo incubado a 37°C, sob agitação de 200rpm. Quando a densidade óptica dessa cultura atingiu aproximadamente 0,8 em um comprimento de onda de 600 nm, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 0,2 mM. As culturas, depois da adição do indutor, foram incubadas por 4 horas a 30°C e sob agitação de 200rpm. As células foram coletadas por centrifugação e submetidas ao processo de extração de proteínas.

#### **2.2.5 Expressão da proteína N recombinante nos clones recombinantes de *P. pastoris***

Depois dos clones recombinantes de levedura terem sido selecionados após cultivo por até 2 dias a 30°C em placas contendo meio YPDS (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 18% sorbitol, 2% ágar), contendo 100  $\mu$ g/mL do antibiótico Zeocina, foi escolhido um clone que foi submetido inicialmente a uma cultura sob a forma de um pré-inóculo em 5mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), mantido sob agitação de 250 rpm, a 30°C por 16-18 horas. Após isso essa cultura foi centrifugada e as células de levedura ressuspendidas em 25 mL de meio

mínimo contendo glicerol: MGA (Minimal Glicerol with Ammonium Sulfate Medium) (1,34% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0,02% Biotina, 2% Glicerol, 1% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina), onde permaneceram sob agitação por 36 horas. A indução da expressão do gene de interesse foi feita após a centrifugação e ressuspensão da cultura em 50 mL de meio MMA (Minimal Methanol with Ammonium Sulfate Medium) (1,34% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0,02 Biotina, 1% Metanol, 1% Sulfato de amônio, 0,004% Histidina) onde permaneceu sob agitação por 96 horas. Foi adicionado metanol a cada 24 horas, para uma concentração final de 0,5%.

### **2.2.6 Lise das células e detecção da proteína**

A preparação do extrato celular para análise da produção da proteína recombinante na forma intracelular e em pequena escala, nos dois sistemas de expressão utilizados neste estudo, foi coletada por centrifugação durante 10 minutos e o precipitado celular foi ressuspensionado em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM de PMSF, 1mM de EDTA, 1mM de Pepstatina e 0,5 mM de Aprotinina). A lise celular foi realizada em um sonicador de células Sonics Vibra Cell (Sonics & Materials, VC x 500). O lisado celular foi centrifugado a 12.000  $xg$  durante 10 minutos a 4°C. A concentração da proteína foi determinada utilizando-se o método de BRADFORD (1976). A concentração dos extratos celulares contendo as proteínas N recombinantes foi de aproximadamente 0,250 mg/mL para a proteína produzida em *P. pastoris* e de 10 mg/mL, para *E. coli*, foram armazenadas a - 20°C para posterior utilização do sobrenadante através de eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE).

### **2.2.7 Purificação da proteína N recombinante em *E. coli***

A proteína N recombinante produzida em *E. coli* contendo 6 resíduos de Histidina (6xHis) foi purificada através da cromatografia de afinidade contendo a resina de níquel-sepharose (“Ni Sepharose High performance” GE Healthcare). A proteína N recombinante (N-His6) foi eluída com Imidazol (Sigma,USA). A concentração da proteína purificada foi determinada utilizando-se o Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA), baseado no método de BRADFORD, 1976. As frações coletadas correspondentes aos picos de absorvância, numa concentração final da fração contendo a proteína N recombinante purificada de 3,4 mg/L, foram armazenadas a -20°C para posterior utilização no Western-blotting.

### **2.2.8 Análise por SDS-PAGE e Western blotting**

Os lisados celulares foram analisados por SDS-PAGE de acordo com o método de (LAEMMLI 1970), usando-se um sistema de tampão descontínuo. As bandas polipeptídicas foram detectadas em gel a 9%, através da coloração utilizando o corante “Coomassie Brilliant Blue R-250.

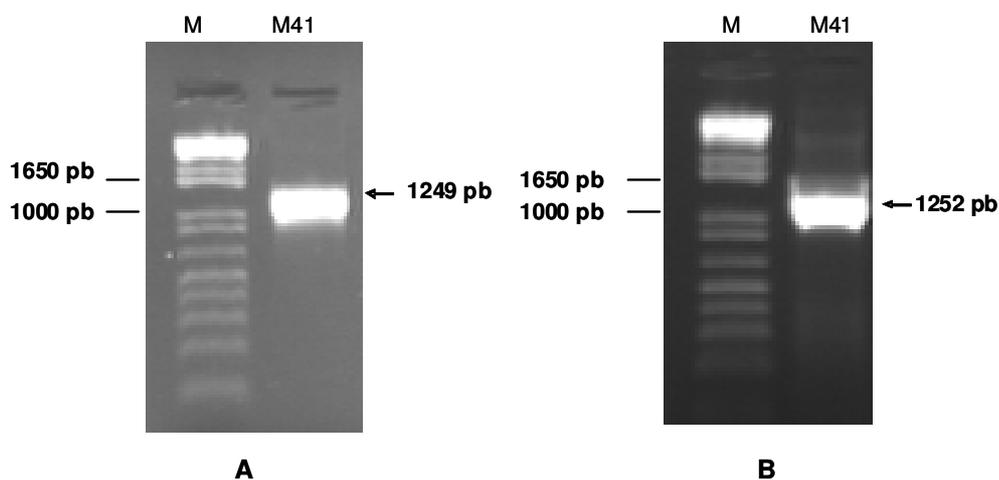
A identidade da proteína N recombinante foi analisada, por Western blotting, utilizando um anticorpo monoclonal anti-polihistidina (Sigma, St. Louis, MO). Os polipeptídeos foram eletro-transferidos em cuba de transferência úmida para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare, USA). A reação com o anticorpo monoclonal anti-polihistidina (Sigma), foi na diluição 1:25000, para detecção da proteína recombinante produzida em *E. coli* e na diluição de 1:500, para proteína produzida em *P. pastoris*, em PBS-LPD 5%. O conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de cabra anti IgG de camundongo (Bethyl Laboratories Inc. – Montgomery, TX, USA) foi utilizado, para revelação do complexo antígeno-anticorpos, usado na diluição 1:500 em PBS-LPD 5%. Após incubação de 1 h, a membrana foi novamente lavada com PBST e PBS e a reação de desenvolvimento da cor se processou após ter sido

adicionada a mistura do cromógeno mais substrato específico (DAB; Sigma) (TOWBIN et al., 1979).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Clonagem do gene N da estirpe M41 do VBI nos vetores de expressão para *E. coli* e para *P. pastoris*

Os produtos amplificados do gene da proteína N da estirpe de referência M41 do VBI obtidos nos procedimentos de RT-PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%), observando-se a presença de bandas com os tamanhos esperados de 1249 pb e de 1252 pb, respectivamente para a clonagem nos vetores pET28a e pFLD (Figura 2). Esses “amplicons” do gene N foram então inicialmente clonados no vetor pGEM -T Easy. A inclusão dessas preparações do gene N neste vetor, foi constatado por meio da clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento de nucleotídeos, que revelou uma homologia de 100% com a sequência do gene que codifica a proteína N da estirpe M41 do VBI disponível no “GenBank” sob o número de acesso M28566 (Figura 3).



**Figura 2.** (A e B)- Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amplificação dos segmentos gênicos do gene da proteína N. TM-Tamanho Molecular 1kb Plus DNA Ladder, (A) fragmento de DNA amplificado a partir do gene N (estirpe M41) usando os oligonucleotídeos iniciadores específicos Pet-A e Pet-B (B) fragmento de DNA amplificado a partir do gene N (estirpe M41) com os oligonucleotídeos iniciadores específicos Pic-A e Pic-B.

```

Query 1      ATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAGACACACGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACCTAGGA 60
Sbjct 72      ATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAGACACACGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACCTAGGA 131

Query 61      GGACCAAAAGCCACCTAAAAGTTGGTTCTTCTGGAAATGTATCTTTGGTTTCAAAGCAATAAAA 120
Sbjct 132      GGACCAAAAGCCACCTAAAAGTTGGTTCTTCTGGAAATGTATCTTTGGTTTCAAAGCAATAAAA 191

Query 121     GCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCTCGATAATGAA 180
Sbjct 192     GCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCTCGATAATGAA 251

Query 181     AATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGACACGCCAAGCTAGGTTTAAAGCCAGGT 240
Sbjct 252     AATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGACACGCCAAGCTAGGTTTAAAGCCAGGT 311

Query 241     AAAGGTGGAAGAAAACCAGTCCCAGATGCTTGGTATTTTTACTATACTGGAACAGGACCA 300
Sbjct 312     AAAGGTGGAAGAAAACCAGTCCCAGATGCTTGGTATTTTTACTATACTGGAACAGGACCA 371

Query 301     CCCGCTAACCTCAATTGGGGTGATAGCCAAAGATGCTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAAGGCT 360
Sbjct 372     CCCGCTAACCTCAATTGGGGTGATAGCCAAAGATGCTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAAGGCT 431

Query 361     GCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTGACTCTCACAAGTTTGACCAATAT 420
Sbjct 432     GCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTGACTCTCACAAGTTTGACCAATAT 491

Query 421     CCCGTACGGTTTTTCAGACGGAGGACCTGATGTAATTTCCGTTGGGATTTTCATTCTCTG 480
Sbjct 492     CCCGTACGGTTTTTCAGACGGAGGACCTGATGTAATTTCCGTTGGGATTTTCATTCTCTG 551

Query 481     AATCGTGGCAGGAGTGGGACATCAACAGCAGCTTCATCAGCGGCATCTAGTAGACACCA 540
Sbjct 552     AATCGTGGCAGGAGTGGGACATCAACAGCAGCTTCATCAGCGGCATCTAGTAGACACCA 611

Query 541     TCACGTGAAGTTTCGGGTGGTCCGAGGAGTGGTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGTGCA 600
Sbjct 612     TCACGTGAAGTTTCGGGTGGTCCGAGGAGTGGTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGTGCA 671

Query 601     GCAAGGATAAATTCAGGATCAGCAGAAGCGGTTCTCCGATTACAAAAGGCTAAGGCTGAT 660
Sbjct 672     GCAAGGATAAATTCAGGATCAGCAGAAGCGGTTCTCCGATTACAAAAGGCTAAGGCTGAT 731

Query 661     GAAATGGCTCACCCCGGCTATTGCAAGCGCACTATTCACCTAATTATAAGGTTGATCAA 720
Sbjct 732     GAAATGGCTCACCCCGGCTATTGCAAGCGCACTATTCACCTAATTATAAGGTTGATCAA 791

Query 721     CTCTTTGGTCCCGCTACTAAAGCTAAGCAGGAAAATTTGGTGTGATGACAAGATGAATGAC 780
Sbjct 792     CTCTTTGGTCCCGCTACTAAAGCTAAGCAGGAAAATTTGGTGTGATGACAAGATGAATGAC 851

Query 781     GAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCCTAGCAGCCATGCT 840
Sbjct 852     GAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCCTAGCAGCCATGCT 911

Query 841     TGTCTTTTCGGAAGTAGACTGACGCCACAGACTTCAACCAGATGGGCTCCACTTGAATTT 900
Sbjct 912     TGTCTTTTCGGAAGTAGACTGACGCCACAGACTTCAACCAGATGGGCTCCACTTGAATTT 971

Query 901     GAATTTACTACTGTGTTCCACGTTGATGATCCGCAGTTTGCATAATTATGTAATAAATTTGT 960
Sbjct 972     GAATTTACTACTGTGTTCCACGTTGATGATCCGCAGTTTGCATAATTATGTAATAAATTTGT 1031

Query 961     GATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAACACGTCCTCAACAGATGATGAACCAAGACCAAAGTCA 1020
Sbjct 1032    GATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAACACGTCCTCAACAGATGATGAACCAAGACCAAAGTCA 1091

Query 1021    CGCTCAAGTTCAAACCTGCAACAAGAGGAAAATTTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCCGCT 1080
Sbjct 1092    CGCTCAAGTTCAAACCTGCAACAAGAGGAAAATTTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCCGCT 1151

Query 1081    AACAAAGCAGAAAAACCCAAAGAACAGCAGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCAGAT 1140
Sbjct 1152    AACAAAGCAGAAAAACCCAAAGAACAGCAGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCAGAT 1211

Query 1141    GAGGACAGCAACAATGCCACAGCTGGAATTTGATGATGAACCCAAAGGTAATTAAGTGGGG 1200
Sbjct 1212    GAGGACAGCAACAATGCCACAGCTGGAATTTGATGATGAACCCAAAGGTAATTAAGTGGGG 1271

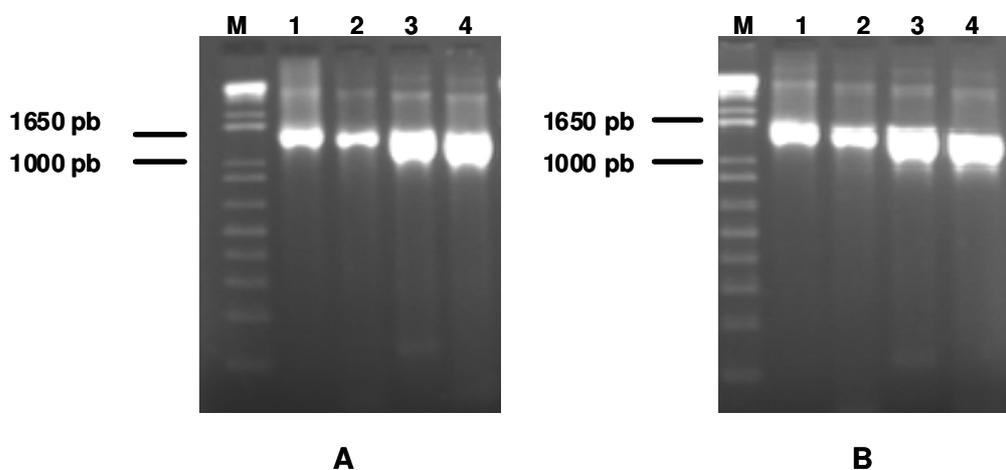
Query 1201    GATTCAGCCCTAGCAGACAATGAACTT 1227
Sbjct 1272    GATTCAGCCCTAGCAGACAATGAACTT 1298

```

**Figura 3.** Alinhamento de sequencias. Alinhamento entre a seqüência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína da estirpe M41 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso M28566 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html))

Os fragmentos do DNA correspondendo a sequencia polinucleotídica completa (1249 e 1252 pb) do gene N da estirpe da M41 foram clonados separadamente no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (clones 1 e 2), e uma amostra da construção plasmidial pGEM-N foi digerida com as endonucleases específicas *Nde* I / *Xho* I e o fragmento correspondente ao inserto foi inserido no vetor pET-28a, que também foi previamente digerido e purificado. A construção plasmidial pET28a-N-M41, foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B. Nesse processo, foram obtidos oito clones recombinantes, dos quais duas construções plasmidiais (clones 1.1 e 2.2) foram confirmadas pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos (do gene N ou do vetor) ou através da digestão com as endonucleases específicas (Figura 4).

Uma amostra da construção plasmidial pET28a-N-M41 comprovadamente correta foi usada na transformação de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pLys, que é muito utilizada para a produção de proteínas recombinantes.

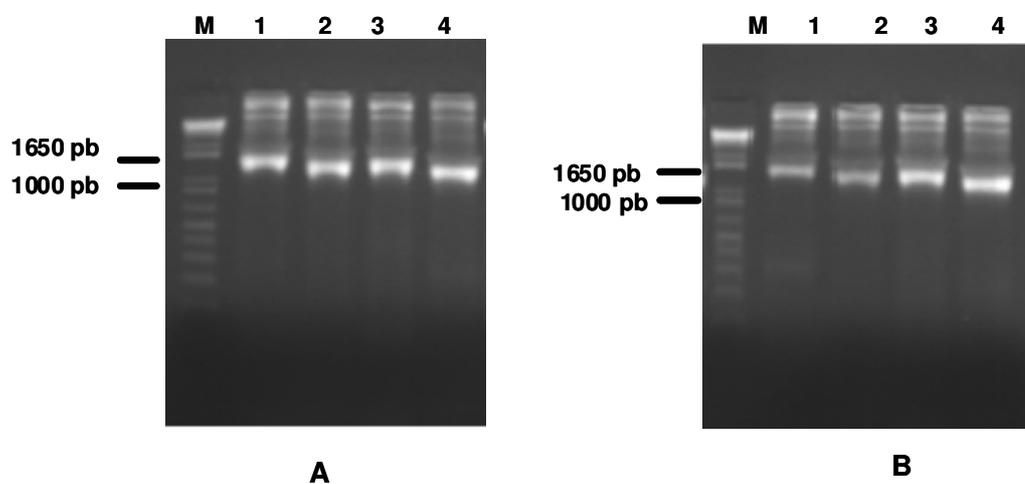


**Figura 4.** (A e B) Fragmentos de DNA correspondentes ao produto de amplificação do gene N das construções plasmidiais dos clones 1.1 e 2.2 de *E. coli* linhagem DH10B, com os iniciadores T7 promoter e T7 terminosator do vetor pET-28a, e os iniciadores, Pet-A e Pet-B do gene N. M- Tamanho Molecular 1Kb Plus DNA Ladder. Linhas: (1) T7 promoter e T7 terminosator 1567 pb (2) T7 promoter e Pet-B - 1467pb (3) Pet-A e T7 terminosator -1405pb (4) Pet-A e Pet-B-1249 pb .

Para a expressão em *P. pastoris*, o mesmo procedimento inicial de clonagem foi seguido, utilizando o produto amplificado de toda a ORF do gene N da estirpe da M41 do VBI, clonado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ( clone 7), e a amostra da construção plasmidial pGEM-N foi digerida com as endonucleases específicas *Apa I / Xho I* e o fragmento correspondente ao inserto foi inserido no vetor pFLD, que também foi previamente digerido e purificado

A construção plasmidial pFLD-N-M41, foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B. Nesse processo, foram obtidos vários clones recombinantes, dos quais duas construções plasmidiais (clones A6 e D8) foram confirmadas pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos (do gene N ou do vetor) ou através da digestão com as endonucleases específicas (Figura 5).

Uma amostra da construção plasmidial pFLD-N-M41 comprovadamente correta foi escolhida para ser linearizada e depois usada para transformar as células de *P. pastoris* da linhagem GS115.



**Figura 5.** (A e B) Fragmentos de DNA correspondentes ao produto de amplificação do gene N das construções plasmidiais dos clones A6 e D8 de *E. coli* linhagem DH10B, com os iniciadores FLD1 e AOX 1 do vetor e os iniciadores Pic-A e Pic-B do gene N. M - Tamanho Molecular 1Kb Plus DNA Ladder .(1) FLD1 e AOX1-1570 pb (2) FLD1 e Pic-B - 1470 pb (3) Pic-A e AOX1 1408pb (4) Pic-A e Pic-B -1252 pb .

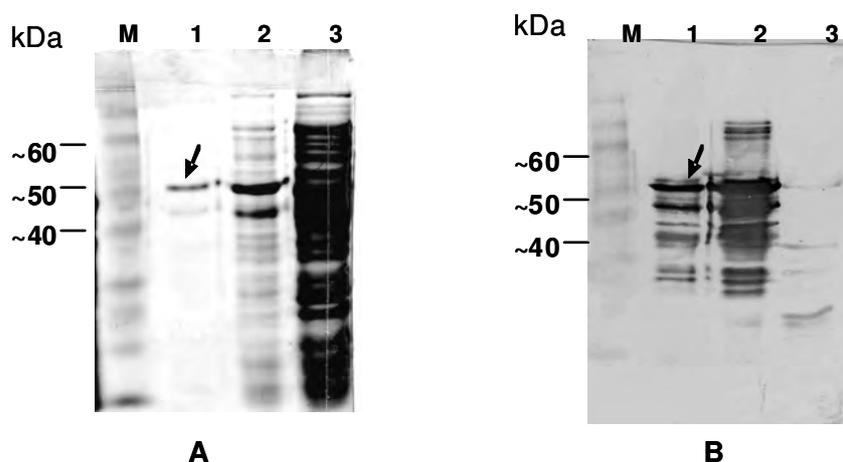
### **2.3.2 Indução da produção da proteína N recombinante nos sistemas heterólogos de *E. coli* e *P. pastoris***

Para a produção da proteína N recombinante em pequena escala foi utilizado o método que utiliza a indução do promotor da T7 RNA polimerase pela adição de IPTG ao meio. A proteína N recombinante foi purificada por meio da interação cromatográfica com a resina “Níquel - Sepharose High performance” (GE Healthcare). Baseado no método de BRADFORD (1976), a concentração final da fração contendo a proteína N recombinante purificada foi de 3,4 mg/L. Os resultados da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), demonstraram a presença de um banda cuja massa molecular correspondeu a aproximadamente 54 kDa (Figura 6A). O mesmo ocorreu quando a mesma amostra proteica foi utilizada na reação de Western-blotting, o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina, revelou uma banda fortemente marcada pelo anticorpo monoclonal, de aproximadamente 54 kDa, referente a proteína de interesse (Figura 6B). A concentração de proteína total no extrato celular obtido foi de 10 mg/mL. Abaixo da banda da proteína N que foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal, há outras bandas com tamanhos menores, que igualmente reagiram com o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina, parecendo se tratar de bandas da proteína N recombinante que sofreram proteólise. No entanto, o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina não reconheceu nenhuma banda significativa nos extratos protéicos provenientes de células *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) plys não transformadas (controle negativo), sem a construção plasmidial pET28a-N-M41.

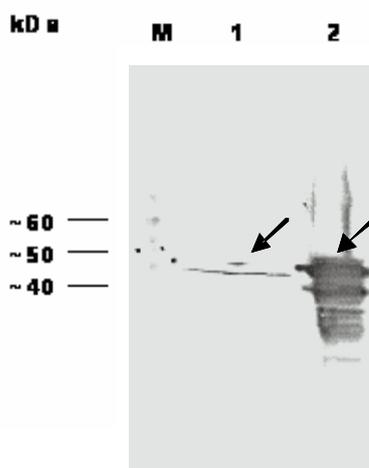
Migração eletroforética mais lenta foi observada para a proteína de fusão N-His6, pois a proteína migrou no gel de SDS-PAGE com massa molecular aparente de 54 kDa. Isso pode estar relacionado com a adição de cargas positivas dos resíduos de histidina na região C-terminal. Embora a soma das massas destes resíduos extras é menor que 1kDa, várias outras proteínas recombinantes fusionadas a cauda de poli-histidina foram descritas na literatura por apresentarem migração eletroforética mais lenta quando comparada com a forma nativa (sem alteração na sequência primária da proteína). Isso faz com que a massa observada para a proteína N recombinante de fusão esteja no

limite superior que foi reportada para a proteína viral nativa homóloga do VBI, a qual demonstrou uma variação de 51 a 54 kDa (SAIF, 1993).

Da mesma forma, quando os anticorpos policlonais presentes no antissoro de galinha contra o VBI foram usados na técnica de Western-blotting detectaram a presença de uma banda mais intensamente marcada também com 54 kDa, a qual migrou mais lentamente em relação a proteína N do VBI, marcada pelos mesmos anticorpos, assim como outras proteínas menores que também foram marcadas intensamente (Figura 7). O fato de tais anticorpos produzidos em galinhas hiperimunizadas com a estirpe M41 do VBI terem apresentado reatividade cruzada com a proteína N recombinante produzida pela bactéria *E. coli*, confirma o elevado grau de homologia dessa proteína com a proteína N do próprio vírus e caracteriza também a sua identidade imunológica com a nucleoproteína oriunda do próprio VBI.



**Figura 6.** Análise da produção da proteína N recombinante no sistema de expressão que utiliza células de *E. coli* da linhagem BL21. (A) SDS-PAGE (B) Western blotting. Foi usado o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:25000. (A e B) As amostras correspondem, respectivamente; Linhas: (M) Marcador de Massa Molecular, ( Bench Marck – Invitrogen), (1) Proteína recombinante do nucleocapsídeo da estirpe M41, expressa em *E. coli*, purificação em resina de Níquel-sepharose.(2) Extrato bruto das proteínas de células de *E. coli* transformadas com a construção plasmidial pET28a-N-M41 (3) Extrato bruto das células de *E.coli* transformadas somente com o vetor pET28a, sem o inserto clonado. A seta indica a banda correspondente a proteína N recombinante do VBI (~54 KDa).



**Figura 7.** Visualização em membrana de PVDF- Western blottig da amostra do extrato bruto da cultura de *E. coli*, após indução da expressão, em pequena escala. Foi usado o soro policlonal de galinhas hiperimunizadas com o VBI. Linhas: (M) Marcador de Massa Molecular (Bench Marck – Invitrogen); (1) Estirpe M41 do VBI concentrada com PEG; (2) Extrato de *E. coli* transformada com a construção plasmidial pET28a-N-M41, contendo o inserto correspondente ao gene N da estirpe M41 do VBI. As setas indicam a marcação da banda correspondente à proteína N da suspensão concentrada do VBI ou a proteína N recombinante presente no extrato protéico total de *E. coli* transformada.

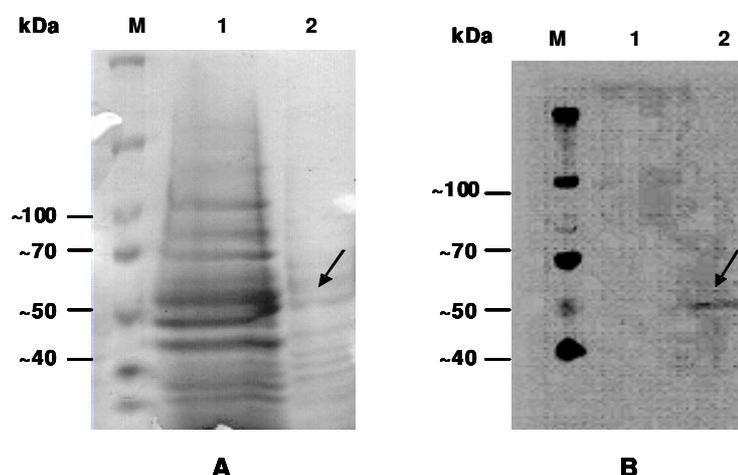
Foi também demonstrado, através da técnica de Western-blotting (Figura 7), um elevado grau de homologia antigênica entre a proteína N recombinante produzida em *E. coli* e a proteína nativa do próprio VBI, pois os anticorpos presentes no soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe M41 do VBI foram capazes de reconhecer a proteína recombinante da mesma forma que interagiram com a proteína análoga obtida da suspensão concentrada do VBI em líquido cório alantóide infectado com esse mesmo vírus. Deve ser ressaltado que resultados semelhantes de avaliação da antigenicidade de proteína N recombinante de coronavírus aviários foram obtidos por NDIFUNA et al. (1998), com o VBI e por LOA et al. (2004), com o TCoV.

Com respeito aos procedimentos de clonagem e a expressão pelo sistema pFLD – *P. pastoris*, deve ser destacado que depois de se ter sido obtida a construção plasmidial contendo o inserto do gene N no vetor pFLD, uma amostra de DNA plasmidial foi linearizada com a enzima *Cla* I, purificada e utilizada na reação de

transformação das células de *P. pastoris* da linhagem GS115, através da eletroporação, o que proporcionou o crescimento de clones transformantes no meio seletivo. Dentre esses clones, foi escolhido um para a indução da expressão, em pequena escala da proteína N recombinante do VBI nesse sistema. Decorridas 96 horas após a indução com metanol, o extrato protéico total foi obtido através da lise do sedimento de células previamente separadas por centrifugação, bem como foi testada uma alíquota do sobrenadante, tendo sido obtida apenas do primeiro extrato, isto é, no compartimento intracelular, uma concentração muito reduzida de proteínas totais e igual a 0,250 mg/mL, que ao ser analisado por SDS-PAGE (Figura 8A) e no Western blotting, utilizando o anticorpo monoclonal anti-polihistidina (Figura 8B) revelou a presença de uma banda fracamente marcada e com um tamanho aproximado de 54 kDa. Ainda, deve ser enfatizado que o extrato protéico obtido de células da mesma linhagem dessa levedura transformadas com o vetor sem o inserto do gene N não apresentaram nenhuma marcação com esse mesmo anticorpo monoclonal. Estes resultados demonstram que houve uma baixa eficiência na produção, em pequena escala, da proteína N recombinante do VBI no sistema de expressão que utilizou a levedura *P. pastoris* da linhagem GS115 transformada com a construção plasmidial pFLD-N-M41.

Com respeito às dificuldades verificadas na expressão da proteína N do VBI pelo sistema de *P. pastoris*, deve ser lembrado que uma eficiência muito baixa para expressão de proteína recombinante heteróloga foi relatada na tentativa de produção da proteína S1 recombinante de outro coronavírus, o vírus da SARS, pelo sistema combinando o vetor pPIC9K– *Pichia pastoris*, sobretudo quando se fez a comparação com o sistema constituído por células de *E. coli* da linhagem BL21 (LU et al., 2006). A razão para esse insucesso foi vinculada por esses autores à presença de regiões abundantes A + T na sequência do gene de interesse a ser clonado e expresso, a qual funciona como alça de poliadenilação em *P. pastoris*, resultando em terminação não apropriada do processo de transcrição do gene da proteína heteróloga recombinante. Há, então, que se levar em conta que no mínimo esta condição possui algo em comum com os resultados de nosso trabalho e pode ser uma das prováveis causas do

insucesso na expressão da proteína N do VBI pelo sistema de expressão que utiliza a levedura *P. pastoris*, empregado em nosso estudo.



**Figura 8.** (A e B) Análise da produção heteróloga através da técnica de SDS-PAGE (A) e Western-blotting (B) da fração bruta da proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI em *P. pastoris*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina. As amostras correspondem, respectivamente; Linhas (M), Marcador de Massa Molecular de proteínas “Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas), Linha (1), Extrato bruto de proteínas de células transformadas de *P. pastoris* somente com o vetor pFLD, sem o inserto clonado, Linha (2), Extrato bruto de proteínas de células transformadas de *P. pastoris* com o vetor pFLD + o inserto do gene N da estirpe M41 do VBI. A seta indica a banda correspondente a proteína N recombinante do VBI (~54 KDa).

Por outro lado deve ser considerado também que a proteína N do coronavírus da SARS, que é uma proteína heteróloga análoga à proteína N do VBI foi produzida de forma bem sucedida e em quantidades significativas pelo sistema constituído pelo vetor pPIC3,5K – *P. pastoris*, sendo que o processo de indução foi realizado em pequena escala, usando frascos erlenmeyer em incubadoras com agitação orbital (LIU et al., 2004), tal como foi em grande parte empregado no nosso estudo. Deve ser ressaltado, entretanto, que o vetor escolhido na investigação acima foi diferente daquele que foi utilizado por nós e, em adição a isso, os autores avaliaram diferentes meios de cultura, tanto na fase de pré-indução, como de indução, bem como as condições ideais de aeração, de pH e da concentração de manutenção do agente indutor, o metanol,

enquanto que em nosso estudo, foi seguido um protocolo básico recomendado pelo fornecedor do vetor (“pFLD and pFLD $\alpha$  - *Pichia pastoris* expression vectors” - Invitrogen).

A propósito deve ser ressaltado neste ponto, que a escolha feita em nosso trabalho pelo vetor pFLD deu-se em razão de este vetor incluir sequencias de nucleotídeos extras para permitir a expressão da proteína heteróloga com uma cauda de poli-histidina, com vistas a facilitar o processo de detecção e de purificação depois de expressar tal proteína recombinante.

Além disso, podem ser levantadas suspeitas sobre a não adequação do vetor pFLD a linhagem GS115 de *P. pastoris*, embora não haja nenhuma recomendação em contrário nas diretrizes dos protocolos para clonagem e expressão de proteínas heterólogas recombinantes por tal vetor (“pFLD and pFLD $\alpha$  - *Pichia pastoris* expression vectors” - Invitrogen). Fica, nesse caso, a dúvida, que poderia ser dirimida e investigada no futuro; por exemplo, tentando se fazer uma nova construção do inserto do gene N do VBI no vetor pPIC para ser usado na transformação de células de *P. pastoris* da mesma linhagem GS115.

## 2.4 CONCLUSÃO

O sistema de expressão que utiliza células de *E. coli* da linhagem BL21 transformadas com a construção plasmidial pET28a-N-M41 apresentou, em nosso estudo, um conjunto considerável de vantagens em relação ao sistema de expressão que utiliza células de *P. pastoris* da linhagem GS115 transformadas com a construção pFLD-N-M41, para a produção da proteína N recombinante a qual tem um grande potencial para ser utilizada de forma bem sucedida no sorodiagnóstico ou em investigações sobre a imunidade da bronquite infecciosa.

## 2.5 REFERÊNCIAS

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.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

CHANG, S.; YOUN, L.; CHANG, L.; HWAN, S. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus **J. Gen. Virol.**, London, v. 79, p. 719-723, 1998.

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

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F.; SENA, J. A.; GIVISIEZ, P. E.; FURUYAMA, C. R.; MONTASSIER, H. J. Development and application of a *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

GUY, J. S.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. J.; PAKPINYO, S. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of turkey coronavirus antibodies. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 46, n. 2, p. 334-341, 2002.

LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T<sub>4</sub> bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, p. 680-681, 1970.

LIU, R-S.; YANG, K.-Y. LIN, J.; LIN, Y.-W.; ZHANG, Z.-H.; ZHANG, J.; XIA, N-S. 15 High-yield expression of recombinant SARS Coronavirus nucleocapsid protein in 16 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **World J. Gastroenterol.**, Hudson, v. 10, n. 17, p. 3602-3607, 2004.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

LU, H.; YANG, G.; FEI, X.; GUO, H.; TAN, YADI.; CHEN, H.; GUO, A. Modification of SARS-CoV S1 gene render expression in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, Norwell, v. 33, n. 3, p. 329-335, 2006.

LUGOVSKAYA, V. V.; SCHERBAKOV, A. V.; YAKOVLEVA, A. S.; TSYVANYUK, M. A.; MUDRAK, N. S.; DRYGIN, V. V.; BORISOV, A. V. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 292-296, 2006.

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.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 20, n. 4, p. 663-673, 1991.

SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 37, n. 33, p. 285-297, 1993

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 957 p.

SEO, S. H.; WANG, H. L.; SMITH, R.; COLLISON, E. W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SNEED, L. W.; BUTCHER, G. D.; PARR, R.; WANG, L.; COLLISON, E. W. Comparisons of the structural proteins of avian bronchitis virus as determined by Western-Blotting analysis. **Viral Immunol.**, New Rochelle, v. 2, p. 221-227, 1989.

TOWBIN, H.T. STAETHETIN, A.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sc., U.S.A.**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

WILLIAMS, A.K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

### **CAPÍTULO 3 - APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DOS TESTES IgG / IgM-ELISA COM A NUCLEOPROTEÍNA VIRAL RECOMBINANTE**

**RESUMO** - O presente estudo teve como finalidade determinar os perfis de produção dos isótipos de anticorpos IgG e IgM contra o vírus da Bronquite Infecciosa (VBI). Para tanto, foram testadas amostras de soro sanguíneo colhidas de aves experimentalmente infectadas, ou de lotes de aves provenientes de criações comerciais com suspeita de infecção. O método indireto de ELISA usando a nucleoproteína recombinante do VBI como antígeno foi empregado para a detecção de anticorpos anti-VBI. Nas aves experimentalmente infectadas a soro-conversão, foi detectada mais precocemente para os anticorpos da classe IgM, que atingiram a máxima concentração no 10º dia pós-infecção, ocasião em que os níveis de IgG começaram a ser detectados, atingindo um pico com 15 dias pós-infecção, sendo que os anticorpos desse e do isótipo IgM decaíram no 20º dia p.i. Entre as aves suspeitas de infecção pelo VBI, os anticorpos do isótipo IgM foram detectados em níveis mais elevados e em um maior número de amostras de soros de aves de campo suspeitas de infecção pelo VBI, ao passo que os anticorpos IgG apresentaram níveis menores e em um menor número dessas mesmas amostras. Esses resultados indicam que as aves infectadas com o VBI produzem anticorpos dos isótipos IgM e IgG que apresentam forte reatividade com a proteína N recombinante desse vírus, sendo que os anticorpos do primeiro isótipo aparecem antes no soro sanguíneo em resposta à infecção por esse vírus. Concluindo, o ELISA feito com a proteína N recombinante pode ser usado para a detecção de anticorpos, especialmente do isótipo IgM, em aves infectadas pelo VBI, com a vantagem de poder ser usado no sorodiagnóstico de aves recém-infectadas.

**Palavras-Chaves:** Coronavírus aviário, isótipos de imunoglobulinas, soro-conversão, galinhas, frangos de corte

### 3.1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus de aves domésticas (espécie *Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves (CAVANAGH, 2007). A BI se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e altamente infecciosa, acompanhada, não raro, por lesões significativas dos tratos respiratório e uro-genital. Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de se disseminar rapidamente e acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com consequentes perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola.

As infecções agudas provocadas pelo VBI podem ser diagnosticadas por métodos diretos como o isolamento viral, técnicas moleculares (RT-PCR), tais testes de imunofluorescência e imunoperoxidase, e também por métodos indiretos, tais como as diferentes técnicas sorológicas que são usadas para detecção de anticorpos induzidos pelo VBI. Geralmente, essas últimas técnicas buscam detectar a soroconversão, usando-se amostras pareadas de soros, colhidas com intervalos de algumas semanas (De WIT et al., 1997). Esse tipo de análise sorológica de soros pareados é mais cara e não prática porque ela requer várias semanas para ser concluída. A alternativa a esse procedimento é a detecção de resposta de anticorpos anti-virais específicos do isótipo IgM (MOCKETT & COOK, 1986; MARTINS et al., 1991, De WIT et al., 1998). Foi relatado que a resposta de IgM é mais precoce e pouco duradoura após o início da infecção ou da vacinação, de forma que apenas uma amostra de soro poderia ser suficiente para confirmar a ocorrência de soroconversão induzida pelo estímulo viral decorrente da infecção ou da imunização.

Várias são as opções de técnicas sorológicas que foram ou tem sido usadas de forma efetiva para o imunodiagnóstico do VBI, como a vírus-neutralização, inibição da hemaglutinação e os ensaios imunoenzimáticos. Dentre elas, esta última, através do formato de ELISA, realizado com padrões apropriados, têm-se destacado por sua

capacidade de indicar de maneira acurada os níveis de anticorpos específicos anti-VBI em amostras de soros de aves infectadas ou vacinadas, podendo contribuir de forma relevante no imunodiagnóstico e na avaliação e monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (MARQUARDT et al., 1981; SNYDER et al., 1983).

Atualmente, suspensão purificada do VBI por ultra-centrifugação em gradiente de sacarose é rotineiramente usada para ser adsorvida, na primeira etapa da reação, ao suporte sólido (superfície da cavidade da microplaca), dentro do desenho dos atuais kits comerciais de ELISA. Vários são os problemas e limitações advindas dos protocolos de purificação de um vírus envelopado como o VBI (NDIFUNA et al., 1998). Em adição a isso, preparações antigênicas similares têm sido usadas na detecção e mensuração de isótipos de anticorpos contra o VBI, como IgG, IgM e IgA (De WIT, 1998, 2000).

A alternativa a esse tipo de antígeno são as preparações de proteínas estruturais recombinantes do VBI, particularmente a proteína de nucleocapsídeo produzidas em sistemas procariotos, como a *E. coli*, e eucariotos como as leveduras e células de insetos transfectadas com vetores de baculovírus (CHEN et al., 2003; GIBERTONI et al., 2005; NDIFUNA et al., 1998). Nesse sentido, sabe-se que a nucleoproteína (N) do VBI é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus e tem sua estrutura altamente conservada, nas diferentes estirpes variantes, além de ser altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos (SEAH et al., 2000). Desta forma, a proteína N se constitui em um antígeno (Ag) ideal para se fazer o desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra o VBI, como o ELISA (NDIFUNA et al., 1998; SAIF et al., 1993).

No entanto, tal método de ELISA com esse tipo de Ag recombinante, nunca foi utilizado para a detecção/mensuração dos isótipos IgG e IgM de Acs anti-VBI específicos. Assim sendo e já tendo disponível uma preparação de Ag da proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI produzida em *E. coli*, foi conduzido o presente estudo, visando a mensuração de anticorpos anti-VBI de cada um desses 2 isótipos em aves oriundas de grupos vacinados e não-vacinados, com suspeita de infecção pelo VBI e também de aves infectadas experimentalmente.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Antígeno para o ELISA (Proteína N recombinante)

Os procedimentos usados para a produção da proteína N recombinante do VBI da estirpe M41 em *E. coli* foram descritos anteriormente no capítulo 2 dessa tese. Em resumo, a partir da suspensão do líquido córion-anlantóide infectado com a estirpe M41 do VBI foi extraído o RNA viral pelo método de Trizol LS (Invitrogen), o qual foi submetido a reação de transcrição reversa com o uso de “Random Primers” (GIBERTONI et al., 2005). O cDNA obtido foi então usado na amplificação do gene da nucleoproteína (1230 pb), usando-se os oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base nas regiões mais conservadas das extremidades 5’ e 3’ da ORF do gene N, de forma que contivessem os sítios de enzimas de restrição compatíveis com os sítios de entrada no vetor de expressão pET28a (Novagen), a fim de promover a clonagem direcionada do inserto no vetor pET28a. Os “amplicons” obtidos foram clonados inicialmente no vetor pGEM – T Easy (Promega) e depois de confirmada a sua presença e feito o sequenciamento de nucleotídeos, ele foi digerido com as enzimas apropriadas para subclonagem no vetor de expressão em *E. coli* (pET28a). Após a transformação de células de *E. coli* da linhagem BL21 com a construção plasmidial pET28a-N-M41 um clone foi selecionado para avaliar a produção da proteína recombinante, usando o indutor Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) na concentração final de 0,2 mM, que foi adicionado na fase log à cultura de *E. coli* da linhagem BL21, para indução da produção da proteína recombinante fusionada a seis resíduos de Histidina (6xHis). O precipitado celular da cultura contendo a proteína recombinante foi ressuspendido em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM de PMSF, 1mM de Pepstatina e 0,5 mM de Aprotinina). As células foram lisadas em um sonicador Sonics Vibra Cell (Sonics & Materials, VC x 500). O lisado celular foi centrifugado a 12.000  $\times g$  durante 10 minutos a 4°C. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) baseado no método de (BRADFORD, 1976). A fração solúvel do precipitado celular foi então aplicado em uma coluna cromatográfica contendo a resina de níquel-sepharose (GE Healthcare).

Após realizar a lavagem da coluna para promover a remoção das proteínas contaminantes a proteína N recombinante foi eluída com o tampão contendo 500mM de Imidazol. A fração protéica eluída foi examinada através de SDS-PAGE e de Western-blotting, usando-se nessa última anticorpos monoclonais anti-poli-histidina.

### **3.2.2 Método indireto de ELISA com a proteína N recombinante para a detecção de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgM e IgG (IgM / IgG - Ec-N- ELISA)**

O método indireto Elisa (Ec-Nv-ELISA) utilizado para a detecção de anticorpos contra o VBI, foi baseado em linhas gerais, no procedimento descrito por GIBERTONI, et al., 2005. Inicialmente, foi realizada uma titulação em bloco, adsorvendo-se à superfície das cavidades da microplaca 4 diferentes concentrações da proteína N recombinante, (0,125µg/mL a 1,0µg/mL), para reagir com 6 diluições seriadas de razão 2 dos soros de referência positivo e negativo para o VBI (1:100 até 1:3200). Ao final foi determinada a concentração ideal de uso da proteína N recombinante utilizada como antígeno do método indireto de ELISA e a diluição ideal única de soro de galinha, sendo que, para a detecção da interação dos anticorpos com a proteína N recombinante, foram utilizados os conjugados imunoenzimáticos anti-IgM e anti-IgG de galinha com a enzima peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) em suas diluições ideais de uso e, na etapa final, foi utilizada a mistura de substrato cromógeno composta por peróxido de hidrogênio e orto-fenileno-diamina.

A reação colorimétrica enzimática foi bloqueada após 15 minutos de incubação com HCl 1N, sendo posteriormente feitas as leituras das densidades ópticas (DOs) geradas em leitor de ELISA, usando-se o comprimento de onda de 492 nm, bem como as DOs obtidas foram transformadas em valores da relação amostra / positivo (A/P), tal como recomendam GIBERTONI et al. (2005). O ponto de corte foi estabelecido com base nos resultados obtidos pelo Ec-Nv-ELISA na análise de 12 soros de galinha negativos para o VBI e de forma que tal parâmetro fosse determinado a partir da média do valor  $A/P \pm 3x$  desvio-padrão dessas amostras séricas negativas.

### **3.2.3 Soros de referência anti-VBI**

O soro policlonal de galinha contra a estirpe M41 (soro de referência positivo) foi preparado por meio de processo de hiperimunização de 12 galinhas adultas SPF, que foram mantidas em isolador com pressão positiva. Essas aves receberam por via óculo-nasal (1 gota por via) de suspensão viral contendo  $10^{4.5}$  DIE<sub>50</sub>/ml, tendo sido repetidas 3 inoculações com intervalos de 14 dias entre cada uma delas. Depois de 14 dias da última inoculação as aves foram sangradas e separou-se o soro, que foi armazenado a -20°C, até o momento do uso.

### **3.2.4 Amostras de soro de aves de corte infectadas experimentalmente com a estirpe M-41 do VBI para a determinação da cinética da produção de anticorpos anti-virias específicos dos isótipos IgG e IgM**

Vinte e quatro galinhas SPF da linhagem "White Leghorn" foram divididas em dois grupos de 12 aves cada um e, sem seguida, colocadas em dois isoladores com pressão positiva. O primeiro grupo foi desafiado, aos 21 dias de idade, por via óculo-nasal com  $10^{4.5}$  DIE<sub>50</sub>/ave da estirpe virulenta M41 do VBI, enquanto que as aves do segundo grupo não foram infectadas e permaneceram como controle negativo. Amostras de sangue foram colhidas nos intervalos pós-infecção de 1, 5, 10, 15 e 20 dias para serem dessoradas e, posteriormente armazenadas a -20°C até o momento de serem analisadas pelos testes de Ec-N-IgG-ELISA e de Ec-N-IgM-ELISA .

### **3.2.5 Amostras séricas de campo**

Um total de 231 amostras de soro de galinhas foram colhidas de diferentes granjas de produção de frangos de corte ou de aves de postura, que foram separadas em 3 grupos com base na presença de infecção pelo VBI e no emprego ou não de vacinação contra esse mesmo vírus, consoante o que está descrito na Tabela 2. Ainda, deve-se esclarecer que a infecção pelo VBI, nos grupos de aves classificadas como

infectadas foi detectada por RT-PCR (MONTASSIER et al., 2008) e, no caso dos grupos de aves vacinadas foram usadas vacinas comerciais formuladas com a estirpe atenuada H120 do VBI (genótipo / sorotipo Massachusetts). Todas as amostras foram analisadas pelos métodos indiretos de IgM/IgG-EC-N-ELISA.

**Tabela 2.** Composição dos grupos de aves de campo para a colheita de amostras séricas, segundo a presença de infecção pelo VBI e de uso de vacinas.

GRUPOS	TIPO DE AVE	VACINA/VBI	INFECÇÃO/VBI
G1-N=102	Corte	Não vacinado	Infectadas
*G2-N=50	Corte	1 vacina	Infectadas
**G3-N=79	Postura	+2 vacinas	Infectadas

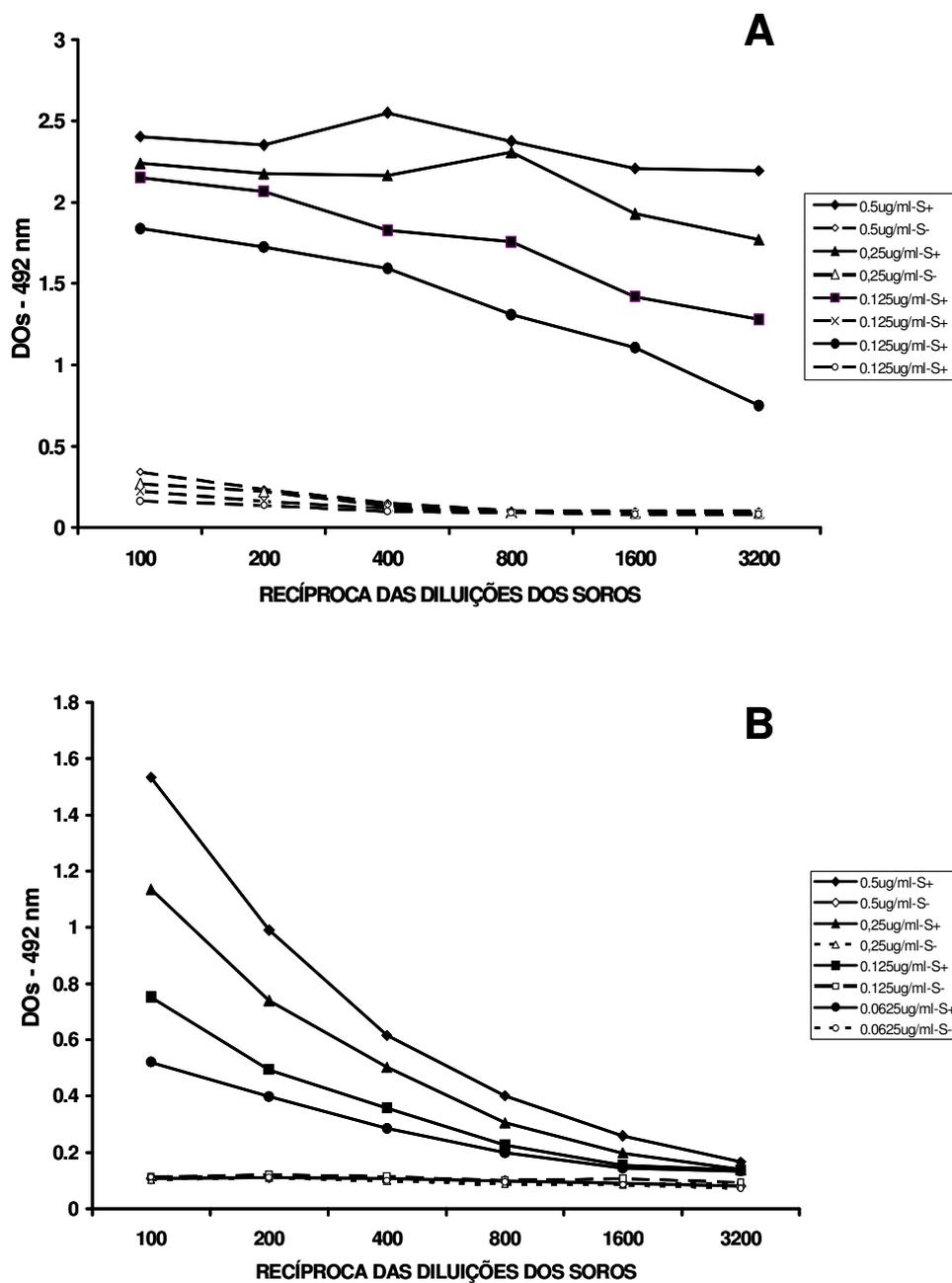
\* Amostras colhidas 30 dias após a última imunização

\*\* Amostras colhidas 30 dias após ou mais da última vacina

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Titulação em bloco da proteína N recombinante e dos soros

A titulação em bloco realizada no método indireto de ELISA com a proteína N recombinante produzida em *E. coli* submetida à análise de soros de referência positivo e negativo de galinhas tanto para a detecção de anticorpos do isótipo IgG como IgM contra a estirpe M41 do VBI, demonstrou que as reatividades de cada um dos isótipos de anticorpos, mensurada pelos valores de DOs, apresentaram uma variação do tipo dose-resposta, isto é, aumentaram com o incremento nas concentrações da proteína N usada como antígeno e diminuíram, à medida em que os soros foram mais diluídos. Uma diferença mais marcante foi, contudo, observada na titulação dos anticorpos do isótipo IgG em relação ao isótipo IgM, sendo que os anticorpos anti-VBI do primeiro isótipo proporcionaram DOs de magnitudes mais elevadas do que as desse último isótipo. Uma vez que as amostras de soro de referência positivo e negativo revelaram resultados bem mais distintos na concentração do antígeno equivalente a 0,125µg/mL e nas diluições de 1:800 para o isótipo IgG e de 0,5µg/mL do antígeno e 1:400 para o isótipo IgM, passou-se a usar estas diluições para testar as amostras de soro de aves vacinadas e não-vacinadas e com suspeita de infecção pelo VBI (Figura 9). Ainda, a análise de 12 amostras de soros de aves não infectadas e não vacinadas (grupo controle negativo) revelou pontos de corte equivalentes aos valores A/P de 0,079 e de 0,060 (média do valor A/P  $\pm$  3 desvios padrão), respectivamente para o IgM-Ec-N-ELISA e IgG-Ec-N-ELISA.

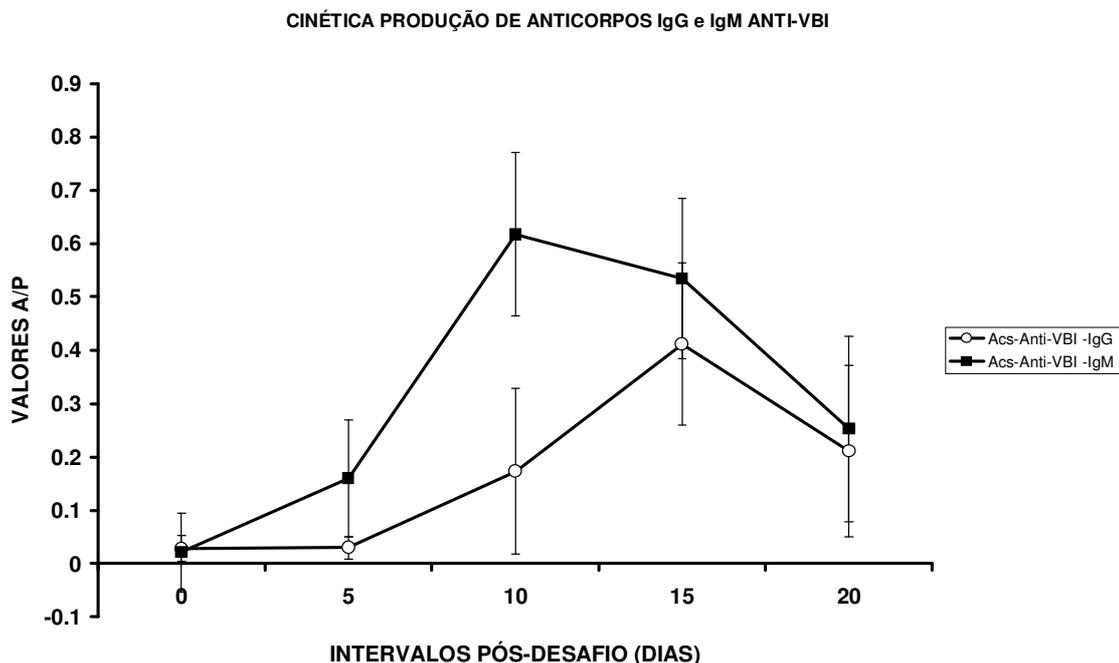


**Figura 9.** Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de diversas diluições de soros de galinha positivos e negativos de referência para o VBI, frente a diferentes concentrações de proteína N recombinante produzida em *E. coli* linhagem BL21 e transformados com a construção plasmidial pET28a-N-M41 para a detecção dos isótipos IgG (A) e IgM (B) de anticorpos contra o VBI.

### 3.3.2 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA-VBI para a detecção de anticorpos específicos em aves experimentalmente infectadas.

A Figura 10 mostra que, no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia p.i. os anticorpos anti-VBI e pertencentes aos isótipos IgG e IgM, foram detectados no soro sanguíneo de aves de corte infectadas experimentalmente com a estirpe M41 do VBI pelo teste Ec-N-ELISA, utilizando como antígeno a proteína N recombinante produzida em *E. coli*.

Pode-se, também, observar na Figura 10 o perfil cinético da produção desses dois isótipos de imunoglobulinas após a infecção experimental com a estirpe M41 do VBI. Dessa forma, níveis baixos e basais de anticorpos foram detectados nos dois primeiros intervalos p.i. analisados (dias 0 e 5 dias p.i.), embora os anticorpos da classe IgM tenham apresentado um aumento já no 5<sup>o</sup> dia p.i., ocasião em que nove de 12 aves infectadas experimentalmente revelaram-se IgM+, ao passo que nenhuma delas apresentou níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG acima do ponto de corte. Os níveis dos anticorpos IgM só atingiram concentrações mais altas no 10<sup>o</sup> dia pós-infecção, quando todas as aves apresentaram anticorpos desse isótipo, enquanto que para IgG sete dessas doze aves foram positivas. No intervalo de 15 dias p.i., o isótipo IgG de anticorpos anti-VBI, mostrou incrementos mais acentuados em suas concentrações, enquanto que o isótipo IgM demonstrou uma ligeira redução. No período pós-infecção subsequente (20 dias p.i.), ambos isótipos apresentaram um declínio mais acentuado. Um ponto interessante a ser ressaltado, nesses dois intervalos, é que foram encontrados praticamente o mesmo número de amostras positivas, tanto para IgM como para IgG; encontrando-se 11/12 e 12/12 aves IgG+, respectivamente ao 15<sup>o</sup> d.p.i e 20<sup>o</sup> d.p.i. ou 12/12 aves IgM+ para esses dois intervalos pós-infecção.



**Figura 10.** Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgG ou IgM em aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI determinada pelo IgG / IgM - Ec-N-ELISA usando a proteína N recombinante produzida em *E. coli* da linhagem BL21 e transformados com a construção plasmidial pET28a-N-M41. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios  $\pm$  D.P.

### 3.3.3 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA-VBI para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em amostras séricas de campo

Com relação à análise das amostras de campo colhidas em granjas de aves de corte não vacinadas ou de postura, infectadas pelo VBI e vacinadas ou não foram detectados níveis relevantes de anticorpos contra a nucleoproteína do VBI tanto da classe IgG como da IgM, embora houve um maior número de aves positivas para anticorpos desse último isótipo. Foram analisados um total de 231 amostras de soro sanguíneo para cada um desses isótipos. Resultados coincidentes foram obtidos para 160 amostras, sendo 113 positivas simultaneamente para os isótipos IgG e IgM e 47 foram classificadas como negativas para ambos isótipos. Por outro lado, 71 amostras

apresentaram resultados discordantes, sendo 51 positivos somente para os anticorpos do isótipo IgM enquanto que 20 amostras revelaram positividade somente para os anticorpos do isótipo IgG. A maioria dos resultados concordantes (IgG+/IgM+, ou IgG-/IgM-) ocorreram nas amostras séricas dos grupos 2 e 3, que foram constituídos por aves infectadas com o VBI e que haviam recebido uma ou mais vacinações contra esse vírus, enquanto que os resultados discordantes e em favor da positividade de IgM (IgG-/IgM+) predominaram nas aves do grupo 1, que foi composto por amostras de soros de aves infectadas e não vacinadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados do Ec-N-ELISA para detecção de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG e IgM em amostras de soro de aves infectadas pelo VBI.

Classificação das Amostras	GRUPOS DE AVES TESTADAS (%)			TOTAIS
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
Ec-IgM/IgG-N-ELISA	Não vacinadas	1 vacina	+ 2 vacinas	
<b>IgM<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup></b>	34 (33%)	19 (38%)	60 (67%)	113 (49%)
<b>IgM<sup>+</sup> IgG<sup>-</sup></b>	32 (31%)	07 (14%)	12 (13%)	51 (22%)
<b>IgM<sup>-</sup> IgG<sup>+</sup></b>	09 (8%)	05 (10%)	16 (18%)	20 (8%)
<b>IgM<sup>-</sup> IgG<sup>-</sup></b>	27(26%)	19 (38%)	01 (1%)	47 (20%)
<b>TOTAIS</b>	102	50	79	231

### 3.4 DISCUSSÃO

Na indústria avícola, rotineiramente muitas amostras são colhidas e analisadas por ocasião da suspeita da ocorrência de doenças infecciosas ou no monitoramento da resposta imune pós-vacinal, de forma que se torna cada vez mais necessário o acesso a metodologias de execução mais simples e econômicas. Assim, é fundamental que estejam disponíveis reagentes eficientes e baratos, que ofereçam boa reprodutibilidade quando usados em ensaios sorológicos. Ademais, uma parcela importante de reagentes sorológicos ideais para aplicação no imuno-dagnóstico, depende da existência ou do preparo de antígenos purificados, em especial, aqueles derivados de patógenos virais, particularmente os vírus aviários, que via de regra, necessitam de ovos embrionados SPF para serem propagados (NDIFUNA et al., 1998; LOA et al., 2004).

Os nossos resultados inicialmente obtidos na padronização dos métodos IgM / IgG-Ec-N-ELISA para a detecção de anticorpos anti-VBI, não só estão em consoância com os achados de estudos prévios que haviam destacado que a proteína de nucleocapsídeo do VBI, além de ser bastante imunogênica, conserva elevada antigenicidade sendo muito efetiva para a detecção de anticorpos anti-VBI; ou sob a forma de imunoglobulinas totais, ou ainda do isótipo IgG (SNEED et al., 1989; WILLIAMS et al., 1992, SEO et al., 1997, NDIFUNA et al., 1998, CHEN et al., 2003, GIBERTONI et al., 2005), como também caracterizam novas propriedades e novas aplicações potenciais como a sua utilidade na detecção de anticorpos anti-VBI do isótipo IgM.

Além disso, investigações anteriores sobre o sorodiagnóstico da infecção pelo VBI e que empregavam ensaios convencionais de ELISA realizados com preparações purificadas do VBI como antígeno adsorvido à fase sólida, registraram, tal como foi evidenciado aqui, que os anticorpos do isótipo IgM são produzidos e, conseqüentemente, detectados mais precocemente do que os anticorpos do isótipo IgG (De WIT et al., 1998, THOMPSON et al., 1997). Dessa forma, fica mais fácil entender a razão de que o método indireto de ELISA, por nós desenvolvido com a proteína N recombinante desse vírus como antígeno e conjugados imuno-enzimáticos apropriados,

foi também efetivo em detectar, tal como ficou demonstrado na avaliação da cinética da resposta imune humoral em aves experimentalmente infectadas, os anticorpos do isótipo IgM. Tais anticorpos são geralmente produzidos em uma fase inicial da resposta imune humoral, que ocorre logo após a infecção e precede a produção dos demais isótipos de anticorpos, com a vantagem, ainda, de que não seria necessário serem testadas amostras pareadas de soro, que são requeridas para se identificar o fenômeno da soro-conversão, que é necessária para o caso de se estar procurando os anticorpos anti-virais do isótipo IgG (De WIT et al., 1998).

Portanto e com base nas explicações acima, pode-se entender a aparente maior sensibilidade do teste de Ec-N-ELISA para a detecção de anticorpos IgM anti-VBI do que para a detecção de anticorpos anti-virais do isótipo IgG, tal como revelaram os resultados de nosso estudo com amostras séricas provenientes de aves infectadas pelo VBI.

Os resultados do teste Ec-N-ELISA empregado nesse estudo demonstraram claramente que os anticorpos dos isótipos IgG e IgM produzidos pelas aves submetidas à infecção com o VBI, apresentam um elevado nível de homologia antigênica com a proteína N recombinante expressa em bactéria. Observações muito semelhantes as nossas, só que para apenas para a detecção dos anticorpos do isótipo IgG, foram relatadas com a proteína N recombinante do VBI produzida em *E. coli* (NDIFUNA et al., 1998), ou com essa mesma proteína estrutural produzida em células de inseto por meio de baculovírus (CHEN et al., 2003). Com base nisso e no fato de se ter disponível uma preparação da proteína N recombinante do VBI produzida em *E. coli* e caracterizada imunoquimicamente, foi possível desenvolver e aplicar de forma efetiva o método indireto de ELISA, empregando como antígeno essa mesma proteína recombinante para mensurar anticorpos anti-virais específicos dos isótipos IgG e IgM presentes em amostras de soro de galinhas de postura vacinadas ou de frangos de corte submetidos à infecção experimental com o VBI.

No presente trabalho, deve-se destacar também que o método de IgM/IgG-Ec-N-ELISA foi capaz de mensurar os dois principais isótipos (IgG e IgM) induzidos no compartimento sistêmico (soro sanguíneo) após infecção com o VBI, tendo sido

encontrados perfis cinéticos distintos para a produção de cada um dos dois isótipos de anticorpos anti-VBI nas aves submetidas à infecção experimental com esse vírus. Deve-se ressaltar que perfis cinéticos semelhantes de respostas de IgM e de IgG, foram encontrados em estudos anteriores realizados por meio da aplicação de métodos indireto de ELISA usando partículas virais purificadas como antígeno (MARTINS et al, 1991, De WIT et al., 1998, THOMPSON et al., 1997). Além disso, foi observado na investigação de GIBERTONI et al. (2005), uma evolução cinética da produção de anticorpos séricos muito parecida com a do isótipo IgG registrada no presente estudo em aves infectadas e re-infectadas com o VBI, sendo que os autores utilizaram um método indireto de ELISA, cujo procedimento é praticamente idêntico ao que foi realizado nesse estudo, com exceção de que, ao invés de conjugados imunoenzimáticos anti-isótipos específicos de imunoglobulinas de galinhas, foi utilizado um outro conjugado anti-Igs totais de galinhas, que não distinguia a reatividade de cada um desses isótipos de imunoglobulinas, embora tenda a apresentar uma maior reatividade para os anticorpos do isótipo IgG.

Em síntese, deve-se salientar que a determinação das curvas cinéticas de respostas dos anticorpos anti-VBI das classes IgM e IgG oferecem um melhor embasamento para se entender e interpretar melhor os resultados de análises sorológicas com amostragens pontuais, permitindo inferir sobre a fase pós-infecção que as aves testadas se encontram, ou ainda se os anticorpos anti-virais foram induzidos por vacinação feita em períodos superiores a 30 dias anteriores ao da colheita das amostras. Portanto, a caracterização do perfil cinético das respostas imunes foi fundamental para se obter dados mais completos que permitissem definir um quadro mais detalhado da evolução da produção de anticorpos junto a estes compartimentos do sistema imune.

Assim, em consonância com a explanação acima, deve-se entender que a detecção tanto de um maior número de aves IgM+ no grupo 1, indica que muito provavelmente as aves pertencentes a esse grupo devem ter sofrido infecção mais recente com o VIB, tal como mostram os nossos resultados da cinética de produção de anticorpos IgM anti-N após a infecção experimental ou foram registrados em outros

estudos similares que empregaram testes de ELISA usando preparações purificadas do VBI (MARTINS et al., 1991, De WIT et al., 1998). Por outro lado, nas aves vacinadas dos grupos 2 e 3 não foi encontrada uma discrepância tão evidente e em favor da detecção de aves IgM+; provavelmente porque nelas já se estabeleceu uma memória para a resposta imune humoral, especialmente para os anticorpos IgG, não obstante deva-se desconsiderar a vantagem de se usar a detecção de IgM como indicativo de soro-conversão decorrente da proximidade com estímulos antigênicos exercidos pelo agente infeccioso, com o cuidado de avaliar no sentido de distinguir as respostas desse isótipo que podem ser induzidas por vacinas, que não deve ser aplicada para as aves desse estudo, uma vez que elas foram amostradas há mais de 30 dias.

### 3.5 CONCLUSÃO

Os anticorpos contra a proteína N recombinante do VBI, especialmente aqueles pertencentes ao isótipo IgM, são produzidos por aves recém-infectadas com esse vírus e demonstraram ser um excelente marcador de soroconversão nessas aves, usando-se um método indireto de ELISA que tem essa proteína recombinante como antígeno adsorvido à fase sólida. Além disso, os dois isótipos (IgG e IgM) de anticorpos, com especificidade para a nucleoproteína do VBI, são produzidos em níveis relevantes por aves infectadas e submetidas ou não à vacinação e às revacinações e apresentaram uma elevada reatividade com a proteína N recombinante derivada da estirpe M41 do VBI que foi produzida em *E. coli* nesse estudo.

### 3.6 REFERÊNCIAS

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.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.

CHEN, H.; COOTE, B.; HISCOX, J. A. Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 32, n. 5, p. 519-526, 2003.

De WIT, J. J.; MEKKES, D. R.; KOUWENHOVEN, B.; VERHEIJDEN, J. H. . Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n.1, p. 105-118, 1997.

De WIT, J. J.; MEKKES, D. R.; KOCH, G.; WESTBRINK, F. Detection of specific IgM antibodies to infectious bronchitis virus by an antibody-capture ELISA. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 27, n. 1, p. 155-160, 1998.

De WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n. 1, p. 71-93, 2000.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F. S.; SENA, J. A. D.; GIVISIEZ, P. E. N.; FURUYAMA, C. R. A. G.; MONTASSIER, H. J. Development and application of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 25, n. 3, p. 713-722, 1981.

MARTINS, N. R. S.; MOCKETT, A. P. A.; COOK, J. K. A. IgM responses in chickens serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 35, n. 3, p. 470-475, 1991.

MOCKET, A. P. A.; COOK, J. K. A. The detection of specific IgM to infectious virus in chicken serum using ELISA. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 15, p. 437-446, 1986.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RLFP analysis of the S1 gene. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 190-194, 2008.

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

SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 37, n. 33, p. 285-297, 1993.

SEAH, J. N.; YU, L.; KWANG, J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 11-16, 2000.

SEO, H. S.; WANG, L.; SMITH, R.; GLISSON, E. W. The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of infectious bronchitis virus, nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, p. 7889-7894, 1997.

SNEED, L. W.; BUTCHER, G. D.; PARR, R.; WANG, L.; COLLISON, E. W. Comparisons of the structural proteins of avian bronchitis virus as determined by Western-Blotting analysis. **Viral Immunol.**, New Rochelle, v. 2, p. 221-227, 1989.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, E. T.; SAVAGE, P. K.; ALLEN, D. C. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 25, p. 213-222, 1983

THOMPSON, G.; MOHAMMED, H.; BAUMAN, B.; NAQI, S. Systemic and local antibody response to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 41, n. 3, p. 519-527, 1997.

WILLIAMS, A. K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

## **CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DA PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO RECOMBINANTE DE UM NOVO ISOLADO DE CAMPO NO BRASIL DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA**

**RESUMO** - A região codificadora completa do gene da nucleoproteína (N) (1230 pb) de um novo isolado do VBI de surtos a campo no Brasil (IBVPR05) foi amplificada por RT-PCR e submetida a clonagem no vetor de expressão em *E. coli* pET28a(+), propiciando após indução com IPTG a produção da proteína N desse isolado fusionada com a cauda de poli-histidina, a qual foi caracterizada por SDS-PAGE e Western-blotting e purificada por cromatografia em níquel-sepharose. A proteína N recombinante desse novo isolado do VBI com cerca de 54 kDa e reatividade com anticorpos de galinhas hiperimunizadas com esse mesmo vírus, foi aplicada no método indireto de ELISA para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em amostras de soros de aves que foram infectadas pelo VBI, proporcionando boa sensibilidade e especificidade comparativamente aos resultados do ELISA realizado com a proteína N derivada de estirpe de referência M41 na análise desses mesmos soros, resultando em elevada concordância entre esses testes. Concluindo, a proteína N recombinante do isolado variante de campo no Brasil, apesar de apresentar diferenças marcantes na composição de vários resíduos de aminoácidos pertencentes aos sítios antigênicos mais importantes dessa proteína, manteve a conservação de seus principais epítomos, acarretando a ocorrência de um elevado nível de reatividade cruzada com relação à proteína N recombinante da estirpe M41, não justificando, assim, a sua utilização no ELISA, no lugar, ou em adição a proteína N dessa última estirpe, para a detecção de anticorpos em aves infectadas por variantes do VBI.

**Palavras chaves:** Vírus da bronquite Infecciosa, Clonagem, Produção heteróloga, *Escherichia coli*, Imunodiagnóstico

## 4.1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é um dos membros da família *Coronaviridae*, contendo um genoma constituído por um RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6Kb que codifica a produção de 4 proteínas estruturais importantes; a proteína fosforilada do nucleocapsídeo (N), a glicoproteína de membrana (M), a glicoproteína de superfície do envelope viral (S), a qual é clivada pós-traducionalmente em S1 e S2 e ainda a proteína de envelope (E) (CAVANAGH, 2007).

A proteína N do VBI, que se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus e tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes do VBI (WILLIAMS et al., 1992), além de ser altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SNEED et al., 1989, SEO et al., 1997). Dessa forma, a proteína N do VBI se constitui no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos para a detecção/mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupo desse vírus, o que seria de grande utilidade para o imunodiagnóstico da infecção por este vírus (NDIFUNA et al., 1998).

Atualmente, predomina no imunodiagnóstico da bronquite infecciosa, o uso do método indireto de ELISA, o qual emprega, como antígeno adsorvido à fase sólida, ou suspensões de partículas íntegras do VBI purificadas por ultra-centrifugação, ou, com menor frequência, preparações da nucleoproteína recombinante inteira, ou em fragmentos, provenientes de amostras de referência do VBI, especialmente as estirpes GRAY, M41, H120 e H52 (CHEN et al., 2003; GIBERTONI et al., 2005; NDIFUNA et al., 1998). As maiores vantagens que são destacadas para a escolha de se utilizar a proteína N recombinante do VBI são, além do fato de simplificar o preparo do antígeno viral para esse ensaio sorológico, as propriedades imunoquímicas dessa proteína, com destaque para a sua elevada imunogenicidade e a sua maior conservação, acarretando uma maior reatividade cruzada com anticorpos de amostras séricas de aves infectadas com diferentes variantes do VBI, as quais, com frequência, estão circulando nos

plantéis avícolas de diversas partes do mundo, inclusive, por vezes rompendo a barreira imunitária específica induzida pelas vacinas comerciais (CAVANAGH, 2007).

No entanto, a avaliação da intensidade da reatividade cruzada da proteína N recombinante no método indireto de ELISA foi realizada somente com antissoros específicos para algumas estirpes de referência do VBI, como ocorreu na avaliação da proteína N derivada da estirpe Gray, com os antissoros homólogo e heterólogos (anti-M41 e anti-ARKDPI) (NDIFUNA et al., 1998).

Além disso, em estudos na Coreia e na Austrália sobre a epidemiologia molecular entre estirpes do VBI que foram isoladas na Austrália, foi demonstrado de forma inesperada que estava ocorrendo uma grande e extensa variação no gene codificador da proteína N e conseqüentemente nos aminoácidos que compõem os epítomos dessa mesma proteína (PARK et al., 2005, IGNJATOVIC et al., 2006).

Se for considerado, também, que em diversas regiões do Brasil, têm sido descritos desde os anos 80, inúmeros surtos de enfermidades respiratórias cujas características clínicas e patológicas são de bronquite infecciosa e das quais foram recuperados alguns isolados do VBI caracterizados, nas análises filogenéticas iniciais dos genes codificadores das proteínas estruturais (S1 ou N) ou não estruturais (RNA-polimerase), como bastante distintos daqueles já caracterizados para as estirpes de referência da América, Europa, Austrália ou da Ásia (ABREU et al., 2006, MONTASSIER et al., 2006, MONTASSIER, 2008, VILLARREAL et al., 2007), seria bastante oportuno avaliar a reatividade da preparação de proteína N recombinante de uma dessas variantes epidemiologicamente mais relevantes em técnicas sorológicas, de forma a se estabelecer qual a efetiva reatividade cruzada desse tipo de antígeno e seu potencial de aplicação no imunodiagnóstico da bronquite infecciosa.

Em face de todo o exposto, foi desenvolvido o presente trabalho com o objetivo de clonar e expressar o gene da proteína do nucleocapsídeo N de um novo isolado de surtos a campo do VBI no Brasil (IBVPR05) em um sistema procarioto de expressão, como se configuram as bactérias da espécie *E. coli*, de forma que essa proteína recombinante pudesse ser utilizada como antígeno para adsorção à fase sólida e no

desenvolvimento de um método indireto de ELISA para ser empregada no sorodiagnóstico da infecção pelo VBI.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Vírus

Foi utilizado o isolado de surtos a campo no Brasil, obtido do Laboratório de Virologia do Centro Nacional de Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, (CNPISA – EMBRAPA – Concórdia-SC), o qual foi caracterizado por MONTASSIER et al. (2006, 2008) como variante IBVPR05 do VBI, no que se refere ao gene S1 e ao do gene N. Esse vírus foi propagado na cavidade córion-alantóide de ovos embrionados, livres de patógenos específicos (SPF), com 9 a 11 dias de idade. Após 36 h de inoculação, os ovos foram resfriados a 4 °C, por no mínimo 4 h e, em seguida, o líquido córion alantóide (LCA) foi colhido.

### 4.2.2 Extração do RNA, RT-PCR e Clonagem do gene da nucleoproteína

A extração do RNA genômico viral, foi realizada a partir do LCA infectado com o isolado de campo IBVPR05 do VBI com o auxílio do reagente Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA), acrescentando-se, na preparação final, “RNA-Guard” (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). O cDNA foi obtido a partir de uma amostra de RNA genômico viral submetida à reação de transcrição reversa (RT), realizada com “Random Primes” e a enzima transcriptase reversa (Superscript™ – Invitrogen, Carlsbad, CA). O produto final obtido foi armazenado em freezer a –70°C.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados com base nas regiões mais conservadas das extremidades 5' e 3' da ORF do gene N e de maneira a que contivessem os sítios das enzimas de restrição compatíveis com os sítios de entrada no vetor de expressão pET28a, para promover a clonagem direcionada do inserto. A sequência dos oligonucleotídeos usados foi para o oligo iniciador sense (Pet-A), 5'-GGAATTCCCATATGGCAAGCGGTAAGGC-3' (o sítio de restrição da enzima *Nde* I está sublinhado) e para o oligo iniciador anti-sense, (Pet-B), 5'-CCGCTCGAGAAAGTTCATTCTCTCCTAG-3' (o sítio de restrição da enzima *Xho* I está

sublinhado). O cDNA codificador do gene N foi então amplificado pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) usando-se os oligonucleotídeos acima descritos juntamente com a enzima “Taq High Fidelity” e usando-se as seguintes condições de ciclos de incubação dessa reação: 95°C por 5 minutos e outro ciclo a 70°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos, sendo cada um deles composto por 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 68°C por 2 minutos e 30 segundos, e ainda com um ciclo de extensão final a 68°C por 10 minutos

O produto amplificado do gene N foi clonado diretamente no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformado células de *E. coli* da linhagem DH10B. De posse dos clones bacterianos transformantes foi separado o DNA plasmidial para se confirmar por meio de sequenciamento de nucleotídeos a presença do inserto do gene de interesse.

#### **4.2.3 Produção e purificação da proteína N recombinante do novo isolado de campo no Brasil (N-IBVPR05)**

Uma vez confirmada a identidade do fragmento clonado este foi retirado do vetor pGEM-T Easy por meio de digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I, e ligado ao vetor de expressão pET28a e, em seguida, as células competentes de *E.coli* da linhagem BL21 (DE3) pLys foram transformadas. IPTG na concentração final de 0,2 mM foi adicionado na fase log à cultura do clone transformado de *E.coli* da linhagem BL21, para indução da produção da proteína recombinante fusionada a seis resíduos de Histidina (6xHis). O sedimento celular da cultura contendo a proteína recombinante foi ressuspendido em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM de PMSF, 1mM de Pepstatina e 0,5 mM de Aprotinina).

A proteína N recombinante contendo a cauda de polihistidina foi purificada através da cromatografia de afinidade contendo a resina de níquel-sepharose (“Ni Sepharose High performance” GE Healthcare). A proteína N recombinante de fusão foi eluída com 500 mM de Imidazol (Sigma,USA) e as frações foram analisadas em géis SDS-PAGE de acordo com o método de LAEMMLI (1970). A concentração da proteína recombinante purificada foi determinada com base no método de BRADFORD (1976). As frações coletadas

correspondentes aos picos de absorvância, numa concentração final da fração contendo a proteína N recombinante purificada foi de cerca de 3,0 mg/L. Finalmente, a especificidade das proteínas N recombinantes foi analisada por Western blotting, utilizando um anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Sigma-Aldrich).

#### **4.2.4 Amostras de soros de galinha positivos e negativos para o VBI**

O soro policlonal de galinha contra a estirpe M41 (soro de referência positivo – M41) e contra o isolado IBVPR05 foram preparados por meio de processo de hiperimunização de dois grupos de seis galinhas adultas SPF cada um, que foram mantidas em isolador com pressão positiva. Essas aves receberam por via óculo-nasal 0,30µL de suspensão viral contendo  $10^{4.5}$  DIE<sub>50</sub>/mL, tendo sido repetidas 3 inoculações com intervalos de 14 dias entre cada uma delas. Depois de 14 dias da última inoculação as aves desses dois grupos foram sangradas e separou-se o soro, que foi armazenado a -20°C, até o momento do uso. Em adição a isso, amostras de seis aves SPF foram colhidas e utilizadas como soro de referência negativa.

#### **4.2.5 Amostras de soros de aves de campo suspeitas de infecção pelo VBI**

Um total de 128 amostras de soro de galinhas foram colhidas de diferentes granjas, que foram separadas em 5 grupos com base na presença ou não de infecção pelo VBI ou de emprego ou não de vacinação contra esse mesmo vírus, consoante o que está descrito na Tabela 4. Ainda, deve-se esclarecer que a infecção pelo VBI, nos grupos de aves classificadas como infectadas foi detectada por RT-PCR, tendo sido feita a caracterização de variante por RFLP do gene S1 (MONTASSIER et al., 2006, 2008) e, no caso dos grupos de aves vacinadas foram usadas vacinas comerciais formuladas com a estirpe atenuada H120 do VBI (genótipo / sorotipo Massachusetts). Todas as amostras foram analisadas pelos dois métodos indireto do ELISA, isto é, realizados ou com preparações da proteína N recombinante derivada do isolado IBVPR05 (Ec-N-IBVPR05-ELISA) ou da estirpe M41 do VBI (Ec-N-M41-ELISA).

**Tabela 4.** Composição dos grupos de aves de campo para a colheita de amostras séricas, segundo a presença ou não de infecção pelo VBI e de uso de vacinas

GRUPOS	TIPO DE AVE	VACINA/VBI	INFECÇÃO/VBI
G1-N=19	Corte	Não vacinado	Infectada c/isolado variante do VBI
G2-N=27	Corte	2 vacinas	Não infectada com VBI
*G3-N=22	Corte	2 vacinas	Infectadas c/isolado variante do VBI
**G4-N=40	Postura	+ 2 vacinas	Infectadas c/isolado variante do VBI
Controle-N=20	Corte/Postura	Não vacinado	Não infectadas

\* Amostras colhidas 30 dias após a última imunização

\*\* Amostras colhidas 30 dias após ou mais da última vacina

#### **4.2.6 Método indireto de ELISA com a proteína N recombinante do novo isolado de campo no Brasil do VBI (Ec-Nv-ELISA)**

O método indireto Elisa (Ec-Nv-ELISA) utilizado para a detecção de anticorpos contra o VBI, foi baseado em linhas gerais, no procedimento descrito por GIBERTONI, et al., 2005. Inicialmente, foi realizada uma titulação em bloco, adsorvendo-se a superfície das cavidades da microplaca 4 diferentes concentrações da proteína N recombinante, variando de 0,0625µg/mL a 0,5µg/mL, para reagir com 6 diluições seriadas de razão 2 dos soros de referência positivo e negativo para o VBI (1:100 até 1:3200). Ao final foi determinada a concentração ideal de uso da proteína N recombinante utilizada como antígeno do método indireto de ELISA e a diluição ideal única de soro de galinha, sendo que, para a detecção da interação dos anticorpos com a proteína N recombinante, foi utilizado o conjugado imunoenzimático anti-IgG de galinha com a peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) em sua diluição ideal de uso e a mistura de substrato cromógeno composta por peróxido de hidrogênio e orto-fenileno-diamina.

A reação colorimétrica enzimática foi bloqueada após 15 minutos de incubação com HCl 1N, sendo posteriormente feitas as leituras das densidades ópticas (DOs) geradas em leitor de ELISA, usando-se o comprimento de onda de 492 nm, bem como as DOs obtidas foram transformadas em valores da relação amostra / positivo (A/P), tal como recomendam GIBERTONI et al. (2005). O ponto de corte foi estabelecido com base nos resultados obtidos pelo Ec-Nv-ELISA na análise de 20 soros de galinha negativos para o VBI e de forma que tal parâmetro fosse determinado a partir da média do valor  $A/P \pm 3x$  desvio-padrão dessas amostras séricas negativas.

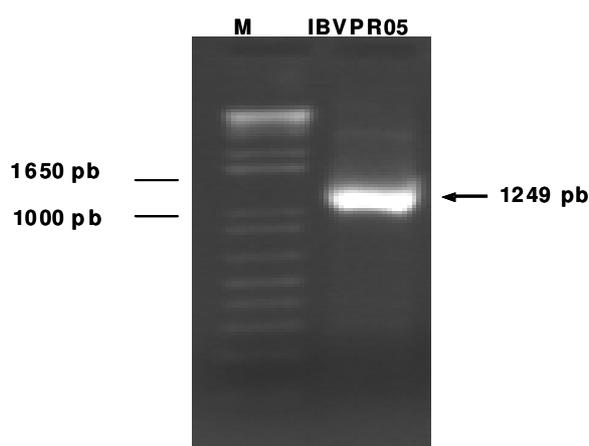
O mesmo procedimento descrito acima, exceto que com a utilização da proteína N recombinante derivada da estirpe M41, através do método indireto de Ec-N-M41-ELISA (GIBERTONI capítulo 3 dessa tese), foi empregado para a detecção de anticorpos nas amostras séricas de aves, de forma a se avaliar comparativamente a reatividade dos anticorpos para essas duas preparações antigênicas de proteína N recombinante (Nv e N-M41).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Clonagem e Análise das sequencias de nucleotídeos do gene N do novo isolado de campo no Brasil do VBI

A amplificação de toda a ORF do gene que codifica a proteína N do novo isolado de campo no Brasil IBVPR05 do VBI via RT-PCR foi comprovada por meio de eletroforese em gel de agarose do produto amplificado com o par de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para este estudo. Foi então observada a presença de uma banda com o tamanho esperado de aproximadamente 1249 pb, sendo 1230 pb da ORF do gene N e mais 19 pb de partes dos oligonucleotídeos iniciadores (Figura 11).

Em adição a isso, a clonagem da ORF completa do gene N do isolado IBVPR05 no vetor pGEM -T Easy ficou evidenciada pelos resultados do sequenciamento completo desta ORF, que revelou a presença de regiões mais conservadas e outras mais variáveis em relação a sequencia de nucleotídeos do gene N da estirpe M41 de referência do VBI ("GenBank"- M28566), de forma que foi obtida uma identidade de 88% do gene N desse isolado com relação à sequência de nucleotídeos do gene desta última estirpe de referência (Figura 12).



**Figura 11.** Amplificação dos segmentos gênicos do gene que codifica para a proteína N. M - Tamanho Molecular 1kb Plus DNA Ladder, (1) fragmento amplificado do gene N, do isolado de campo IBVPR05 com os oligonucleotídeos iniciadores específicos Pet-A e Pet-B e temperatura de anelamento de 48°C.

```

Query 1      ATGGCAAGCGGTAAGGCAGCTGGAAAAGACAGACGCCAGCCAGCCAGTCATCAAACCTAGGA 60
|||||
Sbjct 102    ATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAAAGACAGATGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACCTAGGA 161

Query 61     GGACCAAACACCTAAAGTTGGTTCTCCTGGAAATGCATCCTGGTTTCAGGCGTTAAAA 120
|||||
Sbjct 162    GGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGTTCTTCTGGAAATGCATCTTGGTTTCAAGCAATAAAA 221

Query 121    GCCAAGAAAATCAAATCACCTCCACTTAGTTTTGAAGGTAGTGGTGTTCCTGATAATGAA 180
|||||
Sbjct 222    GCCAATAAGTTAAATATACCTCCGCCCAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCCTGATAATGAA 281

Query 181    AATCTTAAACCAAGCCAGCAGCATGGGTACTGGAGACGTCAAGCCAGGTATAAGCCAGGT 240
|||||
Sbjct 282    AATCTAAAGTCAAGCCAGCAGCATGGATACTGGAGACGCCAAGCTACGTTTAAAGCCAGGC 341

Query 241    AAAGGTGGAAGAAAACCAAGTCCCAGATGCTTGGTACTTCTATTATACTGGAACAGGACCA 300
|||||
Sbjct 342    AAAGGTGGAAGAAAACCAAGTCCCAGATGCTTGGTATTTTACTATACTGGAACAGGACCT 401

Query 301     GCTGCTGATTTGAATGGGGTGATAGCCAAAGATGGTATAGTGTGGGTTTCTGCAAAGGGT 360
|| || |
Sbjct 402     GCCGCTAACCTGAATGGGGTGATAGCCAAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAAGGGT 461

Query 361     GCTGATACTAAATCAAGTCTAATCAGGGTACAAGAGACCCCTGACAAAGTTTGACCAATAT 420
|||||
Sbjct 462     GCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTACTCTGACAAAGTTTGACCAATAT 521

Query 421    CCTCTGCGATTCTCAGATGGAGGGCCTGATGGTAATTTCCGTTGGGACITTCATCCCTCTG 480
|| || |
Sbjct 522    CCGCTACGATTTTACAGACGGAGCCTGATGGTAATTTCCGTTGGGATTTCACTCTCTG 581

Query 481    AATCGTGGTAGGAGTGGTAGATCAACAGCAGCATCCTCAGCAGCATCTAGTAGAGCACCT 540
|| |
Sbjct 582    AATGGTGGTAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGCTTCATCAGCAGCATCTAGTAGAGCACCA 641

Query 541    TCGCGTGACGGTTTCGCGTGGACGTAGAAGCGGATCGGAGGATGATCTCATTGCACGAGCA 600
|| || |
Sbjct 642    TCACGTGAAGTTTTCGCGTGGTTCGACGAGTGGTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGTGCA 701

Query 601     GCAAAGATAATCCAAGATCAGCAAAAAGAGGGTGTCTCGTATTACAAAGGCTAAGGCCGAA 660
|||||
Sbjct 702     GCAAAGGATAATTCAGGATCAGCAGAAAAGAGGGTTCCTCGATTACAAAGGCTAAGGGCTGAT 761

Query 661     GAAATTGCTCATCGCCGATTTTGAAGCGCACTGTGCCACCAGGTTACAGAGTGGATCAA 720
|||||
Sbjct 762     GAAATGGCTCACCGCGTATTGCAAGCGCACTATTCACCTAATTTATAAGGTTGATCAA 821

Query 721    GTGTTTGGCCCTCGTACTAAAGGTAAGGAGGGTAATTTTGGTGATGATAAGATGAATGAG 780
|||||
Sbjct 822    GTGTTTGGTCCCCTACTAAAGGTAAGGAGGGAAATTTTGGTGATGACAAGATGAATGAG 881

Query 781    GAAGGTATTAAGGATGGGCGAGTTACGGCAATGCTTAATCTTGTGCTAGTAGCCATGCT 840
|||||
Sbjct 882    GAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCTTAGCAGCCATGCT 941

Query 841    TGTCTTTTTGGAAGTAGGGTGACGCCAAAACCTCAACCAGATGGGCTTACCTGAAAATTT 900
|||||
Sbjct 942    TGTCTTTTTCGGAAGTAGAGTGACGCCAAAACCTCAACCAGATGGGCTGCACTTGAATTT 1001

Query 901    GAATTTACTACTGTGGTCTCACGTGATGACCCGCAAGTTTGATAATTTATGTTAAAAATTTGT 960
|||||
Sbjct 1002   GAATTTACTACTGTGGTCCACGTGATGATCCGCAAGTTTGATAATTTATGTTAAAAATTTGT 1061

Query 961    GATCAGTGTGTCTGATGGTGTAGGAACACGTCCAAAAGACGATGAACCAAAACCAAAGTCA 1020
|||||
Sbjct 1062   GATCAGTGTGTGATGGTGTAGGAACACGTCCAAAAGATGATGAACCAAGACCAAAGTCA 1121

Query 1021   CGCTCAAATTCAAAACCTGCAACAAGAGCTAATTTCCGGCGCCAAGACAGCAGCGCCCA 1080
|||||
Sbjct 1122   CGCTCAAGTTCAAGACCTGCAACAAGAGGAAAATTTCCAGCGCCAAGACAGCAGCGCCCA 1181

Query 1081   AGGAAAAGAGAAAAAGCCCAAGAAGCAGGATGATGATGTGGATAAAGCATTGACCTCAGAT 1140
|||||
Sbjct 1182   AAGAAGGAGAAAAAGCCAAAAGAACGACGATGATGAAAGTGGATAAAGCATTGACCTCAGAT 1241

Query 1141   GAGGAGAGGACCAATGCACAGCTGGAGTT---TGATGAACCCAAAGTGATTAATTTGGGGT 1197
|||||
Sbjct 1242   GAGGAGAGGAAACAATGCACAGCTGGAATTTTATGATGAGCCCAAGGTAATTAACCTGGGG 1301

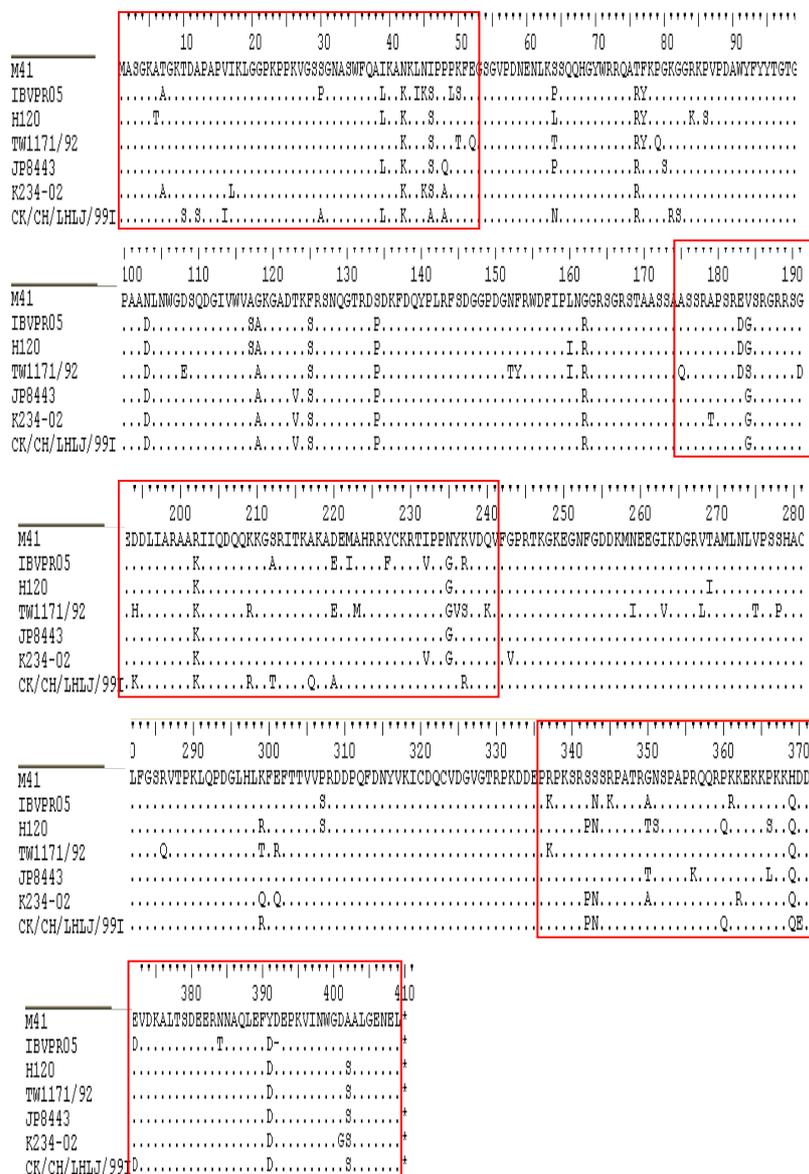
```

**Figura 12.** Alinhamento entre a sequência nucleotídica completa do gene da nucleoproteína do novo isolado de campo no Brasil IBVPR05 do VBI clonado no vetor pGEM- T Easy (Query) com o mesmo gene da estirpe de referência M41 do VBI depositado no Gene Bank (Sbjct) e identificado sob o número de acesso M28566 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2.html)).

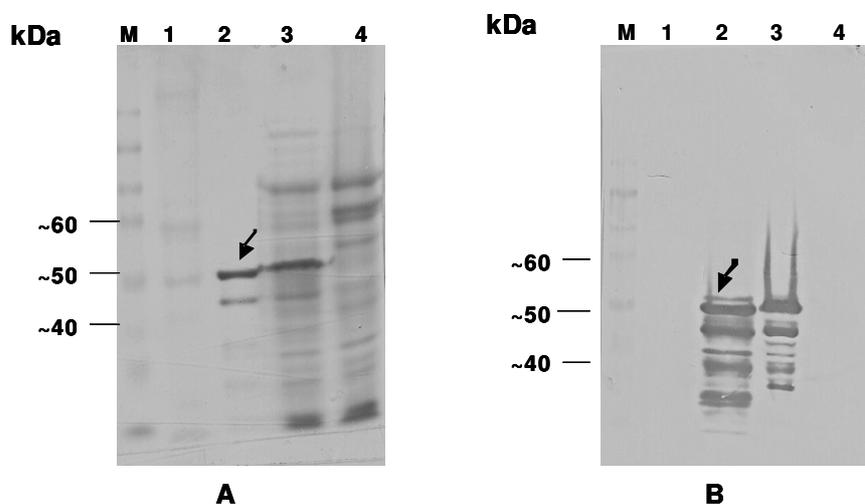
Com a finalidade também de se avaliar o efeito da variabilidade de nucleotídeos sobre a composição da sequência de aminoácidos do gene N desse novo isolado de campo do VBI, foi também feito um estudo fundamentado no alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos dessa proteína com relação as de outras estirpes do VBI, que foram sequenciadas e depositadas no banco de dados genéticos, tais como as estirpes M41, H120, ou outros isolados de diferentes países, como TW1171/92, JP8443, K234-02 e CK/CH/LHLJ/99I (números de acesso no “GenBank” M28566, AY28296, DQ646406, AY363967, AY790352 e AY842864) (Figura 13). Foi evidenciado que as principais alterações nos resíduos de aminoácidos ocorreram de forma mais agrupada em determinadas regiões da proteína N, especialmente naquelas que se constituem nos epítomos mais importantes dessa proteína, compreendidos pelos resíduos de aminoácidos das regiões 1 a 50, 175 a 240 e 360 a 409.

#### **4.3.2 Expressão do gene N do novo isolado de campo no Brasil do VBI em *E. coli* (Nv)**

A nucleoproteína recombinante derivada do isolado IBVPR05 com a cauda de polihistidina (Nv) foi produzida em *E. coli* da linhagem BL21, conforme demonstram os resultados das técnicas de PAGE-SDS e Western-blotting, que serviram para detectar e caracterizar bioquímica e imunoquimicamente uma banda protéica de 54 kDa, mostrando forte reatividade com o anticorpo monoclonal (AcM) anti-polihistidina (Figura 14). O tamanho molecular observado, é ligeiramente superior ao da proteína N do próprio VBI, devendo-se considerar que este resultado está dentro da faixa de variação esperada para a proteína de nucleocapsídeo do VBI e que, nesse caso, há a presença de aminoácidos adicionais que compõem a cauda de poli-histidina e ainda de mais dois resíduos de aminoácidos derivados dos “códon” remanescentes da digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, e que estavam presentes nas extremidades 5' e 3' do gene N durante o preparo desse inserto gênico para clonagem direcional no vetor pET28a.



**Figura 13.** Alinhamento entre a sequência de aminoácidos da proteína N deduzida a partir da ORF completa do gene codificador dessa proteína de um novo isolado de campo no Brasil (IBVPR05) do VBI que foi clonado no vetor pGEM- T Easy com sequências de aminoácidos deduzidas dessa mesma proteína a partir dos genes codificadores correspondentes às estirpes M41, H120, TW1171, JP8443, K234-02 e CK/CHLHLJ/99I do VBI depositadas no Gene Bank e identificadas sob os números de acesso M28566, AY28296, DQ646406, AY363967, AY790352 e AY842864. As caixas em vermelho delimitam os epítomos mais importantes da proteína N do VBI.



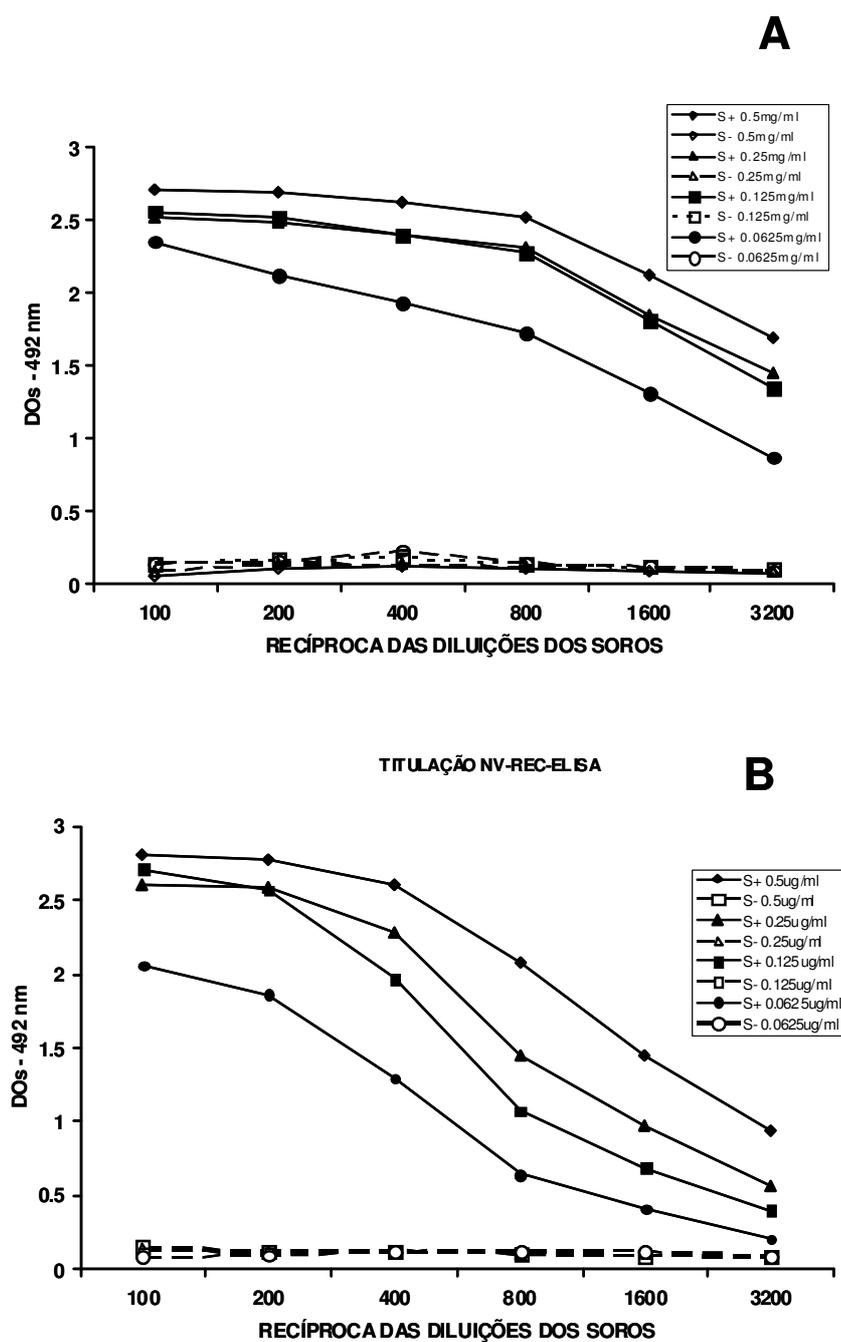
**Figura 14.** Análise pela técnica de SDS-PAGE (A) e de Western-blotting (B) da fração purificada da proteína recombinante N do isolado de campo IBVPR05 produzida em *E. coli* utilizando o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina, através da técnica de cromatografia em resina “Ni-Sepharose High performance” de níquel-sepharose,(A e B) Linhas: (M) Marcador de Peso Molecular, (1) Proteínas da estirpe M41 do VBI concentrado com PEG,(2) Proteína recombinante do nucleocapsídeo do isolado de campo IBVPR05 , expressa em *E. coli*, purificada por eluição da resina de Níquel-sepharose,(3) Extrato bruto de proteínas de células transformadas de *E. coli* com o gene N do isolado de campo IBVPR05 (4) Extrato total de proteínas de células transformadas de *E. coli* transformadas somente com o vetor pET28a, sem o inserto clonado. A seta indica a banda correspondente da proteína N recombinante do VBI (~54 KDa).

A proteína N recombinante foi eluída, com 500 mM de imidazol em tampão fosfato 20 mM e 0.05M de NaCl. Como apresentado na Figura 14 a análise em PAGE-SDS indicou a presença de uma banda de proteína com peso molecular de cerca de 54kDa, que é similar ao tamanho esperado da proteína de fusão N com a cauda de poli-histidina. Outras bandas com tamanhos menores do que o da banda da proteína N foram, também, observadas nas técnicas de PAGE-SDS e de Western-blotting, especialmente na fração purificada da proteína recombinante, as quais igualmente

reagiram com o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina, parecendo se tratar de fragmentos menores da proteína N recombinante que sofreram proteólise, mas continuaram com a cauda de poli-histidina em sua porção carboxi-terminal, tal como foi relatado na expressão da proteína N em baculovírus e em *E. coli* por CHEN et al. (2003).

#### **4.3.3 Padronização do ELISA indireto com a proteína N recombinante expressa em *E. coli* (Ec-N-ELISA)**

A titulação em bloco da proteína Nv recombinante com os soros de referência positivo homólogo (anti-IBVPR05) e heterólogo (anti-M41) e também com o soro de referência negativo no método indireto de ELISA (Ec-Nv-ELISA) revelaram que esses imuno-reagentes interagiram de maneira dose-dependente, tendo-se verificado que as magnitudes similarmente mais elevadas de discriminação entre as reações com os soros homólogos e heterólogos anti-VBI positivo e o soro negativo ocorreram com as concentrações dessa proteína recombinante equivalente a 0,5, 0,25, 0,125 ou 0,0625µg/mL e no intervalo de diluições séricas compreendido entre 1:100 a 1:800, sendo que concentrações menores do antígeno ou diluições maiores de soro resultaram em menores valores de DO dos soro de referência positivo e menor discriminação com relação às DOs do soro de referência negativo. A concentração de 0,125µg/mL de proteína Nv recombinante e a diluição de 1:800 de soro, foram então escolhidas para se testar as demais amostras séricas de aves de campo no Ec-Nv-ELISA (Figura 15). Em adição a isso, foram observadas maiores valores de DO na interação do antissoro homólogo do que na interação com o antissoro heterólogo a proteína N dessa variante de campo do VBI. Ainda, a análise de 20 amostras de soros de aves não infectadas e não vacinadas (grupo controle negativo) revelou um ponto de corte equivalente ao valor A/P de 0.083 (média  $\pm$  3 desvios padrão).



**Figura 15.** Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA da proteína N recombinante produzida em *E. coli* da linhagem BL21 de um novo isolado de campo no Brasil (IBVPR05) frente a antissoros hiperimunes de galinha positivos homólogo (anti-IBVPR05)(A) e heterólogo (anti-M41) (B) e negativos para o VBI.

#### **4.3.4 Aplicação das proteínas N do isolado de campo variante e proteína N da estirpe M41 no método indireto de ELISA para a detecção de anticorpos anti-VBI específicos**

A aplicação dos métodos indireto de ELISA com a proteína N derivada do novo isolado de campo IBVPR05 (Ec-Nv-ELISA) e com a proteína N derivada da estirpe M41 do VBI para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em um conjunto de 108 amostras séricas oriundas de aves de campo, ou comprovadamente infectadas pelo VBI, ou alternativamente livres de infecção e, ainda, vacinadas ou não; que um total de 87 amostras apresentaram resultados coincidentes nesses dois métodos de ELISA. Dentre essas amostras, 60 foram classificadas como positivas e 27 amostras como negativas, em ambas técnicas de ELISA (Tabela 5). Por outro lado, 21 amostras de soros apresentaram resultados discordantes, sendo que 5 amostras foram classificadas como positivas somente pelo Ec-Nv-ELISA, enquanto que outras 16 amostras revelaram-se positivas apenas no teste de Ec-N-M41-ELISA (Tabela 5).

#### **4.3.5 Aplicação do teste do Ec-N-ELISA para a detecção de anticorpos específicos em amostras de soros de aves infectadas com o VBI**

A aplicação dos métodos indireto de ELISA com a proteína N derivada do novo isolado de campo IBVPR05 (Ec-Nv-ELISA) e com a proteína N derivada da estirpe M41 do VBI para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em um conjunto de 108 amostras séricas oriundas de aves de campo comprovadamente infectadas pelo VBI, ou alternativamente livres de infecção e, ainda, vacinadas ou não; que um total de 87 amostras apresentaram resultados coincidentes nesses dois métodos de ELISA. Dentre essas amostras, 60 foram classificadas como positivas e 27 amostras como negativas, em ambas técnicas de ELISA (Tabela 5). Por outro lado, 21 amostras de soros apresentaram resultados discordantes, sendo que .5 amostras foram classificadas

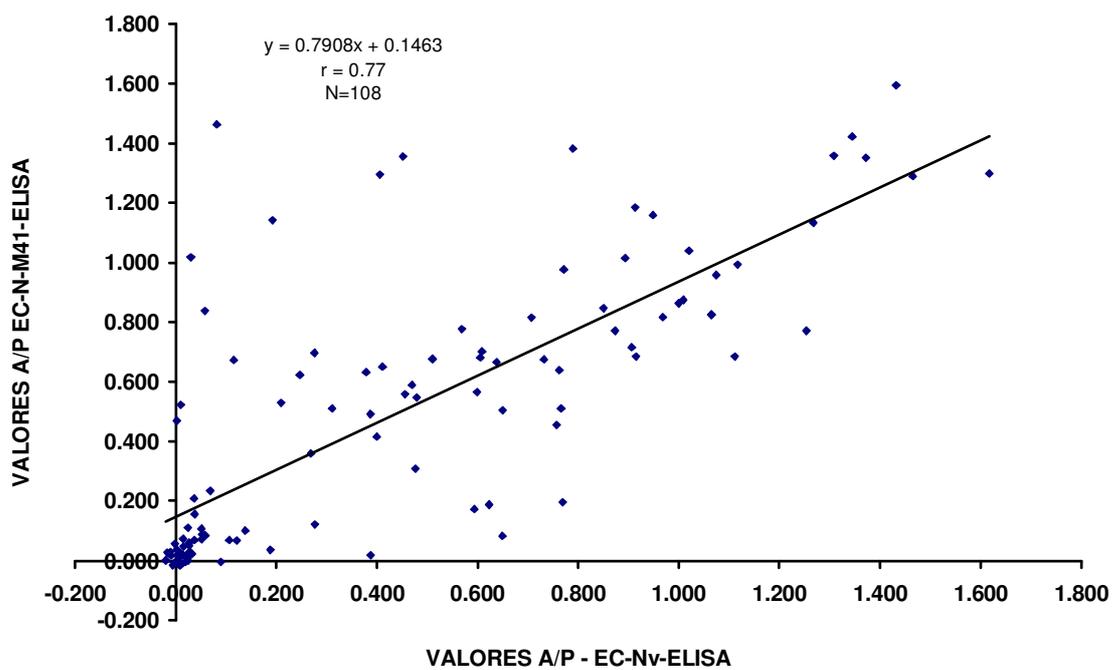
como positivas somente pelo Ec-Nv-ELISA, enquanto que outras 16 amostras revelaram-se positivas apenas no teste de Ec-N-M41-ELISA (Tabela 5).

Em complementação a avaliação acima, a análise de regressão linear feita para comparar a performance desses dois testes de ELISA demonstrou que houve uma boa correlação ( $r = 0,77$ ) entre os níveis de anticorpos detectados por esses dois métodos de ELISA, isto é, realizados ou com a proteína Nv ou com a proteína N da estirpe M41 do VBI ( $P < 0,0001$ ) (Figura 16). Além disso, essa correlação foi associada com valores de sensibilidade e especificidade correspondentes a 78,94% e a 84,37%, respectivamente, e, ainda, com uma elevada concordância, mensurada pelo índice Kappa e que foi igual a 0,98 (Tabela 5).

A análise dos resultados dentro de cada um dos 4 grupos demonstrou que a performance do Ec-Nv-ELISA apresentou uma associação marcante com a presença ou não de infecção por variantes do VBI, ou ainda com o estado de imunização contra esse mesmo vírus, de cada um dos grupos de aves. Nesse contexto ficou evidenciado que a maioria dos resultados discrepantes, ocorreu com 16 amostras que foram classificadas como negativas pelo teste de Ec-Nv-ELISA e positivas para o teste de Ec-N-M41-ELISA. É importante destacar que essas amostras foram obtidas de dois grupos de aves submetidos a duas ou mais vacinações com a estirpe H120 do VBI e que haviam ou não sofrido infecção com isolados variantes desse mesmo vírus. Ainda, um menor número de resultados divergentes e em favor do método de ELISA realizado com a proteína Nv derivada do isolado de campo variante, foi observado em 5 amostras oriundas de aves do grupo não vacinado e das quais haviam sido isolados variantes do VBI.

Além disso, as intensidades de reatividade no ELISA, ou com a proteína N derivada do isolado variante ou da estirpe M41, apresentada pelo conjunto total de 108 amostras, mensuradas pelo valor A/P, foram para a maioria delas, muito similares, especialmente para as aves vacinadas e que sofreram infecção pelo VBI (Figura 16). Por outro lado, foi verificado que as diferenças mais marcantes nas magnitudes de reatividade com cada uma dessas preparações de proteínas N recombinantes,

ocorreram ou nas aves infectadas e não vacinadas ou nas aves somente vacinadas com a estirpe H120 e livres de infecção (Figuras 17 e 18).

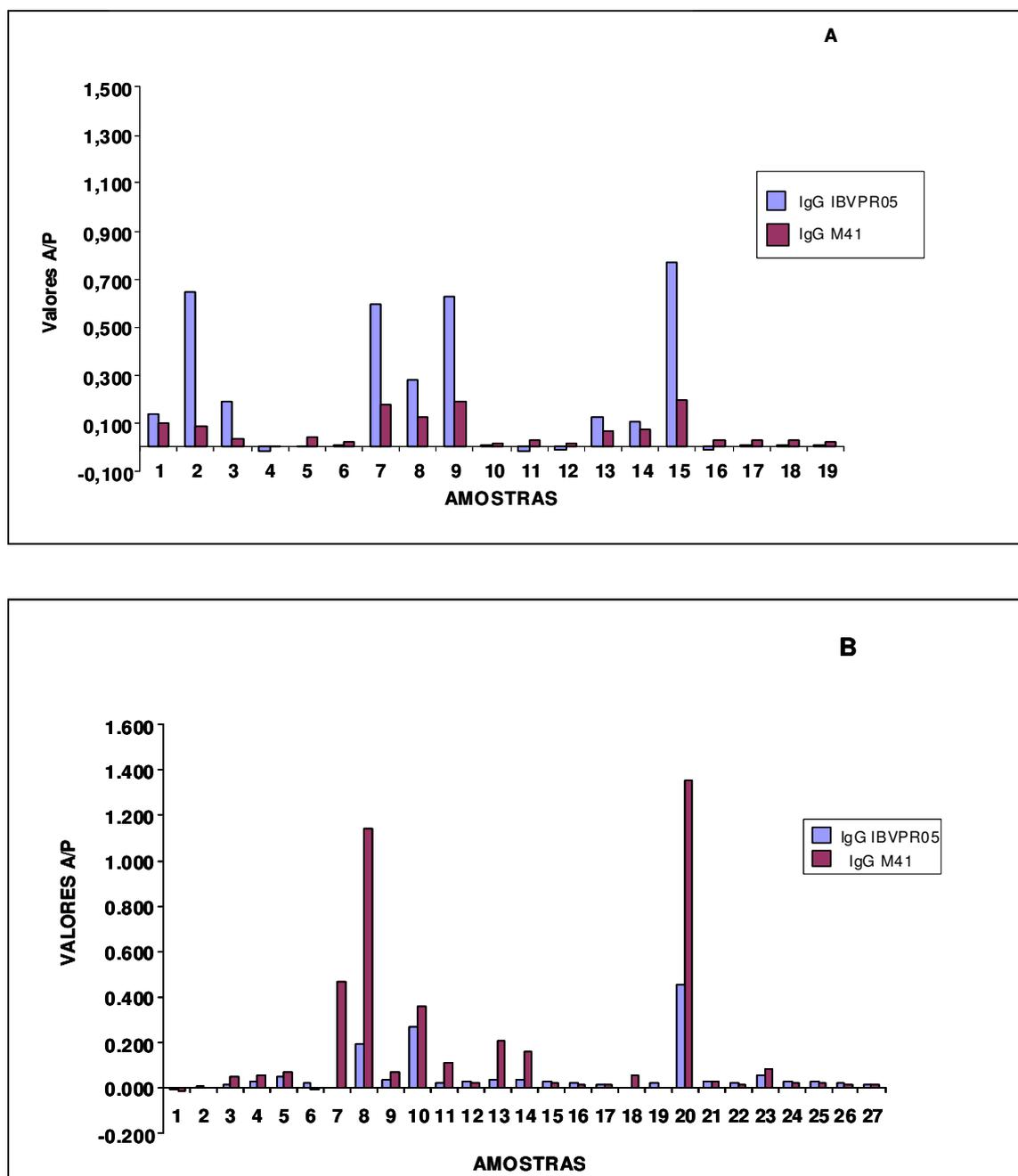


**Figura 16.** Correlação entre os níveis de anticorpos contra o VBI (VALOR A/P) obtidos no Ec-Nv- ELISA e no Ec-N-M41-ELISA para o VBI.

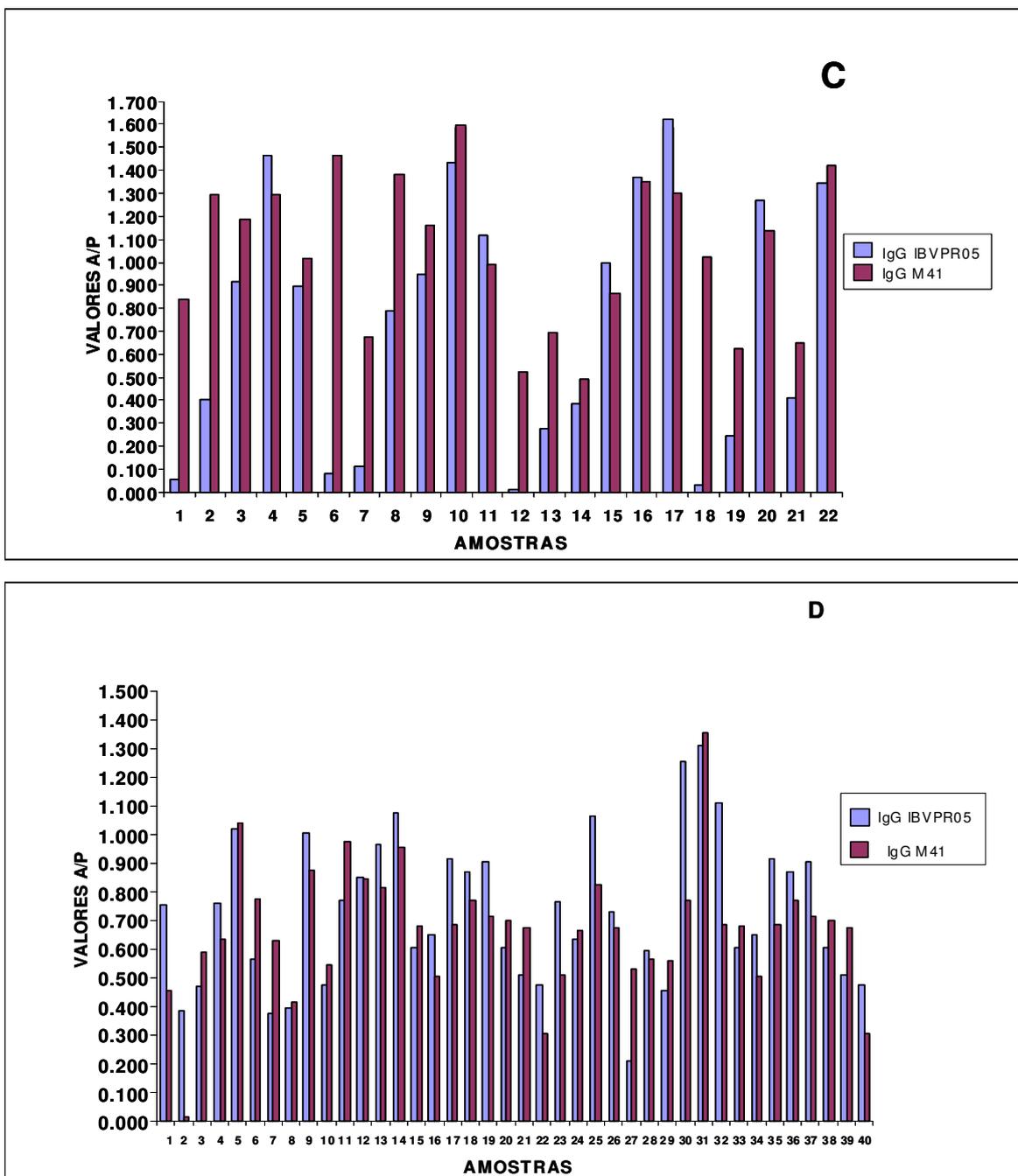
**Tabela 5.** Comparação entre os resultados do Ec-Nv-ELISA e do Ec-N-M41-ELISA para a detecção de anticorpos contra o VBI presentes no soro de galinhas

<b>Ec-Nv-ELISA</b>	<b>Ec-N-M41-ELISA</b>		
	<b>VBI Positivos</b>	<b>VBI Negativos</b>	<b>Total</b>
<b>VBI Positivos</b>	60	5	<b>65</b>
<b>VBI Negativos</b>	16	27	<b>43</b>
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>32</b>	<b>108</b>

Sensibilidade Relativa =  $(60/76) \times 100 = 78.94\%$ . Especificidade Relativa =  $(27/32) \times 100 = 84.37\%$ . Acurácia =  $[(60 + 27) / 108] \times 100 = 80,55\%$ . Concordância (Índice Kappa) = 0,98



**Figura 17.** Perfis de níveis de anticorpos contra as nucleoproteínas recombinantes Nv e N-M41 determinados pelos métodos indiretos de ELISA em amostras de soros de aves de granjas comerciais em diferentes condições de infecção pelo VBI ou de vacinação contra esse mesmo vírus. (A) Aves de corte infectadas por variante do VBI e não vacinadas; (B) Aves de corte não infectadas pelo VBI e vacinadas 2 vezes.



**Figura 18.** Perfis de níveis de anticorpos contra as nucleoproteínas recombinantes Nv e N-M41 determinados pelos métodos indiretos de ELISA em amostras de soros de aves de granjas comerciais em diferentes condições de infecção pelo VBI ou de vacinação contra esse mesmo vírus. (C) Aves de corte infectadas por variante do VBI e vacinadas 2 vezes e (D) Aves de Postura infectadas por variante do VBI e vacinadas mais de 2 vezes.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A elevada conservação das sequências de nucleotídeos que compõem o gene que codificada para a proteína N é uma característica dessa proteína estrutural do VBI amplamente conhecida (WILLIAMS et al., 1992, NDIFUNA et al., 1998, CAVANAGH, 2007). Além disso, essa proteína apresenta alta imunogenicidade e capacidade de reatividade cruzada com anticorpos policlonais gerados em aves infectadas com estirpes variantes heterólogas do VBI. No entanto, alguns estudos mais recentes versando sobre novos isolados do VBI na Austrália, Coreia e, inclusive, o Brasil, revelaram que podem ocorrer alterações de maior magnitude nas sequências de nucleotídeos e conseqüentemente na composição de aminoácidos da proteína N desses vírus em comparação com a de outras estirpes de referência e eventualmente culminarem em uma redução mais acentuada ou até mesmo na abolição de reatividade cruzada, ao menos para alguns dos epítomos presentes nesses três sítios antigênicos (PARK et al., 2005, IGNJATOVIC et al., 2006, ABREU et al., 2006, MONTASSIER, 2007).

A partir de um novo isolado e variante do VBI no Brasil, o IBVPR05 (MONTASSIER et al., 2006, 2008) e com o uso de oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados para regiões mais conservadas do gene N desse vírus localizadas junto às extremidades 5' e 3', foi clonada, nesse estudo toda a ORF desse mesmo gene em um vetor apropriado para a produção em *E. coli*. Ao final desse processo de clonagem, foi obtida a proteína recombinante N dessa variante do VBI (Nv), que, depois de purificada por cromatografia de afinidade em níquel-sepharose, foi usada na padronização e aplicação de um método indireto de ELISA, para a detecção de anticorpos específicos em soros de aves infectadas e vacinadas ou não com esse mesmo vírus. E, ainda, foi avaliado o nível de reatividade cruzada dessa proteína Nv e a performance do método de ELISA, previamente padronizado com tal proteína e aplicado de forma comparativa com um mesmo formato de ELISA, exceto que realizado com a proteína N derivada da estirpe de referência M41 do VBI.

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do gene N desse novo isolado, que foi clonado nesse estudo, com as sequências de aminoácidos desse mesmo gene de outras estirpes de referência, revelou a presença de diferenças marcantes na identidade do gene e da proteína N desse novo isolado tanto com relação à estirpe M41 (88,5% e 90,5% de identidade com base nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente) como com relação à estirpe H120 (88,8% e 92,2% de identidade com base nas sequências nucleotídicas e peptídicas de aminoácidos, respectivamente, do VBI).

Verifica-se também que as mutações que foram encontradas no gene N desse novo isolado do VBI, redundaram em substituições relevantes sobre um número apreciável de resíduos de aminoácidos da proteína N dessa nova variante isolada de campo no Brasil. Além disso, deve ser ressaltado que tais alterações ocorreram notadamente naqueles aminoácidos que estão localizados em um dos três sítios mais imunogênicos da proteína N do VBI, tal como havia sido mapeado por SEAH et al. (2000). Foram afetadas, assim na proteína N desse isolado variante do VBI, mais acentuadamente as regiões compreendidas entre os aminoácidos 1 a 50, ou entre os aminoácidos 175 a 240, ou ainda, entre os aminoácidos 310 a 409.

Variações de igual ou maior magnitude daquelas aqui registradas têm sido relatadas para a proteína N de isolados de campo do VBI na Austrália (IGNJATOVIC et al., 2006). O interessante a destacar é que na investigação acima, foram observadas reduções significativas na interação desses novos isolados com anticorpos monoclonais com especificidade para a proteína N e especificamente produzidos contra estirpes de referência desse mesmo país, porém nada é informado sobre a interação dessas novas variantes australianas com anticorpos policlonais e que estivessem presentes em preparações de antissoros contra diferentes estirpes do VBI (IGNJATOVIC et al., 2006).

No entanto, os resultados da titulação em bloco no método indireto de ELISA, mensurada nesse caso pelos valores de DOs contrapõem-se a expectativa de que essas alterações na composição de aminoácidos da proteína N do novo isolado de campo no Brasil poderiam ter sobre a antigenicidade dos epítomos da proteína N. De forma que as trocas nos resíduos de aminoácidos se refletissem de forma direta na

especificidade dos anticorpos produzidos por aves infectadas por tais variantes do VBI, como o isolado IBVPR05, apresentando, como consequência, uma reatividade diferente e menor, ou até mesmo ausente, para a proteína N de uma outra estirpe do genótipo / sorotipo, como por exemplo alguma do grupo Massachusetts do VBI (estirpes M41 ou H120), que coincidentemente entram na composição das vacinas comerciais contra a BI no Brasil e são amplamente usadas nos programas imunoproláticos dessa virose.

Na análise pelo teste de ELISA acima mencionado, ficou claro que não houve uma abolição ou redução drástica na interação de anticorpos policlonais específicos de aves hiperimunizadas com a estirpe M41 para a proteína N recombinante derivada de uma variante de campo no Brasil, mas sim ocorreu uma moderada diminuição na intensidade de reatividade de tais anticorpos anti-M41 específicos. Inclusive, deve-se salientar que a concentração da proteína N recombinante do isolado variante escolhida e a diluição única de soro escolhidas para a aplicação desse método de ELISA; correspondentes a 0,125µg/mL e 1:800, proporcionaram DOs de aproximadamente 2,5 e 1,5, para os antissoros homólogo e heterólogo, respectivamente. Não se pode então considerar que essas condições sejam limitantes para a detecção de anticorpos contra estirpes heterólogas do VBI. E, por outro lado, se tivessem sido escolhidas concentrações menores da proteína N recombinante, ou alternativamente maiores diluições de amostras séricas, haveria prejuízo mesmo para a detecção de anticorpos contra o vírus homólogo, o que também não seria desejável, pois haveria uma perda maior na sensibilidade do método Ec-Nv-ELISA.

Ainda, nesse contexto, constata-se que a persistência de tal nível de reatividade cruzada aqui detectado entre a N do isolado variante e a N da estirpe M41 do VBI, está em consonância com achados semelhantes destacando que há uma elevada reatividade cruzada da proteína N do VBI ou do coronavírus de perus (TCoV) com anticorpos policlonais gerados contra vírus ou variantes heterólogas desses vírus, como por exemplo M41, GRAY, Connecticut, Arkansas, JMK e até mesmo contra diferentes estirpes do TCoV e que se encontravam presentes em preparações de antissoros hiperimunes monoespecíficos anti-VBI ou anti-TCoV (BRESLIN et al, 2001 e NDIFUNA et al., 1998), não obstante terem sido usados misturas de antissoros de referência

produzidos contra cada um desses vírus e não um conjunto de amostras séricas individuais, tal como foi feito no presente estudo.

Verifica-se também que os resultados dos métodos indiretos de ELISA, ou com a proteína N do isolado de campo variante IBVPR05 (Nv) ou da estirpe de referência M41, ratificaram em grande parte os dados inicialmente obtidos na titulação em bloco pelo método indireto de ELISA usando essa mesma proteína recombinante como antígeno. E, ademais, tais achados evidenciam que nas aves que receberam vacinação contra o VBI, e que haviam sido infectadas ou não, um maior número de amostras foram classificadas como positivas pelo ELISA realizado com a proteína N recombinante derivada da estirpe M41 do VBI do que no ELISA realizado com a proteína Nv. Um ponto importante a ser destacado aqui para um melhor entendimento de tal discrepância é que as vacinas contra o VBI no Brasil são formuladas com a estirpe atenuada H120 ou com a estirpe M41 inativada com adjuvante oleoso. Nesse contexto deve ser esclarecido que as amostras séricas que proporcionaram o maior número de resultados discordantes revelando uma maior positividade para o teste de ELISA com a proteína N derivada da estirpe M41, foram colhidas ou de aves duas vezes imunizadas com vacinas atenuadas e não infectadas, ou de aves vacinadas mais de duas vezes com esse mesmo tipo de vacina e que se encontravam infectadas por variantes do VBI e, apresentaram por conseguinte memória para a produção de anticorpos contra regiões comuns ou mais conservadas da proteína N do VBI.

Ainda, dentro do contexto acima explanado, foram verificadas também divergências menos marcantes em favor do teste de Ec-Nv-ELISA, pois apenas 5 resultados discordantes de um total de 19 foram obtidos nas amostras séricas colhidas do grupo de aves não vacinadas e infectadas com variantes do VBI. Embora deva ser ressaltado que no geral foram obtidos baixos níveis de reatividade no Ec-Nv-ELISA, medidos pelos valores A/P, eles foram ainda mais reduzidos no Ec-N-M41-ELISA. Tais resultados sugerem tratar-se de aves mais recentemente infectadas e, que por não possuírem memória contra os antígenos do VBI, estavam também iniciando o processo de soroconversão para os antígenos virais homólogos. Portanto, os anticorpos anti-VBI produzidos nessas circunstâncias não atingiriam concentrações maiores, nem um maior

espectro de reatividade cruzada, o que seria esperado ocorrer, ou em aves previamente vacinadas e infectadas, ou em aves multi-vacinadas com o VBI.

No entanto, deve ser enfatizado que se trata de um número pequeno de amostras séricas analisadas (N=19), havendo, então, necessidade de que sejam testadas mais amostras obtidas de aves mantidas em criações de campo e que não sejam vacinadas e estejam infectadas com variantes desse vírus, antes de se fazer uma conclusão mais definitiva sobre as possíveis vantagens ou até mesmo a necessidade em se usar de fato uma preparação de proteína N com características antigênicas mais próximas a dos isolados variantes do VBI que se encontrem circulando em uma dada região.

Além disso, a menor sensibilidade registrada para a maior parte das amostras séricas testadas em nosso estudo para o Ec-Nv-ELISA, deve ser interpretada com cautela e levando em consideração o estado imunitário das aves amostradas; isto é, se foram ou não vacinadas e também se houve ou não infecção pelo VBI, especialmente quando estiverem envolvidas variantes desse vírus.

É válido ressaltar também que, no caso de se pretender através do imunodiagnóstico identificar a estirpe ou isolado do VBI que está causando o processo infeccioso, especialmente por meio do perfil de reatividade dos anticorpos policlonais presentes em amostras de soros de aves infectadas com esse vírus, talvez fosse mais efetivo ou se usar como alvo a glicoproteína S do VBI. Alternativamente, poderiam também ser empregados com essa mesma finalidade, preparações de anticorpos monoclonais contra epítomos mais variáveis das proteínas estruturais do VBI, principalmente aqueles que estão presentes nessa glicoproteína, ou mesmo na nucleoproteína, tal como aqueles que foram obtidos por IGNJATOVIC & MACWATERS (1991) e KOCH et al. (1986).

#### **4.5 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que a proteína N derivada de um isolado de campo variante do VBI no Brasil, não obstante apresentar grande variabilidade na composição de seus resíduos de aminoácidos, mantém conservada a maior parte da antigenicidade de seus principais epítomos em relação à proteína N da estirpe de referência M41. Assim, esta última proteína, sob a forma de proteína recombinante de fusão N-His6 é capaz de reagir cruzadamente no ensaio imunoenzimático com a maioria das amostras séricas contendo anticorpos policlonais gerados por estímulos antigênicos dessas variantes do VBI. Entretanto, pode haver um pequeno comprometimento na aplicação da proteína N da estirpe M41 nesse teste sorológico, no sentido de serem classificadas como negativas amostras de aves em fase mais recente da infecção com isolado variante desse mesmo vírus.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, A. V. F.; MENDES, A. C. R.; MARTINS N. R. S.; SILVA, C. B. A.; FERREIRA, M. C.; MACHADO, A. L. C. Genotipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pelo sequenciamento direto de parte de S2 e do segmento S1. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 8 supl, p. 210, 2006.

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.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESLIN, J. J.; SMITH, L. G.; GUY, J. S. Baculovirus expression of turkey coronavirus nucleocapsid protein. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 45, n. 1, p. 136-143, 2001.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

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

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F. S.; SENA, J. A. D.; GIVISIEZ, P. E. N.; FURUYAMA, C. R. A. G.; MONTASSIER, H. J. Development and application of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

IGNJATOVIC, J.; MCWATERS, P.G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strain. **J. Gen. Virol.**, London, v. 72, p. 2915, 1991.

IGNJATOVIC, J.; GOULD, G.; SAPATS, S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. **Arch. Virol.**, New York, v. 151, n. 8, p. 1567-1585, 2006.

KOCH, G. L.; HARTOG, A.; KANT, D.; BOER, G. F. Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. **Irs. J. Vet. Med.**, Rishon Lizion, v. 42, p. 89-97, 1986.

LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T<sub>4</sub> bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-681, 1970.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on s1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 5, 2006, Rauschholzhausen. **Proceedings**....p. 119-131.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RLFP analysis of the S1 gene. **Pesqui Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 190-194, 2008.

MONTASSIER, M. F. S. **Diversidade genética das amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo seqüenciamento de nucleotídeos dos genes N e S1.** 2008. 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia) –Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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.

PARK, J. Y.; PAK, S. I.; SUNG, H. W.; KIM, J. H.; SONG, C. S.; LEE, C. W.; KWON, H. M. Variation in the nucleocapsid protein gene infectious bronchitis viruses isolated in Korea. **Virus Gene**, Norwell, v. 31, n. 2, p. 153-162, 2005.

SEAH, J. N.; YU, L.; KWANG, J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 11-16, 2000.

SEO, S. H.; WANG, H. L.; SMITH, R.; COLLISON, E. W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SNEED, L.W.; BUTCHER, G.D.; PARR, R.; WANG, L.; COLLISSON, E.W. Comparisons of the structural proteins of avian bronchitis virus as determined by Western-Blotting analysis. **Viral Immunol.**, New Rochelle, v. 2, n. 3, p. 221-227, 1989.

VILLAREAL, L. Y. B. Bronquite infecciosa das galinhas: Diagnóstico, tipos patogênicos e classificação no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais**..... p. 237-250.

WILLIAMS, A. K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

## **CAPITULO - 5 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO DE AVES COM A PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO DO VIRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EXPRESSA EM *Escherichia coli***

**RESUMO** - A proteína N do Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), que se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus. Essa proteína tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes do VBI, além de ser altamente imunogênica. Foi proposto nesse trabalho a imunização de aves utilizando a proteína N recombinante expressa em um sistema procarioto de expressão. As aves com aproximadamente quatro semanas de idade, foram imunizadas com 50 µg da proteína N recombinante bruta. Duas outras imunizações, no 7º e 14º dia após a primeira inoculação foram realizadas. Os grupos de aves foram desafiados, aos 49 dias de idade, por via óculo/nasal, com suspensão de estirpe M41 virulenta do VBI, sendo que cada ave recebeu 10<sup>4</sup> DIE<sub>50</sub>/ave. Amostras de sangue e lágrima foram colhidas nos dias das infecções, para serem analisadas pelo teste de ELISA, e após o desafio com uma estirpe virulenta do VBI, foram feitas colheitas dos fragmentos de anéis traqueais para observação da movimentação ciliar das células epiteliais e para serem processadas na técnica de extração da RNA genômico para aplicação nos métodos de RT-PCR. Todos os testes demonstraram que não houve uma proteção significativa nas aves imunizadas com a proteína N recombinante e depois desafiadas com uma estirpe virulenta do VBI.

**Palavras chaves:** Vírus da bronquite Infecciosa, Proteína Recombinante, *Escherichia coli*, Imunogenicidade.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus que infecta aves domésticas da espécie *Gallus gallus*, e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves (CAVANAGH, 2007). A BI se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e altamente infecciosa, acompanhada, não raro, por lesões significativas dos tratos respiratório e uro-genital. Tal situação compromete de diferentes maneiras o estado sanitário das aves acometidas e facilita o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, principalmente por *Escherichia coli* e *Mycoplasma gallisepticum*, resultando, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou de aves reprodutoras.

Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com conseqüentes perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola.

O controle da bronquite infecciosa (BI) está principalmente alicerçado no uso de vacinas formuladas com estirpes "vivas" e atenuadas do VBI, ou ainda com estirpes inativadas associadas a adjuvantes oleosos (CAVANAGH & NAQI, 1997). No entanto, a BI permanece, em vários países, inclusive o Brasil, como um dos problemas mais proeminentes para a sanidade avícola, mesmo com a ampla utilização de tais vacinas, indicando a importância e a necessidade de que sejam procuradas algumas novas alternativas de preparações vacinais mais eficazes para fazer frente aos mecanismos de evasão desse vírus que não raro conduzem a ruptura do estado de imunidade conferido por essas vacinas.

Falhas das vacinas em proteger contra variantes do VBI, são eventos relativamente comuns em virtude das altas taxas de mutação e de recombinação apresentadas por esse vírus, acarretando o surgimento de um grande número de estirpes com mutações marcantes no gene S1 e, conseqüentemente na cadeia polipeptídica correspondente. Em vista dessa variabilidade, são afetados os principais

sítios antigênicos envolvidos na interação com anticorpos neutralizantes, de forma que são gerados estirpes de diferentes sorotipos que escapam da imunidade induzida pela estirpe de referência vacinal (WANG et al., 1994, 1997).

O VBI apresenta quatro proteínas estruturais mais relevantes, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S); clivada pós-traducionalmente em S1 e S2, a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007). Contudo, na imunização contra o VBI a atenção primária foi sempre muito mais focalizada para a glicoproteína S1, uma vez que ela contém, como foi visto anteriormente, os principais sítios antigênicos alvos de anticorpos neutralizantes desse vírus juntamente com epítomos para células T auxiliares (CD4+) e T citotóxicas (CD8+). No entanto, esta proteína está sujeita a sofrer uma enorme variabilidade na composição de aminoácidos de suas regiões antigenicamente mais importantes, o que faz com que as variantes do VBI escapem do processo de neutralização por anticorpos contra S1 (CAVANAGH, 2007, COLLISON et al., 2000).

A proteína N por sua vez não induz a formação de anticorpos neutralizantes e é bem mais conservada do que a glicoproteína S1 e parece estar envolvida na indução de respostas imunes humorais e principalmente cito-mediadas, como a ação de células T citotóxicas, que já mostraram exercer um papel relevante na proteção contra a infecção pelo VBI (SEO et al., 1997) e podem, então, ser exploradas, precisando, assim, ser melhor investigadas.

Nesse sentido, foi relatado que construções plasmidiais contendo a ORF completa ou parte do gene N, podem induzir estado de proteção efetiva contra o desafio moderado feito com estirpe virulenta do VBI (SEO et al., 1997, COLLISON et al., 2000).

No entanto, com relação à utilização da proteína N diretamente em protocolos de imunização, os dados, são um tanto conflitantes. O estudo de BOOTS et al. (1992) demonstrou que a imunização com a proteína N recombinante produzida em *E. coli*, seguida por re-imunização com vacina contendo partículas virais inativadas do VBI, induzem estado de proteção efetiva em aves experimentalmente desafiadas. Por outro lado, IGNJATOVIC & GALLI (1994), trabalhando com preparações purificadas por

cromatografia de afinidade da proteína N oriunda de partículas do VBI, não conseguiram induzir nenhuma proteção em aves experimentalmente imunizadas com essa proteína N e em seguida desafiadas com estirpe virulenta do VBI.

Em face de todo o exposto, foi desenvolvido o presente estudo com o principal objetivo de caracterizar um possível atividade imunogênica de uma preparação da proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI, por meio da avaliação das respostas imunes humorais sistêmicas e locais e também do estado de proteção induzidos em aves imunizadas com esta proteína.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Antígeno recombinante**

Os procedimentos usados para a produção da proteína N recombinante do VBI da estirpe M41 na bactéria *E. coli* foi descrito no Capítulo 2 dessa tese.

### **5.2.2 Desenho experimental para a imunização das aves com a proteína N recombinante**

A fim de determinar a imugenicidade das proteínas recombinantes, produzidas em *E. coli*, foram utilizadas 20 aves de corte com um dia de idade não vacinadas contra a Bronquite Infecciosa das galinhas (BIG), fornecidas pelo incubatório da Grupo Sertanejo Ipiruá, São Paulo. Essas aves foram divididas em quatro grupos de 5 aves cada um, as quais foram colocadas em isoladores com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta, permanecendo nessa condição até quatro semanas de idade. Nessa ocasião, amostras de soros foram analisadas pelo teste Ec-N-ELISA para se assegurar de que não mais apresentarem anticorpos maternos, permitindo, dessa forma, que fossem feitos os experimentos de imunização nos quatro grupos de cinco aves cada um. Assim, no grupo 1 as aves não receberam nenhum inóculo nos processos de imunização e de re-imunização, permanecendo como grupo controle negativo (C-) desse experimento. No segundo grupo as aves receberam duas simulações de imunização, separadas por intervalos de uma semana cada uma, com uma preparação antigênica controle negativa, que foi formulada com o extrato bruto de células não transformadas pelo vetor pET28a – Gene N-M41-VBI de *E. coli* linhagem BL21, isto é, que não continha a proteína N recombinante do VBI, a qual foi emulsionada em adjuvante completo de Freund (ACF)(*E. coli* + ACF). No terceiro grupo as aves foram imunizadas, no mesmo esquema de duas doses semanais, com uma preparação do extrato protéico bruto da proteína N recombinante, contendo cerca

de 50µg/mL dessa proteína produzida em *E. coli* e emulsionada em adjuvante completo de Freund (ACF)(N + ACF) . No quarto grupo, as aves foram submetidas praticamente ao mesmo esquema de imunização utilizado para o terceiro grupo, exceto que, ao invés de ACF, o extrato de proteína N recombinante foi emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (AIF)(N + AIF). Todas as aves foram inoculadas por via intramuscular, na região do músculo peitoral. Duas semanas após a re-imunização, os quatro grupos de aves foram desafiados, por via óculo/nasal, com suspensão de estirpe M41 virulenta do VBI, sendo que cada ave recebeu  $10^4$  DIE<sub>50</sub>/ave. Amostras de sangue e de lágrima foram colhidas nos dias da infecção e 5 dias depois, tendo sido processadas e armazenadas a – 20°C até o momento de serem analisadas pelo método Indireto ELISA. Todas as aves foram sacrificadas aos cinco dias pós-desafio, seguiram-se as colheitas dos fragmentos de anéis traqueais, ou para observação da movimentação ciliar das células epiteliais, ou para a tentativa de detecção do VBI pela técnica de RT-PCR a partir do RNA genômico viral extraído dessas amostras.

### **5.2.3 Detecção do VBI por RT-PCR**

#### **5.2.3.1 Extração de RNA genômico**

A extração de RNA foi realizada com o uso do kit Trizol Reagent (Invitrogen), para as amostras teciduais de traquéia, conforme as especificações do fabricante e introduzindo-se algumas modificações com relação à quantidade de amostra, a qual foi utilizada na proporção de 50% e não de 25%, como sugerida pelo fabricante, bem como da adição da mistura de clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção 24:1.

### 5.2.3.2. RT- PCR

A síntese do cDNA (transcrição reversa), foi realizada com o uso do kit da enzima ImProm II “Reverse Transcription Systems” (Promega), conforme especificações do fabricante e com o emprego de “Random Primers”. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com o cDNA obtido de cada uma das amostras de traquéia com o objetivo de amplificar um produto de aproximadamente 228 pb, que é o tamanho delimitado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores usado nessa reação. Para tanto, foram utilizados na PCR oligonucleotídeos iniciadores específicos para regiões mais conservadas da extremidade 5' do gene S1 do VBI, os quais haviam sido descritos por WANG & TSAI (1996) e os reagentes do kit da enzima “Taq Platinum” (Invitrogen), sendo que as condições da PCR foram constituídas por um primeiro ciclo a 95°C por 8 minutos, seguido de 40 ciclos, cada um composto por três passos; 95°C por 1 minuto, para desnaturação do DNA, 45°C por 1 minuto, para o anelamento e 72°C por 2 minutos e 30 segundos, para a extensão das fitas seguido de 10 minutos de extensão final a 72°C.

Depois da complementação da PCR, 5 µl da mistura foi aplicada em gel de agarose (0,8%) imerso em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma diferença de potencial 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 (0,5µg/mL).

#### **5.2.4 Avaliação da integridade do movimento ciliar da traquéia**

Anéis de traquéia obtidos de cada ave, no quinto dia pós-desafio, cortados nas dimensões de aproximadamente 1,5 mm de espessura, sendo preparados 3 fragmentos da porção cranial, 3 da medial e 3 da caudal, por traquéia analisada, perfazendo um total de 9 anéis por ave. Os anéis foram acondicionados em tubos de eppendorf contendo meio de cultura (EAGLE) adicionado de 10% de soro fetal bovino e, em seguida, foram colocadas sobre lâminas de microscópio para se observar a integridade e o grau de conservação do movimento ciliar das células epiteliais da traquéia (DARBYSHIRE & PETERS, 1985). Os parâmetros considerados para a avaliação do estado de proteção ao desafio com o VBI, consistiram da observação ao microscópio invertido do movimento ciliar das células epiteliais de um total de nove anéis traqueiais, avaliando-se, ao final, a ciliostase em escores correspondentes a 0, 1+ (25% de ciliostase), 2+ (25%-50% de ciliostase), 3+ (50%-75% de ciliostase) e 4+ (75%-100% de ciliostase), conforme recomendam ANDRADE et al. (1982; 1983) e SNYDER et al. (1983)

#### **5.2.5 Método indireto de ELISA para a detecção do isótipo IgG de anticorpos das aves imunizadas com a proteína N recombinante**

O método indireto ELISA usando a proteína N recombinante fusionada a cauda de poli-histidina produzida em *E. coli* como antígeno (Ec-N-ELISA), foi aplicado para a detecção do isótipo IgG de anticorpos contra o VBI, seguindo os procedimentos gerais descritos no Capítulo 3 dessa tese. A concentração ideal de uso da proteína N recombinante, utilizada como antígeno adsorvido na placa para mensuração/detecção do isótipo IgG na secreção lacrimal e soro das aves imunizadas com a proteína N recombinante e desafiadas com a estirpe virulenta M41 do VBI, foi de 0,125µg/mL, respectivamente. As diluições, tanto da secreção lacrimal como a do soro sanguíneo, foram de respectivamente, 1:100 e de 1:800. Foi utilizado o conjugado imunoenzimático anti-IgG de galinha com a enzima peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX,

USA), em sua diluição ideal de uso. A reação colorimétrica enzimática foi desenvolvida após a adição da mistura de peróxido de hidrogênio mais orto-fenileno-diamina, sendo bloqueada após 15 minutos de incubação com HCl 1N. Em seguida, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DOs) em um leitor de ELISA, usando-se o comprimento de onda de 492 nm. As DOs obtidas foram transformadas em valores da relação amostra / positivo (A/P), tal como recomendam GIBERTONI et al. (2005).

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 Resposta imune humoral na secreção lacrimal de aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI**

As imunizações com a proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI acarretou, no dia do desafio, isto é, duas semanas após a re-imunização e três semanas depois da primo-imunização, a produção de níveis elevados de anticorpos do isótipo IgG na secreção lacrimal de aves dos grupos 3 e 4, que haviam recebido, respectivamente, as preparações dessa proteína recombinante acrescida de adjuvante completo (ACF) ou incompleto de Freund (AIF). Essa distinção fica ainda mais evidente quando se compara com as respostas de anticorpos das aves dos grupos controles negativos da imunização com a proteína N, isto é, os grupos 1 e 2, que haviam recebido somente o extrato protéico bruto do lisado de *E. coli* da linhagem BL21 não transformada (controle) sem o inóculo antigênico, sendo que foram encontrados níveis basais de anticorpos anti-VBI, mensurados pelos valores A/P. É necessário ressaltar que apenas as aves do grupo 3, que haviam sido imunizadas com a proteína N recombinante com ACF apresentaram uma elevação marcante nos níveis de anticorpos 5 dias após o desafio, enquanto nos demais grupos não foi detectada nenhuma alteração relevantes nos níveis de anticorpos anti-VBI (Figura 19).

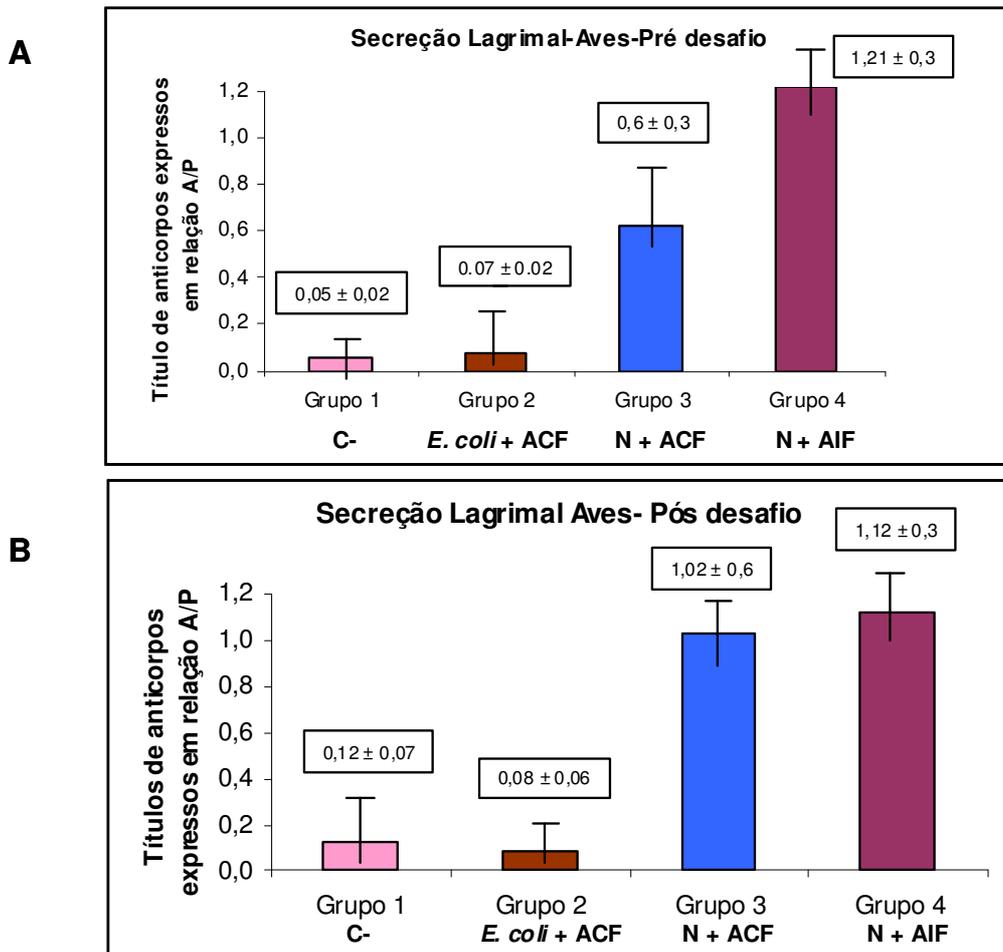
### **5.3.2 Resposta imune humoral no soro sanguíneo de aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI**

Níveis de anticorpos elevados e muito semelhantes àqueles apresentados pelas amostras de secreção lacrimal, foram observados para as amostras de soro sanguíneo, obtidas no dia do desafio, das aves dos grupos 3 e 4, que haviam sido imunizadas e re-imunizadas com a proteína N recombinante emulsionadas ao ACF ou ao AIF (Figura 20). Esses títulos revelaram-se bem distintos daqueles que foram detectados nas aves

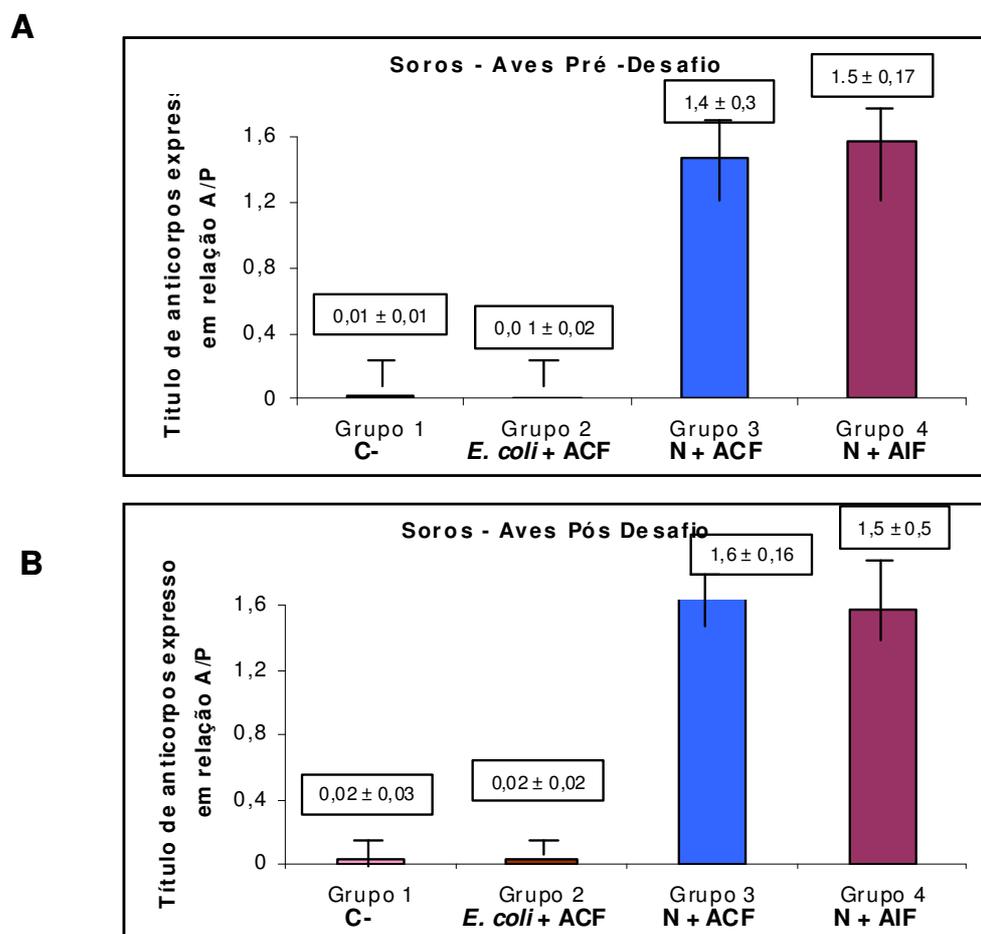
dos grupos controles negativos (grupos 1 e 2), que apresentaram níveis muito reduzidos de anticorpos, tanto nas amostras colhidas no dia do desafio, como naquelas colhidas 5 dias depois.

Ficou evidente que a imunização com a proteína N recombinante da estirpe M41 produzida em *E. coli* estimulou fortemente a produção tanto de anticorpos locais, presentes na secreção lacrimal, como sistêmicos, presentes no soro sanguíneo, havendo no caso dos anticorpos locais, um efeito imunomodulador mais acentuado do AIF em comparação com o ACF. De qualquer modo, ficou, assim, caracterizada a elevada atividade imunogênica dessa proteína sobre a resposta imune humoral em aves, tal como haviam demonstrado os achados anteriores de IGNJATOVIC & GALLI (1994, 1995), demonstrando que galinhas submetidas a duas ou mais imunizações com uma preparação purificada por cromatografia de afinidade da proteína N produziam altos títulos de anticorpos anti-VBI no soro sanguíneo, embora não há na literatura dados demonstrando que a proteína N do VBI induz anticorpos ao nível das mucosas ou das secreções aí presentes.

Embora em nosso estudo não tenha sido feita nenhum tipo de avaliação sobre a atividade imunogênica da proteína N sobre as respostas imune celulares, deve ser lembrado nesse ponto que, além de a proteína N recombinante estimular fortemente a produção de anticorpos, ela induz em aves imunizadas respostas imunes cito-mediadas como a reação de hipersensibilidade cutânea tardia ou a proliferação de linfócitos após estímulo com partículas íntegras do VBI (BOOTS et al., 1992). Em complementação a esses achados, foi verificado que preparações plasmidiais contendo o inserto de todo ou parte da extremidade 3' do gene N, são capazes de induzir uma forte ativação de linfócitos TCD8 com atividade citotóxica *in vitro* sobre as células infectadas com o VBI e também *in vivo*, pois suspensões enriquecidas com estes linfócitos foram capazes de transferir imunidade adotiva e proteção contra a infecção sistêmica por esse mesmo vírus (SEO et al., 1997, COLLISON et al., 2000).



**Figura 19.** Títulos médios de anticorpos anti-VBI em amostras de secreção lacrimal colhidas antes e depois do desafio com a estirpe virulenta do VBI, de aves imunizadas com a proteína N recombinante

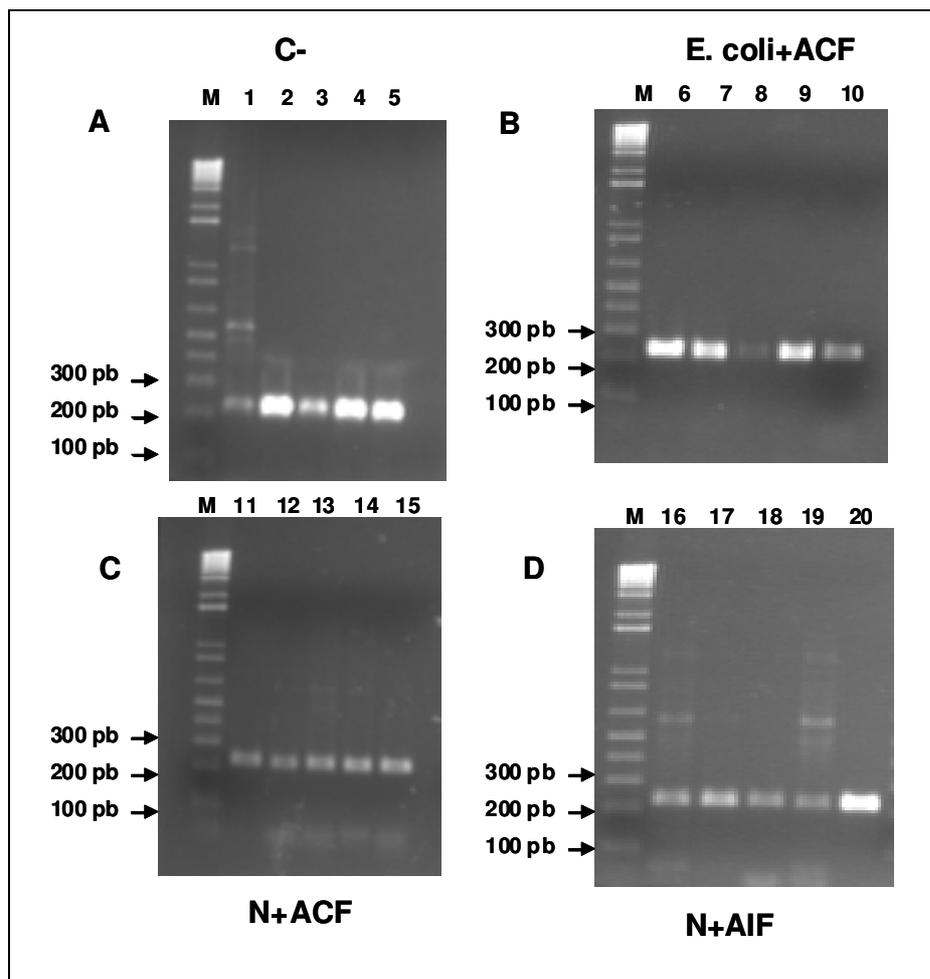


**Figura 20.** Títulos médios de anticorpos anti-VBI em amostras de soro sanguíneo colhidas antes e depois do desafio com a estirpe virulenta do VBI, de aves imunizadas com a proteína N recombinante.

### 5.3.3. Avaliação da proteção traqueal em aves imunizadas com a proteína N recombinante do VBI

As amostras de traquéia oriundas de todos os quatro grupos experimentais de aves que foram testadas em nosso estudo revelaram a presença de um fragmento amplificado de cerca de 228 pb, que é compatível com o tamanho esperado para o fragmento amplificado do gene S1, com a utilização do par de oligonucleotídeos

empregado nessa análise, conforme descrito na literatura (WANG & TSAI, 1996). Ficou, então, evidenciado, que a imunização com a proteína N recombinante não estimulou o desenvolvimento de mecanismos mais efetivos de imunidade que impedissem a replicação e/ou permanência do VIB junto à traquéia das aves desafiadas (Figura 21).



**Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Produtos amplificados a partir da RT-PCR. - M Tamanho Molecular 1kb Plus DNA Ladder, (A) Controle negativo e desafiadas (B) Controle positivo-Aves imunizadas com extrato bruto de células de *E. coli* linhagem BL21+ adjuvante completo de Freud e desafiadas (C) Aves imunizadas com a proteína N recombinante (50 ug) + adjuvante completo de Freud e desafiadas (D) Aves imunizadas com a proteína N recombinante (50 ug) + adjuvante incompleto de Freud e desafiadas .

A proteção da traquéia contra o desafio com a estirpe virulenta M41 foi também avaliada, examinando-se, no 5º dia pós-desafio, o efeito do VBI sobre a integridade do movimento ciliar do epitélio traqueal dos anéis traqueais obtidos das aves imunizadas com a proteína N recombinante e daquelas dos grupos controle negativo da imunização. Os resultados dessa análise demonstraram um escore máximo de ciliostase nos anéis traqueais tanto das aves do grupo controle negativo da imunização, como também dos grupos imunizados com a proteína N recombinante. Portanto, foi encontrada uma total ausência de proteção contra a infecção experimental produzida por uma alta dose da estirpe virulenta M41 do VBI, isto é,  $10^4$  DIE<sub>50</sub>/ave, pois a atividade ciliar foi praticamente abolida nas amostras de anéis traqueais analisadas das aves de todos os grupos experimentais. A propósito, a dose usualmente recomendada para os testes de eficácia de vacinas contra o VBI pela OIE (2008) é de  $10^{3,0}$  a  $10^{3,5}$  DIE<sub>50</sub> por ave desafiada, que é, por conseguinte 0,5 Log<sub>10</sub> menor do que a quantidade de vírus usada em nosso estudo.

Essa ausência de proteção traqueal detectada aqui pode ter relação, com o fato, de que a dose infectante usada por nós foi 100 vezes maior do que a dose que tem sido empregada em estudos para a avaliação da atividade imunogênica de preparações de proteínas virais recombinantes ou de DNA plasmidial contendo insertos dos genes de proteínas estruturais do VBI (BOOTS et al., 1992, SEO et al., 1997, COLLISON et al., 2000).

Além disso, as diferenças na capacidade imunizante da preparação de proteína N usada por nós com relação aos experimentos anteriormente feitos com formulações similares dessa mesma proteína recombinante do VBI, podem ser explicadas com base na comparação do nosso protocolo de imunização com o que foi adotado anteriormente por BOOTS et al. (1992). No caso, esses autores usaram um protocolo diferente de imunização e de re-imunização, no qual a proteína N recombinante foi somente empregada na primo-imunização, sendo que, na re-imunização, as aves receberam uma vacina contendo partículas inativadas do VBI com adjuvante oleoso do tipo ACF. Esse procedimento foi adotado por esses autores, porque na verdade, o interesse maior dessa investigação era usar a proteína N recombinante para induzir respostas imunes

de memória que proporcionassem um aumento ainda maior das respostas para uma vacina convencional inativada contra o VBI (BOOTS et al., 1992).

Por outro lado, o trabalho conduzido por IGNJATOVIC & GALLI (1994) usando as três principais proteínas estruturais do VBI parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade para a imunização de aves evidenciou que somente a glicoproteína S1 é capaz de induzir, após no mínimo três imunizações um estado de proteção efetiva ao nível dos rins e uma pequena proteção junto à mucosa traqueal, ao desafio com doses mais elevadas e similares as que foram por nós usadas, da estirpe virulenta do VBI. Esses autores não encontraram nenhuma proteção significativa, nem ao nível dos rins nem da traquéia nas aves imunizadas três vezes com as proteínas N e M do VBI, embora essas aves tivessem produzido enormes quantidades de anticorpos, especialmente contra a proteína N, os quais foram detectados no método indireto de ELISA. Pode-se entender, então, que os nossos resultados com a proteína N recombinante produzida em *E. coli*, estão mais alinhados com esses que foram observados por IGNJATOVIC & GALLI (1994) do que com os do estudo de BOOTS et al. (1992).

## 5.4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a proteína N recombinante derivada da estirpe M41 do VBI e produzida em *E. coli*, na forma de fusão com a cauda de poli-histidina na região N-terminal da proteína recombinante, quando utilizada para a imunização experimental de aves como uma possível vacina contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, apesar de ter estimulado a produção de altos títulos de anticorpos específicos, tanto no soro sanguíneo como na secreção lacrimal, não induziu níveis efetivos de proteção traqueal nessas aves ao desafio com a estirpe virulenta homóloga do VBI.

## 5.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. F.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J.; LAUDENCIA, I. R. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 26, n. 4, p. 805-825, 1982.

ANDRADE, L. F.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: effect of vaccine strain and route of administration. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 27, n. 1, p. 178-187, 1983.

BOOTS, A. M.; LIEROP, M. J. Van; KUSTERS, J. G.; KOOTEN, P. J. Van; ZEIJST, B. A. Van Der; HENSEN, E. J. **Immunology**, Oxford, v. 72, n.1, p. 10 -14, 1991.

BOOTS, A. M. H.; BERNAISSE-TROUW, B. J.; HESSLINK, W.; RIJKE, E.; SCHRIER, C.; HENSN, E. J. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avain coronavirus nucleocapsid protein. **Vaccine**, v. 10, p. 119-124, 1992.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). **Disease of poultry**, 10<sup>th</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 511-526.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; WANG, L.; WILLIAMS, A. K. An overview of molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poult. Sci. Rev.**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 41-55, 1992.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and Assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian bronchitis virus. **Res. Vet. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 14-21, 1985.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F. S.; SENA, J. A. D.; GIVISIEZ, P. E. N.; FURUYAMA, C. R. A. G.; MONTASSIER, H. J. Development and application of Saccharomyces cerevisiae-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, New York, v. 138, n. 1-2, p. 117-138, 1994.

IGNJATOVIC, J., GALLI, L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 24, n.2, p. 313-332, 1995.

OIE. Office International des Epizooties. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Disponível em: < <http://www.oie.int/eng/normes/manual/>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2008.

SEO, S. H.; WANG, H. L.; SMITH, R.; COLLISON, E. W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapside induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; KADAVIL, S. K. Ciliary activity a criterion for association resistance to Infectious Bronchitis Virus with ELISA antibody titer. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 27, n. 2, p. 485-490, 1983.

WANG, L.; Dave J.; Lisa H. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 34, n.3, p. 327-338, 1994.

WANG, C. H.; TSAI, C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, New York, v. 141, n. 9, p. 1677-1688, 1996.

WANG, L.; XU, Y.; COLLISSON, E. W. Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 139-145, 1997.

## CAPÍTULO 6 – IMPLICAÇÕES

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus de aves domésticas (espécie *Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves. A BI se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e altamente infecciosa, acompanhada, não raro, por lesões significativas dos tratos respiratório e uro-genital.

Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com consequentes perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola.

Na indústria avícola, rotineiramente muitas amostras são colhidas e analisadas por ocasião da suspeita da ocorrência de doenças infecciosas ou no monitoramento da resposta imune pós-vacinal, de forma que se torna cada vez mais necessário o acesso a metodologias de execução mais simples e econômicas. Assim, é fundamental que estejam disponíveis reagentes eficientes e baratos, que ofereçam boa reprodutibilidade quando usados em ensaios sorológicos. Ademais, uma parcela importante de reagentes sorológicos ideais depende da existência ou do preparo de antígenos purificados, em especial, aqueles derivados de patógenos virais.

Um aspecto relevante no contexto acima é que há uma limitação importante no sentido de tornar disponíveis reagentes ideais para serem usados em testes sorológicos aplicados ao diagnóstico de patógenos virais. Assim sendo, há uma necessidade de serem produzidas preparações purificadas de vírus, o que requer a propagação de grandes volumes desses microrganismos e o seu processamento por técnicas demoradas, trabalhosas e muito onerosas, tal como se configura a purificação de massa antigênica do VBI por meio de inoculação em ovos embrionados SPF, seguido da ultracentrifugação em gradiente de sacarose para serem utilizados no preparo dos kits comerciais de ELISA, que são usados na detecção e mensuração de anticorpos contra diversos patógenos virais aviários.

O VBI apresenta, quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S) a qual é clivada pós-traducionalmente em S1 e S2, a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N). Dentre elas, a proteína N do VBI, que se constitui na proteína principal do capsídeo, é produzida em grande quantidade na infecção por esse vírus e tem a sua estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes do VBI, além de ser altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação. Dessa forma, a proteína N do VBI se constitui no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos para a detecção/mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupo desse vírus, o que seria de grande utilidade para o imunodiagnóstico da infecção por este vírus.

Atualmente, predomina no imunodiagnóstico da bronquite infecciosa, o uso do método indireto de ELISA, o qual emprega, como antígeno adsorvido à fase sólida, ou suspensões de partículas íntegras do VBI purificadas por ultra-centrifugação, ou, com menor frequência, preparações da nucleoproteína recombinante inteira, ou em fragmentos, provenientes de amostras de referência do VBI, especialmente as estirpes GRAY, M41, H120 e H52. As maiores vantagens que são destacadas para a escolha de se utilizar a proteína N recombinante do VBI são, além do fato de simplificar o preparo do antígeno viral para esse ensaio sorológico, as propriedades imunoquímicas dessa proteína, com destaque para a sua elevada imunogenicidade e a sua maior conservação, acarretando uma maior reatividade cruzada com anticorpos de amostras séricas de aves infectadas com diferentes variantes do VBI, as quais, com frequência, estão circulando nos plantéis avícolas de diversas partes do mundo, inclusive, por vezes rompendo a barreira imunitária específica induzida pelas vacinas comerciais

A tecnologia do DNA recombinante proporciona a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias para a produção de proteínas recombinantes em sistemas hospedeiros heterólogos, que, depois de caracterizadas imunoquimicamente, tornam-se viáveis para serem usadas no desenvolvimento e aplicação, de forma efetiva,

do método indireto de ELISA, destinado à detecção e/ou mensuração de anticorpos anti-VBI específicos.

Dentro desse enfoque principal, o presente trabalho teve um direcionamento, no sentido de contribuir com o diagnóstico da bronquite infecciosa em aves, através da clonagem e produção da proteína N recombinante tanto da estirpe de referência vacinal como de um isolado variante de campo no Brasil, de forma a tornar disponíveis e mais acessíveis os antígenos para serem usados em técnicas de imunodiagnóstico atualmente que são mais frequentemente usadas para a detecção de anticorpos anti-virais específicos dos isótipos IgG e especialmente IgM, produzidos por aves suspeitas de infecção pelo VBI. Ainda e por considerar que a proteína N, como foi destacado antes, é altamente imunogênica e mantém mais conservada a sua composição de aminoácidos e, conseqüentemente, os seus principais epítomos, tanto os de células B como T, participando, assim, mais ativamente da indução de mecanismos de imunidade de proteção ao desafio com o VBI, também foi investigada, nesse estudo, a atividade imuno-protetora dessa proteína recombinante em galinhas, que depois de imunizadas e re-imunizadas foram submetidas ao desafio com estirpe virulenta do VBI, tendo sido demonstrado que, apesar dessa proteína ser capaz de estimular a produção de altos níveis de anticorpos, não houve a indução de proteção contra uma dose infectante mais elevada feito com a estirpe virulenta homóloga e, ademais, ficou evidenciado que há um elevado grau de imunogenicidade e capacidade de reatividade cruzada com anticorpos produzidos contra a proteína N recombinante do VBI.

Em conclusão, a proteína N recombinante do VBI produzida em *E. coli* possui elevada imunogenicidade, comprovada em nosso estudo pela sua capacidade de reagir fortemente com anticorpos induzidos pela infecção com diferentes estirpes desse vírus, ou pela vacinação contra esse mesmo vírus e que estão presentes em um número relevante de amostras séricas obtidas de aves mantidas em criações comerciais, tendo um grande potencial de ser aplicada de forma mais eficaz em técnicas de imunodiagnóstico da BI, como o ELISA e o Western-blotting. E, ainda, embora não tenha sido confirmada a atividade imuno-protetora dessa proteína recombinante, quando a mesma foi usada na imunização experimental contra o VBI, a sua

imunogenicidade foi em parte demonstrada, já que níveis elevados de anticorpos foram induzidos nas aves experimentalmente imunizadas com preparações dessa proteína recombinante, sendo necessário, então, que sejam testados novos protocolos de imunização combinados com vacinas contra a BI existentes, bem como com doses menores de vírus-desafio, a fim de se dimensionar melhor o papel dessa proteína estrutural do VBI nos mecanismos de proteção que atuam no organismo hospedeiro das aves.