

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO CURRICULAR EM PRÁTICAS
VETERINÁRIAS REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA
MOLECULAR NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO
PRETO (FCFRP-USP)**

**PROJETO DE INTERESSE: EXPRESSÃO, SOLUBILIDADE E
PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA PARA FINS
DIAGNÓSTICOS**

Abraão Isaque da Silva

Jaboticabal-SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO AO
LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA MOLECULAR NA FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO (FCFRP-USP)

**PROJETO DE INTERESSE: EXPRESSÃO, SOLUBILIDADE E
PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA
PARA FINS DIAGNÓSTICOS**

Abraão Isaque da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR EM
PRÁTICA VETERINÁRIA APRESENTADO À
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS, CÂMPUS DE JABOTICABAL,
UNESP, PARA GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

Jaboticabal-SP

2º semestre/2025

S586r

Silva, Abraão Isaque da

Relatório final do estágio curricular obrigatório do curso de Medicina Veterinária, realizado junto ao Laboratório de Parasitologia Molecular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP): expressão, solubilidade e purificação de antígenos do vírus da influenza aviária para fins diagnósticos. / Abraão Isaque da Silva. -- Jaboticabal, 2025

64 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcos Rogério André

1. Parasitologia. 2. Biologia molecular. 3. Influenza aviária. 4. Proteínas recombinantes. I. Título.

Abraão Isaque da Silva

Expressão, Solubilidade e Purificação de Antígenos do Vírus da Influenza Aviária para fins diagnósticos

Relatório de Estágio em Prática Veterinária apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**.


Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Coorientador (se houver):


Área de Concentração: Parasitologia Molecular

Trabalho aprovado em 02/12/2025


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS ROGERIO ANDRE**
Data: 04/12/2025 08:55:19-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Prof. Dr. Marcos Rogério André
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **VICTORIA VALENTE CALIFRE DE MELLO**
Data: 04/12/2025 12:15:38-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Victória Valente Califre de Mello
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **ELIZ OLIVEIRA FRANCO**
Data: 04/12/2025 16:38:05-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Me. Eliz Oliveira Franco
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **CAIO JOSE XAVIER ABIMUSSI**
Data: 04/12/2025 17:23:15-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Caio José Xavier Abimussi - Coordenador de Estágio do Curso de Medicina Veterinária

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos derramadas na minha vida e pela saúde dada a mim para atingir meus objetivos.

À minha mãe Dulcineia por toda educação, apoio, ensinamentos e amor, sempre acreditando em meu potencial. Mesmo distante, carrega todos os seus ensinamentos e seu amor, crucial para a superação de cada obstáculo até aqui enfrentando.

Ao meu irmão Neemias que sempre me incentivou e me apoiou nos estudos, cujas nossas conversas, hora cômica e hora intelectual, sustentou nosso propósito de crescer profissionalmente na vida e a nunca desistir de nossos sonhos, independentemente do que aconteça.

Ao meu orientador de iniciação científica e de estágio curricular, minha inspiração de pesquisador e professor desde as aulas de Parasitologia Veterinária, cujo histórico profissional e excelência no ensino torna-o admirável por todos.

Às minhas amigas Ana Carolina Mussopapo, Emily Pereira, Gabriela Scheffer, Gabriela Valente e Maria Eduarda Oliveira pelos momentos felizes compartilhados durante a graduação e por toda admiração e apoio.

Às minhas primas Myriam Bazan e Yara Bazan que jamais duvidaram do meu potencial, sempre proferindo palavras de apoio, amor e carinho, cujo vínculo familiar sustenta toda nossa convivência, essencial para que eu nunca esqueça quem sou e do que sou capaz.

À minha gata Cersei que sempre esteve ao meu lado durante a escrita desse relatório e por tornar minha vida mais feliz.

À minha supervisora de estágio, Prof.^a Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) pela concessão do estágio curricular na unidade universitária, permitindo conhecer toda a estrutura da faculdade e participar de inúmeros experimentos que contribuíram significativamente com minha formação acadêmica.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) por todas as oportunidades oferecidas durante a graduação, oferecendo subsídios para o meu crescimento pessoal e profissional, ao mesmo tempo possibilitando conhecer pessoas incríveis que levarei para vida junto com todos os aprendizados aqui conquistados.

SUMÁRIO

Relatório de Estágio Curricular	1
1. Introdução	1
2. Descrição do Local de Estágio	1
3. Descrição das atividades.....	6
3.1. Cultura e capacitação de células VERO	6
3.2. Cultura de <i>Neospora caninum</i>	9
3.3. Transformação de cepas de <i>E. coli</i> com plasmídeos comerciais	10
3.4. Expressão de proteínas recombinantes por autoindução	11
3.5. Expressão de proteínas recombinantes por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).....	13
3.6. Análise da solubilidade.....	14
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	14
3.8. Purificação de proteínas recombinantes com cauda de poli(histidina) por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC)	17
4. Discussão das atividades desenvolvidas.....	22
5. Conclusão	23
6. Referências	23
Projeto de interesse.....	26
1. Introdução	26
2. Revisão de Literatura.....	27
2.1. Características do vírus da Influenza Aviária	27
2.2. Epidemiologia.....	28
2.3. Fisiopatogenia.....	29
2.4. Sinais clínicos.....	30
2.5. Diagnóstico.....	30
2.6. Prevenção e controle.....	31

3. Metodologia.....	32
3.1. Transformação de cepas de <i>Escherichia coli</i> com plasmídeos comerciais contendo sequências codificadoras do vírus Influenza Aviária.....	32
3.2. Expressão das proteínas HA e NP a 37°C e 18°C por autoindução	34
3.3. Expressão das proteínas HA e NP a 37°C e 18°C sob indução de IPTG	34
3.4. Análise da solubilidade.....	35
3.5. Purificação das proteínas HA-1, HA-2 e NP-1 recombinantes produzidas em <i>E. coli</i>	35
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	36
4. Resultados.....	36
5. Discussão.....	44
6. Conclusão	47
7. Referencias	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Entrada do Bloco S da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Fonte: Arquivo Pessoal.	3
Figura 2: Bancada de trabalho do Laboratório de Parasitologia Molecular (PARAMOL). Fonte: Arquivo Pessoal.....	3
Figura 3: Área de armazenamento de produtos químicos e pesagem. Fonte: Arquivo Pessoal.	4
Figura 4: Sala de proteômica. Fonte: Arquivo Pessoal.	4
Figura 5: Sala de cultivo de bactérias. Fonte: Arquivo Pessoal.	5
Figura 6: Sala de cultivo de células. Fonte: Arquivo Pessoal.	5
Figura 7. A. Células mãe em Meio RPMI e SFB. B. Células VERO antes da tripsinização. Fonte: Arquivo Pessoal.....	8
Figura 8: Células VERO após 1h da aplicação de tripsina. Fonte: Arquivo pessoal.....	8
Figura 9. Presença do parasita <i>N. caninum</i> nas células Vero (seta) após 4 dias de cultura. Fonte: Arquivo pessoal.....	10
Figura 10: Colônias de <i>E. coli</i> BL21 contendo um plasmídeo comercial. Fonte: Arquivo pessoal.....	11
Figura 11. A. Preparo do pré-inóculo a partir da inoculação de colônias de <i>E. coli</i> BL21 contendo plasmídeo comercial. B. Inóculo de colônias de <i>E. coli</i> BL21 após 24h. A opacidade indica a utilização de todos os substratos do meio e crescimento bacteriano. Fonte: Arquivo Pessoal.....	12
Figura 12. Disruptores/homogeneizadores de células ultrassônicos Branson Sonifier®. Fonte: Arquivo pessoal.....	14
Figura 13. A. Placas de vidros de géis de poliacrilamida fixada no suporte. B. Gel de poliacrilamida após a polimerização. A linha azul indica os limites do gel de empilhamento, enquanto a linha vermelha evidencia o gel de corrida. Fonte: Arquivo pessoal.	16
Figura 14. Sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Fonte: Arquivo pessoal.	17

- Figura 15.** Em realce, representação dos grupamentos imidazol, tiol e indol dos aminoácidos histidina, triptofano e cisteína. Fonte: Lehninger, 2014 18
- Figura 16.** Sistema de purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC). A seta verde representa o lisado filtrado, enquanto a seta vermelha indica a resina com o agente quelante e íons metálicos. Fonte: Arquivo Pessoal. 19
- Figura 17.** Quantificação das proteínas presentes em cada fração do tampão de eluição coletada com diferentes concentrações de imidazol. A intensidade do azul é diretamente proporcional a quantidade de proteína. Da esquerda para a direita foi aplicado o flow-through, eluição 20 mM, 50mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM. Fonte: Arquivo Pessoal. 21
- Figura 18.** Representação esquemática do vírus da Influenza Aviária. Fonte: Kanaujia et al., 2022. 28
- Figura 19.** **A.** Colônias de E. coli BL21 contendo plasmídeo do gene da HA-1 de influenza aviária. **B.** Colônias de E. coli BL21 contendo plasmídeo do gene da HA-2 de influenza aviária. **C.** Colônias de E. coli BL21 contendo plasmídeo do gene da NP-1 de influenza aviária Fonte: Arquivo Pessoal..... 34
- Figura 20.** Expressão da HA-1, HA-2 e NP-1 recombinantes a 37°C pela adição de mix de açúcar (autoindução) e IPTG visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa (seta preta), enquanto a HA-2 possui um peso molecular de 43 kDa (seta azul) e NP-1 48 kDa (seta laranja). NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. Fonte: Arquivo Pessoal. 37
- Figura 21.** Expressão da HA-1, HA-2 e NP-1 recombinantes a 18°C pela adição de mix de açúcar (autoindução) e IPTG visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa, enquanto a HA-2 possui um peso molecular de 43 kDa e NP-1 48 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições de cada proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. Fonte: Arquivo Pessoal..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 22.** **A.** Solubilidade da HA-1 e HA-2 recombinantes a 37°C visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa, enquanto a HA-2 possui um peso molecular de 43 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições de cada proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. Fonte: Arquivo Pessoal. **B.**

Solubilidade da NP-1 recombinante a 37°C visualizada em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A NP-1 possui um peso molecular de aproximadamente 48 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições da proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. Fonte: Arquivo Pessoal.....38

Figura 23. A. Solubilidade da HA-1 e HA-2 recombinantes a 18°C visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa, enquanto a HA-2 possui um peso molecular de 43 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições de cada proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. Fonte: Arquivo Pessoal. **B.** Solubilidade da NP-1 recombinante a 18°C visualizada em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A NP-1 possui um peso molecular de aproximadamente 48 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições da proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. Fonte: Arquivo Pessoal.....39

Figura 24. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da hemaglutinina 1 (HA-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 1 (~50 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.40

Figura 25. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da hemaglutinina 2 (HA-2) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 2 (~43 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.41

Figura 26. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação em condições nativas da HA-2 (HÁ-2) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de lavagem e eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando 50 mM de imidazol para lavagem e 250 mM de imidazol para eluição. A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 2 (~43 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal...42

Figura 27. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da nucleoproteína 1 (NP-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). O círculo vermelho indica a banda compatível com o peso molecular esperado da nucleoproteína 1 (~48 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à direita. Fonte: Arquivo Pessoal.

.....43

Figura 28. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação em condições nativas da nucleoproteína 1 (NP-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de lavagem e eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando 75 mM de imidazol para lavagem e 250 mM de imidazol para eluição. A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da nucleoproteína 1 (~48 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

.....44

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório tem como finalidade apresentar e discutir as atividades desenvolvidas pelo discente Abraão Isaque da Silva durante o período de Estágio Curricular em Práticas Veterinárias, pertencente à grade curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

O Estágio Curricular em Práticas Veterinárias tem como objetivo garantir o aperfeiçoamento e sedimentação dos saberes teóricos e práticos adquiridos no decorrer do curso de Medicina Veterinária, promovendo a integração entre a formação acadêmica e experiência profissional. Tal experiência, capacita o discente para o exercício competente e ético da profissão, proporcionando o entendimento da realidade atual das áreas da Medicina Veterinária e seus diferentes contextos socioeconômicos.

A realização do estágio ocorreu no período de 04/08/2025 a 05/12/2025 no Laboratório de Parasitologia Molecular (PARAMOL), perfazendo um total de 600 horas como exigido no Regulamento Geral do Estágio Curricular em Práticas Veterinárias. O referido laboratório está localizado no Bloco S (Bloco de Pesquisa), 1º andar, sala 38A da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) localizado na Rua Prof. Ernesto Giebrecht, 13 - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, CEP: 14040-900 sob supervisão da Prof.^a Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de Parasitologia Molecular (PARAMOL) (**Figura 1**) tem como linha de pesquisa expressão de proteínas solúveis recombinantes de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em *Escherichia coli* com o intuito de avaliar potenciais candidatos para uso profilático, terapêutico e/ou diagnóstico para Neosporose e Toxoplasmose.

O laboratório é composto por uma área de trabalho (**Figura 2**), área de armazenamento de produtos químicos e pesagem (**Figura 3**), sala de proteômica (**Figura 4**), sala de cultivo de bactérias (**Figura 5**) e sala de cultivo de células (**Figura 6**).

As principais atividades realizadas no laboratório são cultivo de células VERO, cultivo de *N. caninum* e *T. gondii*, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* BL21, solubilidade de proteínas, purificação de proteínas via cromatografia de afinidades por íon metálicos imobilizados (IMAC), eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), *Western Blotting*, imunização e produção de anticorpos policlonais, sequenciamento, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Reação em Cadeia Quantitativa da Polimerase (qPCR), clonagem, modelagem de proteínas, imunofluorescência em microscopia confocal, ensaio de proliferação, citotoxicidade e invasão de parasitos.

A infraestrutura laboratorial utilizada no estudo é composta por diferentes áreas especializadas, sendo uma área de trabalho, área de armazenamento e pesagem de produtos químicos, sala de proteômica, sala de cultura bacteriana e uma sala de cultura de células. A área de trabalho é equipada com pipetas automáticas, materiais de consumo (ponteiras, tubos de microcentrífuga, luvas, parafilme e etc), banho-maria, vórtex, *spin* e homogeneizador magnético. A área de armazenamento de produtos químicos e pesagem possui reagentes químicos sólidos e líquidos, materiais de consumo, microscópio de luz, banho seco, eletroporador, espectrofotometria de cubeta, pHmetro, balança analítica e balança semianalítica. A sala de proteômica possui um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sistema de água osmose reversa e leitor de placar para quantificação de proteínas. A sala de cultura bacteriano é dotada de uma capela de fluxo laminar, estufa e incubadora de bancada com aquecimento, circulação e agitação. Enquanto a sala de cultura de células possui uma capela de fluxo laminar, estufa e microscópio de luz.

A equipe atualmente é composta pela Prof.^a Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui (Médica Veterinária), Mestra e Doutoranda Luciana Xavier (Engenheira de Bioprocessos e de Biotecnologia), Mestranda Wellika Dorta de Oliveira (Bióloga) pela técnica de laboratório Maraísa Palhao Verri (farmacêutica), e pelo pesquisador associado Luiz Miguel Pereira (farmacêutico e docente da Estácio).



Figura 1. Entrada do Bloco S da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 2. Bancada de trabalho do Laboratório de Parasitologia Molecular (PARAMOL). Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 3. Área de armazenamento de produtos químicos e pesagem.
Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 4. Sala de proteômica. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 5. Sala de cultivo bacteriano. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 6. Sala de cultivo de células. Fonte: Arquivo Pessoal.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

As atividades laboratoriais desenvolvidas pelo estagiário incluíram cultura de células VERO, cultivo de *N. caninum*, expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* BL21, solubilidade de proteínas, gradiente de imidazol, purificação de proteínas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), quantificação de proteínas por testes colorimétricos e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O Laboratório de Parasitologia Molecular preza pelo cumprimento rigoroso das normas de biossegurança em laboratórios visando a integridade da saúde dos pesquisadores, bem como a execução de experimentos de qualidade e com baixa incidência de contaminação. Para isso, todas as atividades foram conduzidas com as vestimentas adequadas (sapato fechado, calça comprida) e com uso obrigatório de equipamentos de proteção individual, como jalecos e luvas.

3.1. Cultura e capacitação de células VERO

As células Vero são linhagens celulares contínuas, ou seja, possuem alta taxa de replicação, derivadas de rins de macacos-verdes africanos (*Chlorocebus sabaues*), amplamente utilizadas em pesquisa, produção de vacinas e testes de terapias antivirais. Sua ampla utilização está relacionada à capacidade dessas células serem cultivadas por longos períodos e susceptibilidade à infecção por diversos agentes patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários. Além disso, são células que carecem de interferon, uma vez que não produzem citocina, tornam-se vulneráveis a infecções e úteis para estudos com agentes patogênicos (Takata et al., 1994; Ammerman, Beier-Sexton e Azad, 2009).

Para *N. caninum*, protozoário do filo Apicomplexa e agente etiológico da neosporose, doença caracterizada por episódios de abortamento em bovinos e quadros neurológicos em cães, as células Vero demonstram boa susceptibilidade à infecção por este parasito. A inoculação do parasito nestas células permite a obtenção de um número necessário de taquizoítos para fins de experimentos e diagnósticos (Cadore et al., 2009; Brochi, 2022).

A cultura de células Vero inicia-se com a tripsinização de células previamente cultivadas (célulasmãe) em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e SFB (Soro Fetal Bovino). O meio RPMI consiste em uma solução salina balanceada enriquecida com aminoácidos, vitaminas, glicose e um sistema-tampão de bicarbonato para manter o pH neutro (Sigma-Aldrich, 2025). O soro fetal bovino, produzido a partir de sangue coletado de fetos bovinos, é um suplemento amplamente utilizado na cultura de células, fornecendo nutrientes, fatores de

crescimento, hormônios, lipídios e eletrólitos importantes para manutenção e crescimento celular (Jochems, Van der Valk e Baumans, 2002).

O meio antigo contendo RPMI e SFB com células confluentes (células com monocamadas preenchidas) é desprezado (**Figura 7A e 7B**). Após o descarte, são adicionados 2 mL de tripsina nas garrafas para lavar as células, com o objetivo de retirar porções remanescentes do SFB que interferem na tripsinização das células. O volume é descartado e novamente adicionam-se 2 mL de tripsina para iniciar o processo de tripsinização, armazenando as garrafas na estufa com temperatura e atmosfera controlada por 10-60 minutos (36,4°C e CO₂ a 5%) (**Figura 8**). A ação da enzima tripsina cliva as proteínas responsáveis por garantir a adesão das células sobre uma superfície ou com outras células, desprendendo-as da superfície de cultivo e as separando uma das outras (Huang et al., 2010).

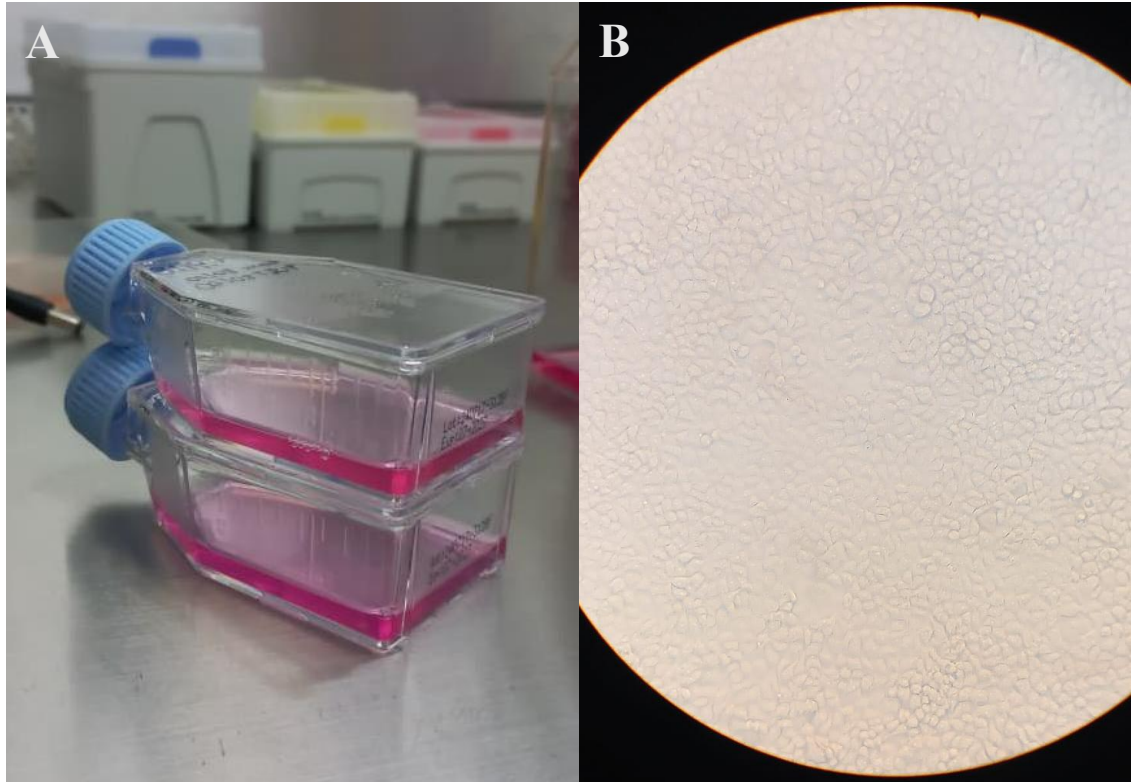


Figura 7. A. Células mãe em Meio RPMI e SFB. B. Células VERO antes da tripsinização. Aumento de 100x. Fonte: Arquivo Pessoal.

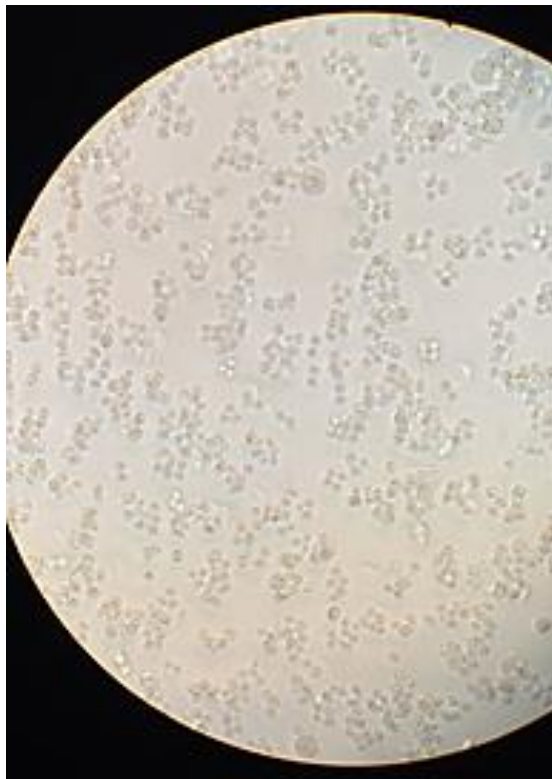


Figura 8: Células VERO após 1h da aplicação de tripsina. Aumento de 100x. Fonte: Arquivo pessoal

A cultura de células que foi tripsinizada será dividida em três garrafasfilhas. Para garantir a manutenção da proliferação celular, são adicionados 5 mL de meio RPMI e SFB 5% na garrafa contendo as células-mãe com 2 mL de tripsina. Dessa garrafa-mãe, retira-se 6 mL e distribuem-se 2 mL em 3 novas garrafas. À garrafa-mãe, a qual ficará com um volume remanescente de 1 mL, são adicionados mais 6 mL de meio RPMI suplementados com SFB para continuar o crescimento celular. As garrafas-filhas são completadas para um volume final de 7 mL com meio RPMI suplementado com SFB e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48-72h. Caso, durante o processo de cultivo, o meio ficar amarelado, é indicativo da utilização de todos os substratos necessários para o crescimento celular e acidificação do meio. Nesse caso, descartar o meio antigo e adicionar mais 6-7 mL de meio RPMI suplementado com SFB.

3.2. Cultura de *Neospora caninum*

Assim que as células das garrafas-filhas se tornam confluentes, o meio RPMI enriquecido com SFB é descartado e 6 mL de meio RPMI sem SFB é adicionado na garrafa-filha. Um mililitro de cultura de *N. caninum* contendo o plasmídeo Lac-Z é aplicado nas células filhas. A enzima β -galactosidase, sintetizada pelo gene Lac-Z, realiza uma reação colorimétrica com Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG), levando uma mudança na sua coloração de amarelado para avermelhado, indicando a presença do parasito. Para manutenção do plasmídeo, é acrescentado 1,4 μ L de clorofenicol na garrafa contendo as células filhas e o parasito. A cultura é incubada a 37,5C e 5% CO₂ por 4 a 7 dias até destruição das células (**Figura 9**).

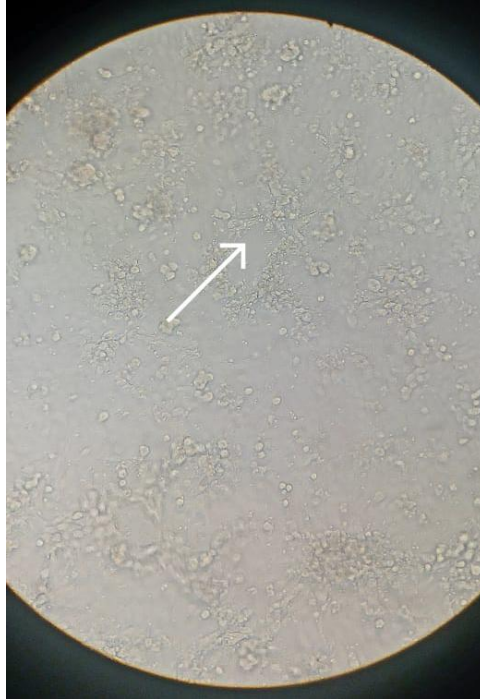


Figura 9. Presença do parasito *N. caninum* nas células Vero (seta) após 4 dias de cultura. Aumento de 100x. Fonte: Arquivo pessoal

3.3. Transformação de cepas de *E. coli* com plasmídeos comerciais

Plasmídeos comerciais foram ressuspensos em água ultrapura, conforme instruções do fabricante, e, em seguida, foram utilizados para transformação de linhagens de *E. coli* para expressão (BL21). O método para inserção dos plasmídeos foi a eletroporação. Resumidamente, 1 mL do plasmídeo foi adicionado a 50 mL de suspensão de *E. coli* eletrocompetente, realizado de acordo com protocolo descrito por Dower et al. (1988). Após eletroporação, as células foram resuspensas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, dextrose 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM e MgCl₂ 10 mM) e incubadas por 1 hora a 37°C e 300 rpm. O conteúdo total foi plaqueado em LB ágar seletivo (Difco LB ágar, BD) contendo 50 µg/mL de kanamicina (sulfato de kanamicina; Gibco). Essas colônias foram utilizadas para expressão de proteínas recombinantes (**Figura 10**).

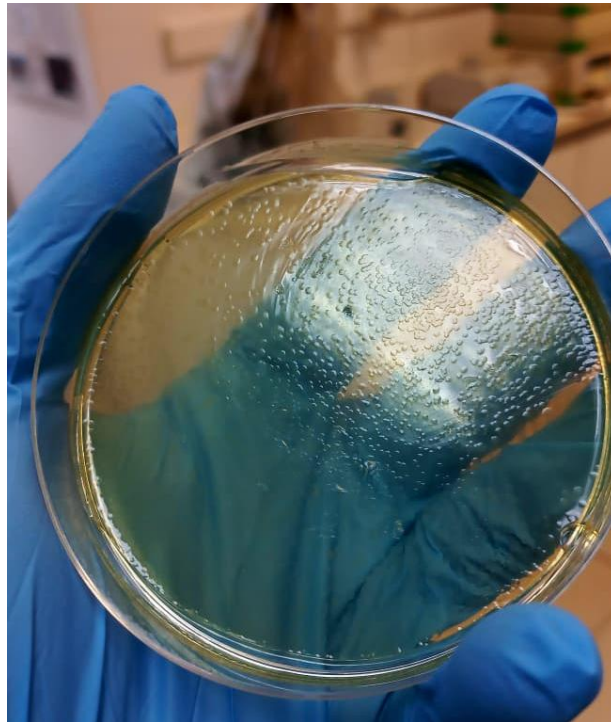


Figura 10.: Colônias de *E. coli* BL21 contendo um plasmídeo comercial. Fonte: Arquivo pessoal

3.4. Expressão de proteínas recombinantes por autoindução

A expressão de proteínas recombinantes por autoindução é um método no qual se utiliza um meio de cultura especial com fontes de carboidratos (glicerol, glicose e lactose) para induzir a produção de proteínas sem a presença de um indutor químico, como o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Fox e Blommel, 2017). A lactose atua como um indutor da expressão de proteínas em bactérias via mecanismo do *operon lac*, possibilitando que a bactéria sintetize as enzimas necessárias para metabolizar a lactose apenas quando ela está disponível no meio e quando a glicose está ausente. A glicose mantém o *operon lac* reprimido mesmo na presença de lactose, evitando expressão precoce, enquanto o glicerol fornece carbono para o crescimento das células na medida em que a glicose é consumida o suficiente para liberar o *operon lac*, fazendo com que a lactose atue e ative-o, sem a necessidade de IPTG. (Sanganeria e Bordoni, 2022). O *operon lac* consiste em um conjunto de genes que regulam a codificação de proteínas relacionadas ao metabolismo da lactose. Na ausência de lactose, uma proteína repressora (*repressor lac*) fica ligada a uma região do DNA denominada operador, impossibilitando que a enzima RNA polimerase transcreva os genes estruturais do operon (*lacZ*, *lacY* e *lacA*). Por outro lado, na presença de lactose, essa molécula é convertida em alolactose no interior da célula, a qual atua como um indutor ligando-se ao repressor *lac* e modificando sua estrutura, desligando-o do operador. À medida que o operador está livre, possibilita que a RNA polimerase inicie a

transcrição dos genes do operon, sendo o *lacZ* responsável por codificar a enzima beta-galactosidase que cliva a lactose em glicose e galactose, *lacY* codifica a permease, uma proteína envolvida no transporte de lactose para o interior da célula, e *lacA* responsável pela codificação da transacetilase (Berg, Tymoczko e Stryer, 2002; Reece et al., 2011).

Para expressão da proteína recombinante, um pré-inóculo foi feito em 5 mL de meio LB seletivo (7,5 μ L/mL de kanamicina) a partir da inoculação de colônias de *E. coli* contendo o plasmídeo transformado. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas, sob agitação (70 rpm). Em seguida, foi inoculado 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) em meio LB seletivo com 40 μ L/mL de mix de açúcar (glicerol 0,6%, glicose 0,05% e lactose 0,2%) e foi incubada novamente a 37°C por 24 horas, sob agitação, até densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) atingir 0,4-0,5 (Studier, 2014) (**Figura 11A e 11B**).

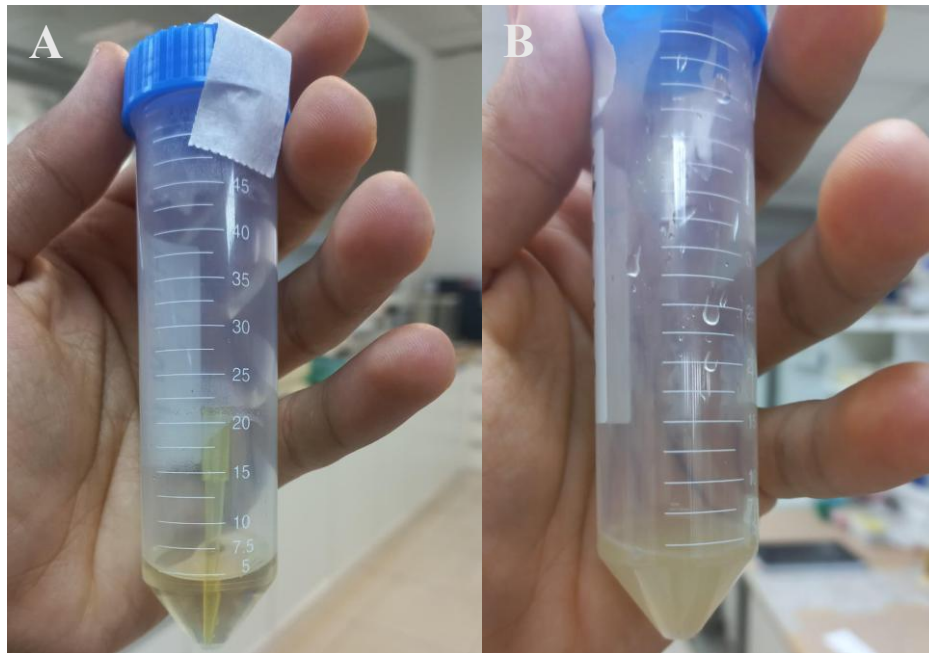


Figura 11. **A.** Preparo do pré-inóculo a partir da inoculação de colônias de *E. coli* BL21 contendo plasmídeo comercial. **B.** Inóculo de colônias de *E. coli* BL21 após 24h. A opacidade indica a utilização de todos os substratos do meio e crescimento bacteriano. Fonte: Arquivo Pessoal.

Cinquenta microlitros de cultura foram coletados para verificar a expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida. O restante da cultura foi centrifugado a 1000 x g por 2 minutos em tubos de 1,5 mL para obtenção do pellet, o qual foi armazenado a -20°C para purificação. O controle não induzido foi feito sob as mesmas condições, mas sem adição do mix de açúcares.

3.5. Expressão de proteínas recombinantes por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)

O IPTG é um reagente que induz a expressão de proteínas recombinantes em sistemas bacterianos, atuando como um análogo da lactose para ativar o *operon lac*. Em bactérias, o operon *lac* encontra-se naturalmente reprimido pela ação do repressor *lac*, impossibilitando a produção de proteínas. O IPTG, por ser um análogo não-metabolizável da alolactose, se liga ao repressor *lac* alterando sua conformação e impedindo sua ligação com o DNA, possibilitando que a RNA polimerase estabeleça uma conexão com o promotor e inicie a transcrição do gene de interesse. O início da transcrição leva a produção do mRNA (RNA mensageiro), o qual é traduzido em proteínas pela maquinaria celular, levando à produção das proteínas recombinantes (Müller-Hill, 1996; Brewster et al., 2012; Razo-Mejia et al., 2018). Uma das principais vantagens do IPTG está ligada à sua estabilidade, não sendo degradado pela célula e fazendo com que sua concentração permaneça constante, promovendo uma indução de expressão estável e previsível (Dvorak et al., 2015).

Para expressão da proteína recombinante, uma colônia de *E. coli* BL21 foi inoculada em 5 mL de meio LB seletivo (7,5 μ L/mL de kanamicina). A cultura foi incubada a 37°C, por 18 horas, sob agitação (70 rpm). Em seguida, foi diluído 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) em 5 mL de meio LB seletivo (Exemplo: Inocular 0,125 mL da cultura em 5 mL de meio com antibiótico) e incubar novamente por 2-3 horas a 37°C, sob agitação (70 rpm), até densidade óptica de 600 nm (DO₆₀₀) atingir 0,6. Após isso, é adicionado o IPTG em uma concentração final de 0,5 mM. Incubar por até 4 horas a 37°C ou a 16 horas a 18°C, 70 rpm. Foram coletados 50 μ L da cultura para verificar a expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida. O restante da cultura foi centrifugada (10.000 x g, 2 minutos) em tubos de 1,5 mL (centrifugar 1,5 mL duas vezes para acumular um pellet maior). O pellet foi então armazenado a -20°C. O controle não induzido foi feito sob as mesmas condições, mas sem adição de IPTG.

3.6. Análise da solubilidade

Cada pellet bacteriano foi sonificado com 750 μL de tampão salino (Ex. PBS pH 7,2 ou Tris-Fosfato). O sonicador ultrassônico processa amostras líquidas e suspensões a partir de ondas sonoras, causando o rompimento de membranas celulares e liberação de conteúdos celulares como proteínas e DNA, dispersão de partículas e homogeneização de misturas (**Figura 12**). Centrifugou-se (10.000 x g por 5 minutos) e repetiu-se a sonicação, mantendo o mesmo tampão no tubo, ou seja, cada amostra foi sonicada duas vezes. Entre cada sonicação, as amostras foram mantidas em gelo para evitar a desnaturação das proteínas. Uma nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi coletado e armazenado (extrato solúvel). O pellet restante foi ressuspensionado em 750 μL do mesmo tampão (extrato insolúvel). Os extratos solúvel e insolúvel, juntamente com o controle não induzido, foram analisados por SDS-PAGE.



Figura 12. Disruptores/homogeneizadores de células ultrassônicos Branson Sonifier®. Fonte: Arquivo pessoal.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Na eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as proteínas são desnaturadas e revestidas com moléculas de SDS, adquirindo carga negativa aproximadamente proporcional ao seu comprimento. Dessa forma, a separação ocorre

predominantemente em função do tamanho molecular: proteínas menores migram mais rapidamente através da matriz porosa, enquanto proteínas maiores apresentam menor mobilidade eletroforética (Silva et al., 2019). Os géis de poliacrilamida são um excelente meio de suporte para separações eletroforéticas, uma vez que possuem transparência, elasticidade, porosidade controlável e compatibilidade com uma variedade de compostos químicos, permitindo analisar a expressão e solubilidade de proteínas (Sambrook et al., 2001).

A concentração do gel de poliacrilamida pode ser ajustada para maximizar a separação de moléculas com base em tamanho molecular. Dessa forma, géis com maior porcentagem de acrilamida (por exemplo, 15%), apresentam poros menores, dificultando a passagem de proteínas de alto peso molecular, permitindo a passagem de proteínas menores (kDa). Em contraste, géis de baixa porcentagem de acrilamida, (como 6%) apresentam poros maiores, facilitando a separação das proteínas de alto peso molecular (Petrov, Tsa e Puglisi, 2013). A poliacrilamida é constituída pela polimerização de dois compostos, a acrilamida e a bis-acrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida), a partir de uma reação iniciada por N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio (APS), formando uma matriz porosa. O APS ativa o TEMED que, por sua vez, ativa o monômero de acrilamida iniciando o processo de polimerização, formando uma rede de poros uniforme. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente que desnatura as proteínas, quebrando sua estrutura secundária e terciária, linearizando a cadeia de aminoácidos, além de conferir uma carga negativa uniforme às proteínas (Guilliat, 2002).

Com o suporte montado (**Figura 13A**), 5 mL de água foram adicionados no espaço de 1 mm entre os vidros para verificar possível vazamento no sistema. Na ausência de vazamento, a água era descartada e adicionavam-se de 4,5 a 5,0 mL de uma solução contendo 30% acrilamida, 3,3% bisacrilamida, água Milli-Q, 1,5M Tris pH 8,8, 10% SDS, 99% TEMED e 10% APS, seguido de uma camada de isopropanol para alinhar a porção superior do gel e evitar o contato direto com o ambiente. Após 1 hora de polimerização, a camada de isopropanol é removida e 2 mL de uma solução de gel de empilhamento (água Milli-Q, 30% acrilamida, 3,3% bisacrilamida, 1,0M Tris pH 6,8, 10% SDS, 99% TEMED e 10% APS) era adicionada sobre o gel de corrida com o propósito de nivelar/empilhar as proteínas a serem depositadas posteriormente, achatando-as e permitindo sua passagem pelo gel de forma linear. Com adição do gel de empilhamento, um pente é adicionado para formação dos poços do gel para aplicação de amostras (**Figura 13B**).

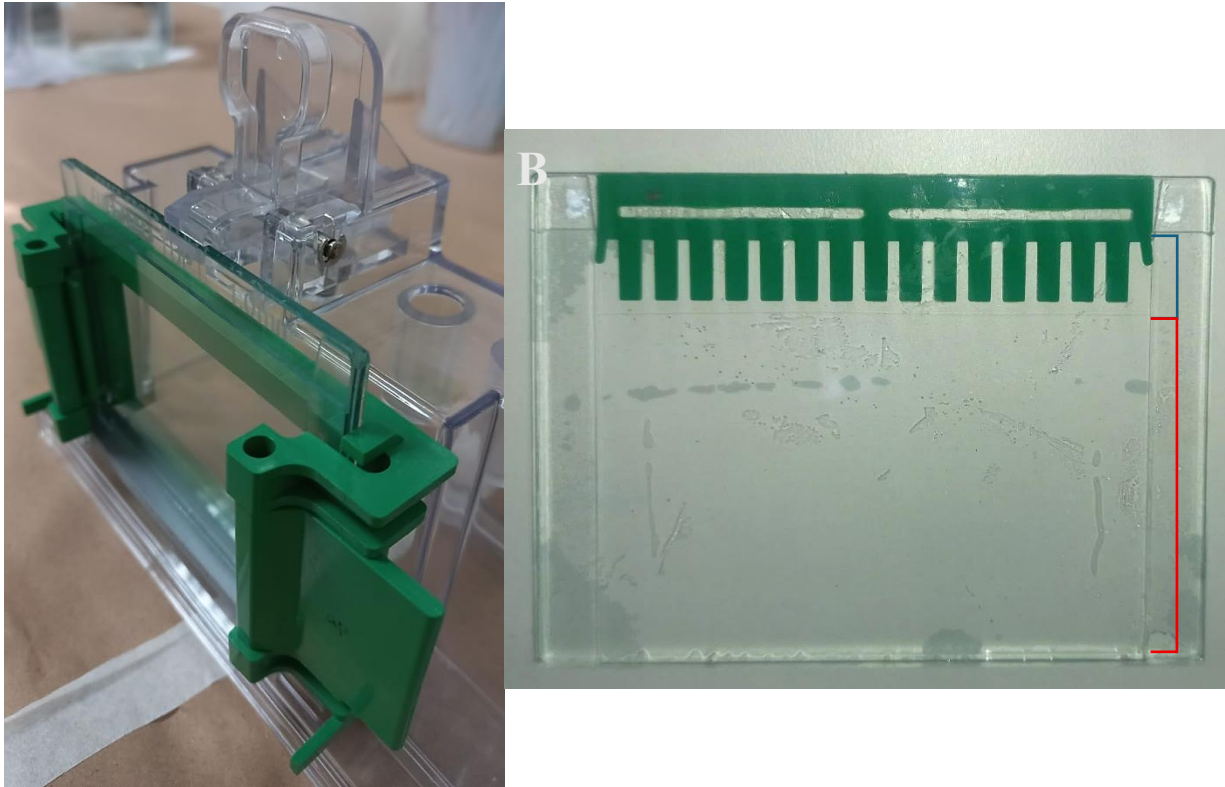


Figura 13. A. Placas de vidros de géis de poliacrilamida fixada no suporte. B. Gel de poliacrilamida após a polimerização. A linha azul indica os limites do gel de empilhamento, enquanto a linha vermelha evidencia o gel de corrida. Fonte: Arquivo pessoal.

Uma vez pronto, o gel é fixado no suporte de corrida e imerso no tanque contendo tampão de corrida Tris–Glicina–SDS 1×. Com as amostras aplicadas, o sistema foi fechado e submetido a um campo elétrico (120V, 400mA e 10W) por 1h 30min para promover a migração e separação das proteínas (**Figura 14**).

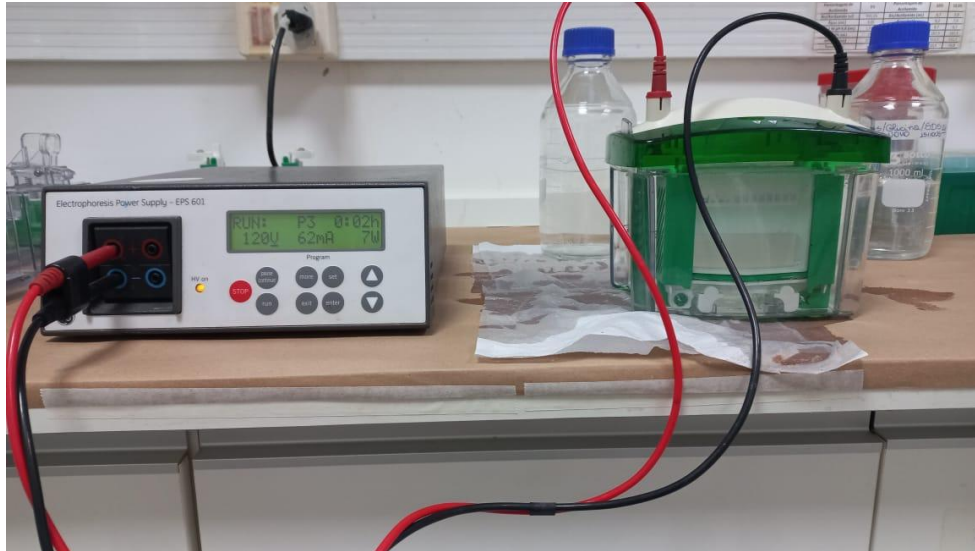


Figura 14. Sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Fonte: Arquivo pessoal.

3.8. Purificação de proteínas recombinantes com cauda de poli(histidina) por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC)

A técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), desenvolvida por Porath e colaboradores (1975), é baseada na capacidade das proteínas se ligarem reversivelmente aos íons metálicos através de ligações coordenadas, cuja proteína funciona como uma base de Lewis cedendo elétrons aos íons metálicos (Porath et al., 1975). O metal está fixado, covalentemente, a uma matriz por um agente quelante. Os íons metálicos interagem com os resíduos de histidina, cisteína e triptofano das proteínas por ligações complexas que combinam interações de van der Waals, efeitos hidrofóbicos e ligações coordenadas (Hemdan e Porath, 1985; Sharma e Agarwal, 2001).

O processo de purificação de proteínas por IMAC depende de fatores como escolha da matriz, agente quelante, íon metálico e condições de adsorção e eluição (Aquino et al., 2004). O agente quelante tem como função se ligar covalentemente à matriz e imobilizar os íons metálicos no suporte (Wong et al., 1991). A seleção do íon metálico é fundamental na técnica, sendo os íons de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} os mais utilizados na purificação de proteínas que possuem resíduos de histidina, triptofano e cisteína interagindo com os agrupamentos imidazol, indol e tiol, respectivamente (**Figura 15**).

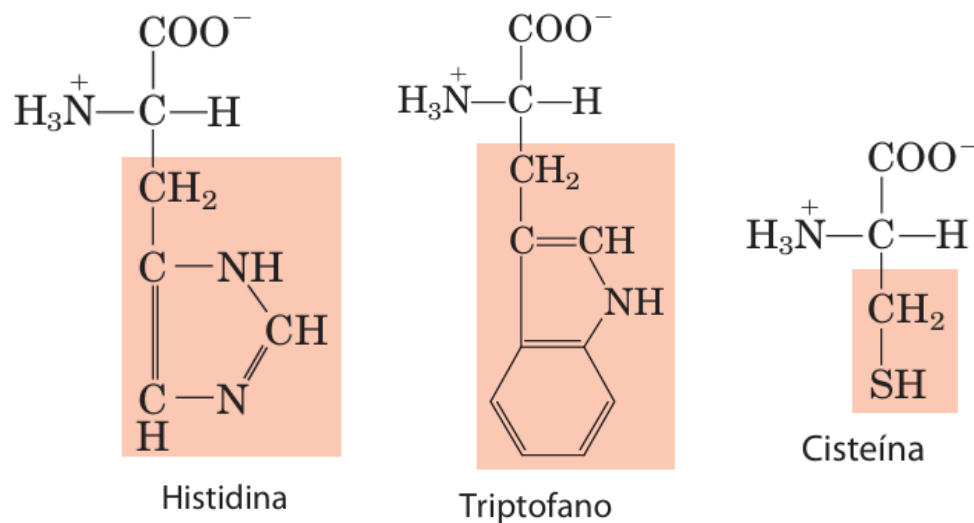


Figura 15. Em destaque, representação dos grupamentos imidazol, tiol e indol dos aminoácidos histidina, triptofano e cisteína. Fonte: Lehninger, 2014.

O mecanismo de adsorção das proteínas ocorre a partir de ligações coordenadas, nas quais a proteína compartilha pares de elétrons ao metal que se encontra imobilizado na matriz pelo agente quelante. Em proteínas com caudas de histidina, a adsorção é favorecida em uma faixa de pH alcalino (entre 6 e 8), onde os nitrogênios do anel de imidazol encontram-se desprotonados, isto é, estão em uma condição cujo pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis, interagindo por coordenação com os íons metálicos da matriz (Lemire, Harrison e Turner, 2013).

A eluição das proteínas fixadas na matriz cromatográfica pode ser realizada por redução de pH (<6,0), ocasionando protonação dos resíduos de histidina, pela adição de um agente competidor com capacidade de interagir com o metal, pelo deslocamento do complexo metal-proteína por um quelante mais forte ou pela eluição isocrática (Sulkiwiski, 1985; Gutiérrez, del Valle e Galán, 2007).

Em relação ao método de adição de um agente competidor, moléculas com maior afinidade pelo sítio de ligação são adicionadas ao meio, competindo com a proteína adsorvida pela ligação ao metal, sendo um método conveniente já que evita a redução do pH na recuperação de proteínas adsorvidas a matriz, evitando sua desnaturação. Esse método exige, ao final, a eliminação do agente competitivo do meio contendo a proteína purificada via ultrafiltração, permeação em gel ou diálise (Wong, Albrigh e Wang, 1991; Beitle e Atai, 1992).

3.8.1. Gradiente de Imidazol

Esse processo tem como objetivo avaliar as melhores condições de purificação de proteínas recombinantes. Com as proteínas expressas, a cultura é centrifugada a 4.000g, 4°C por 15 minutos em tubos tipo falcon de 50 mL. O sobrenadante é descartado e 4 mL de solução tampão base (50 mM HEPES, 0,3 M NaCl pH 7,0) são adicionados ao *pellet*. Um mililitro da suspensão foi distribuído em quatro tubos de 1,5 mL, sendo sonicado duas vezes e centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos após cada sonicação. O sobrenadante de cada tubo foi coletado e distribuído em um tubo tipo falcon de 15 mL. Adicionou-se solução tampão base nos *pellets* remanescentes e novamente foram sonicados. O sobrenadante foi coletado e distribuído no mesmo tubo tipo Falcon de 15 mL.

Um mililitro de resina de Nuvia IMAC (ácido nitrilotriacético + Ni^{2+}) foi adicionado em uma coluna PD-10 (**Figura 16**), a qual foi lavada, três vezes consecutivas com a solução tampão base. O lisado foi adicionado na coluna de níquel a partir de um filtro de 5 μm para retenção de agregados. O líquido que ultrapassou a coluna, denominado de *flow through*, foi coletado em falcons de 15 mL.



Figura 16. Sistema de purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC). A seta verde representa o lisado filtrado, enquanto a seta vermelha indica a resina com o agente quelante e íons metálicos. Fonte: Arquivo Pessoal.

No processo de eluição das proteínas adsorvidas na matriz cromatográfica, 2 ml de tampões de lavagem com diferentes concentrações de imidazol foram adicionado na coluna e coletados em microtubos de 1,5 mL na seguinte ordem:

- Adicionaram-se 2 mL do tampão de Eluição 20 mM (20 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl) e recolher;

- Adicionaram-se 2 mL do tampão de Eluição 50 mM (50 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl) e recolher;

- Adicionaram-se 2 mL do tampão de Eluição 75 mM (75 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl) e recolher;

- Adicionaram-se 2 mL do tampão de Eluição 100 mM (100 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl) e recolher;

- Adicionaram-se 2 mL do tampão de Eluição 250 mM (250 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl) e recolher;

A presença de proteínas em cada tampão de eluição coletado é avaliada pelo método de Bradford, uma técnica espectrofotométrica rápida com a finalidade de quantificar a concentração de proteínas em uma solução. O método baseia-se na interação do corante azul Brilhante de Coomassie às proteínas, levando à mudança de coloração de marrom-avermelhada para azul, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteína (Bradford, 1976) (**Figura 17**). Para essa análise, 15 uL de cada fração do tampão de eluição foram adicionados aos poços da placa contendo o reagente de Bradford.

Ao final do processo, a coluna é lavada com água Milli-Q e armazenada em etanol a 20% em condições de refrigeração para reutilização com a mesma proteína. Para determinar a melhor condição de purificação, um gel de SDS-PAGE foi corrido com as seguintes amostras na ordem: **Marcador, Não Induzido, Induzido, FT, Eluição 20 mM, Eluição 50 mM, Eluição 75 mM, Eluição 100 mM e Eluição 250 mM.**

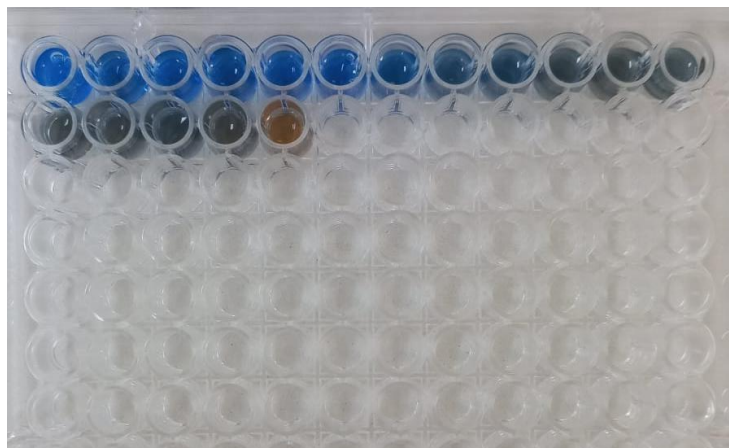


Figura 17. Quantificação das proteínas presentes em cada fração do tampão de eluição coletadas com diferentes concentrações de imidazol. A intensidade do azul é diretamente proporcional à quantidade de proteína. Da esquerda para a direita foi aplicado o flow-through, eluição 20 mM, 50mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM. Fonte: Arquivo Pessoal.

3.8.2. Purificação em condições nativas

Para um *pellet* de cultura (50 mL), foram adicionados 5 mL de solução tampão base (50mM HEPES, 0,3M NaCl pH 7,0) e a suspensão foi homogeneizada. Em seguida, 1 mL da suspensão foi distribuído em 5 tubos de 1,5 mL, os quais foram centrifugados por 1 min a 10 000 rpm. Os *pellets* resultantes foram sonicados duas vezes e centrifugados por 3 min a 10.000 rpm, coletando-se o sobrenadante. Essa etapa foi repetida até que o *pellet* não apresentasse mais redução visível de tamanho. O lisado foi então filtrado em um filtro de 5 μ m e aplicado a uma coluna de níquel (1 mL de resina, para 50 mL de cultura) equilibrada com a solução tampão base. O líquido que ultrapassou a coluna foi então coletado (*flow-through*).

Posteriormente, a coluna foi lavada com a melhor concentração de tampão de eluição determinada no gradiente de imidazol para remover as proteínas ligadas inespecificamente à coluna, adicionando de 1 em 1 mL na coluna. Verificou-se então, pelo método de Bradford, o nível de contaminantes. Caso Bradford permanecesse positivo, novas lavagens com o mesmo tampão foram realizadas. Por fim, a eluição foi realizada com Tampão contendo 250 mM de imidazol + 50 mM HEPES + 300 mM NaCl, de 1 em 1 mL, coletando cada fração. A presença de proteínas foi verificada por Bradford. As quatro frações com maior concentração proteica mais concentradas foram submetidas a SDS-PAGE para avaliação da pureza das proteínas.

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular no Laboratório de Parasitologia Molecular (PARAMOL) permitiram articular conhecimentos teóricos de biologia molecular com suas aplicações práticas na Medicina Veterinária, especialmente nas áreas de cultivo celular, manipulação de parasitos e purificação de proteínas recombinantes. Essa vivência fortaleceu habilidades essenciais para o exercício científico e profissional do médico veterinário, capacitando o discente a compreender e aplicar processos biotecnológicos envolvidos na pesquisa de agentes parasitários.

O trabalho com cultura de células VERO possibilitou compreender os requisitos fisiológicos e nutricionais das linhagens celulares para replicação de parasitos, bem como sua susceptibilidade a diferentes patógenos, como relatado por Ammerman, Beier-Sexton e Azad (2008) e Takata e colaboradores (1994). Ademais, a utilização das células VERO no cultivo de *N. caninum* evidenciou a eficiência dessa linhagem celular para obtenção de taquizoítos destinados a análises moleculares e imunológicas (Cadore et al., 2009; Brochi, 2022).

No que diz respeito às técnicas microbiológicas mencionadas, a transformação de cepas de *E. coli* BL21 com plasmídeos comerciais ressalta a relevância do uso de sistema heterólogos na produção e expressão de proteínas recombinantes. O entendimento das vias de transformação e expressão gênica em bactérias revelou o papel da regulação transcricional no operon *lac*, além da participação de diferentes indutores, como a autoindução por lactose e indução química por IPTG, na expressão de proteínas recombinantes (Fox e Blommel, 2009; Dvorak et al., 2015).

A análise de solubilidade e purificação de proteínas por meio da cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) permitiram compreender os mecanismos de interação entre proteína-metal, além de evidenciar como os parâmetros físico-químicos comprometem a eficiência de purificação. O uso do gradiente de imidazol atesta a seletividade do método e a importância da manutenção do pH e força iônica na obtenção de proteínas em condições nativas, segundo Porath e colaboradores (1975) e Sulkowski (1985).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) forneceu uma abordagem prática sobre separação e análise de proteínas em função do peso molecular, da eficiência da expressão e purificação de proteínas recombinantes (Sambrook et al., 2001; Silva et al., 2019). A interação dessa técnica com testes colorimétricos de Bradford propiciou uma abordagem qualitativa para visualizar a expressão e pureza das proteínas.

O estágio proporcionou o aperfeiçoamento das habilidades laboratoriais, como manipulação de microrganismos, preparo de soluções, uso de equipamentos de precisão e aplicação de protocolos. Concomitantemente, a vivência em um laboratório de pesquisa, contribuiu para o desenvolvimento de um raciocínio crítico, integrando desde a execução de experimentos até a interpretação dos respectivos resultados, evidenciando a importância do rigor metodológico e da ética na prática profissional.

5. CONCLUSÃO

As atividades conduzidas durante este estágio contribuíram significativamente na formação científica e profissional do discente, abrangendo conhecimentos fundamentais de biologia celular, microbiologia, bioquímica e biotecnologia. A experiência adquirida no Laboratório de Parasitologia Molecular permitiu consolidar a compreensão e a aplicação de métodos de biologia molecular no contexto da Saúde Única (One Health), reforçando a importância dessas ferramentas na prevenção, diagnóstico e controle de doenças infecciosas de importância animal e humana.

6. REFERÊNCIAS

- AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; AZAD, A. F. Growth and maintenance of Vero cell lines. **Current Protocols in Microbiology**, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>.
- AQUINO, L. C. L. **Purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(illstidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- BEITLE, R. R.; ATAAL, M. M. Interaction of proteins with immobilized metal ions. **AIChE Symposium Series**, v. 88, p. 34, 1992. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-582-4_2.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: W. H. Freeman, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22512/>. Acesso em: 9 nov. 2025.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- BREWSTER, R. C.; JONES, D. L.; PHILLIPS, R. Ajustando a força do promotor por meio do design do local de ligação da RNA polimerase em *Escherichia coli*. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, e1002811, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002811>.
- BROCHI, J. C. V. **Controle Redox em *Neospora caninum*: investigação de enzimas do sistema antioxidante**. 2021. Tese (Doutorado em Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à

Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. DOI: 10.11606/T.60.2022.tde-28042022-151321. Acesso em: 30 out. 2025.

CADORE, G. C.; VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; SANGIONI, L. A.; CAMILLO, G. Suscetibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao *Neospora caninum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1581–1586, 2009. DOI: 10.1590/S0103-84782009005000093.

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 6127–6145, 1988. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>.

DVORAK, P.; CHRAST, L.; NIKEL, P. I.; DOVERSKÁ, M.; RESNEKOV, O.; LOMOVSKA, J.; DE LORENZO, V. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 201, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>.

FOX, B. G.; BLOMMEL, P. G. Autoinduction of protein expression. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, p. 5.23.1–5.23.18, 2009. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0523s56>.

GUILLIATT, A. M. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. **Methods Molecular Biology**, v. 187, p. 1-11, 2002. doi: 10.1385/1-59259-273-2:001.

GUTIÉRREZ, R.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M. A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. **Separation & Purification**, v. 23, p. 71-111, 2007. <https://doi.org/10.1080/15422110601166007>.

HEMDAN, E. S.; PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography: Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. **Journal of Chromatography**, v. 323, n.2, p. 255–264, 1985. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90388-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90388-7).

HUANG, H. L.; HSING, H. W.; LAI, T. C.; CHAN, H. T.; LIN, H. P.; CHANG, Y. C.; CHANG, J. Y.; CHEN, Y. C.; KUO, P. L.; LIN, C. W.; HSIAO, M. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n. 36, 2010. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-36>.

JOCHEMS, C. E.; VAN DER VALK, J. B.; STAFLEU, F. R.; BAUMANS, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, n. 2, p. 219–227, 2002. <https://doi.org/10.1177/026119290203000208>.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–384, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.

MARTINS, C. B.; BONESSO, M. A.; LIMA, M. M.; FERRAZ, L. C.; LACERDA NETO, J. C.; MACHADO, R. Z. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em potros. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 618–624, 2005.

MÜLLER-HILL, B. **The lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm**, Berlin, New York: De Gruyter, 1996. <https://doi.org/10.1515/9783110879476>.

PETROV, A.; TSA, A.; PUGLISI, J. D. Analysis of RNA by analytical polyacrylamide gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v. 530, p. 301–313, 2013. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00016-6>

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography: a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598–599, 1975. <https://doi.org/10.1038/258598a0>.

RAZO-MEJIA, M.; BARNES, S. L.; BELLIVEAU, N. M.; CHURE, G.; EINAV, T.; LEWIS, M.; PHILLIPS, R. Ajustando a regulação transcricional por meio de sinalização: uma teoria preditiva da indução alostérica. **Cell Systems**, v. 6, n. 4, p. 456–469, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.02.004>.

REECE, J. B.; URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; JACKSON, R. B. **Campbell Biology**. 10. ed. San Francisco: Pearson, 2011.

SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGANERIA, T.; BORDONI, B. Genetics, Inducible Operon. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564361/>. Acesso em: 9 nov. 2025.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: Role of ionic strength and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 243, n. 1, p. 61–72, 2001. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7846>.

SIGMA-ALDRICH. **RPMI 1640 Media**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers/rpmi-1640-media>. Acesso em: 31 out. 2025.

SILVA, A. C. S. **Eletroforese em gel de poliacrilamida como uma ferramenta importante na análise da diversidade genética do subgrupo *willistoni* de *Drosophila***. 2019. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2019.

STUDIER, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1091, p. 17–32, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_2

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 1–11, 1985. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90068-X).

TAKATA, C. S.; KUBRUSLY, F. S.; MIYAKI, C.; MENDES, I. F.; RIZZO, E. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 209–212, 1994. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101994000300008>

WONG, J.; ALBRIGHT, R. L.; WANG, N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC): chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods**, v. 20, p. 49–106, 1991.

PROJETO DE INTERESSE

Expressão, solubilidade e purificação de antígenos do vírus da Influenza Aviária para fins diagnósticos.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da influenza aviária tem representado, nas últimas décadas, ameaças constantes à saúde pública, saúde animal e na economia global. Entre 2013 e 2022, 21.249 surtos foram relatados em animais, resultando em uma perda de 325 milhões de aves (Govindaraj et al., 2018; Szablewski et al., 2023). O vírus possui um RNA de cadeia simples com oito segmentos genéticos, que incluem os genes que codificam a hemaglutinina, neuraminidase e mais seis proteínas internas (Lamb e Krug, 2001; Duo et al., 2018). As mutações virais representam um importante elemento para o surgimento de estirpes pandêmicas, como registradas em quatro momentos ao longo da história, sendo a pandemia por H1N1 em 1918, H1N1 em 2009, H2N2 em 1957 e H3N2 em 1968, causando óbitos de 50 milhões de pessoas (Webster et al., 1993; Smith et al., 2009; CDC, 2023).

O risco generalizado de transmissão zoonótica é elevado devido a adaptabilidade do vírus da influenza aviária a diversos hospedeiros mamíferos e aviários. A interação entre aves silvestres, hospedeiros naturais do vírus e animais domésticos, favorece a transmissão do agente e ocorrência de recombinações genéticas com outros subtipos presentes em aves e mamíferos, culminando no surgimento de estirpes epidêmicas e pandêmicas (Shi et al., 2017). A transmissibilidade e dispersão do vírus estão associadas a aves migratórias/silvestres, porém a globalização, comercialização de aves vivas em mercados e feiras e criação irregular de aves domésticas, são fatores que ampliam tal dispersão (Zhou et al., 2017). Aproximadamente 75% das infecções relatadas em humanos estão associadas à exposição prévia a aves, especialmente visita a mercado de aves vivas, exposição a aves doentes ou mortas, aves de quintal e exposição ocupacional antes do período de incubação da doença (Philippon et al., 2020).

Além dos impactos na saúde humana e animal, os surtos de influenza aviária também geram prejuízos significativos à cadeia produtiva de aves, afetando produção, exportação e comercialização. Isso ocorre em função do comprometimento do mercado interno e externo para o cumprimento de protocolos e prazos para a normalização da comercialização de produtos oriundos de frangos após a contingência dos surtos (Artois et al, 2018).

Falhas no diagnóstico e sistemas de vigilância insuficientes refletem diretamente no impacto do vírus sobre a Saúde Única e economia, para a qual a obtenção de informações acerca do período de ocorrência, local e forma de transmissão são essenciais para o controle e reconhecimento precoce de potenciais ameaças pandêmicas (Merckx et al., 2017; Jimenez-Bluhm et al; 2023; Morrens et al., 2023; Plaza et al., 2024). O objetivo desse trabalho foi expressar, avaliar a solubilidade e purificar proteínas recombinantes do vírus da influenza aviária para fins diagnósticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do vírus da Influenza Aviária

O vírus da Influenza Aviária pertence à família Orthomyxoviridae, possuindo um genoma constituído por 8 segmentos RNA de fita simples sentido negativo, responsável por codificar até 11 proteínas virais. Trata-se de um vírus envelopado e pleomórfico, com tamanho variando de 80 a 120 nm. Suas diferentes estirpes são classificadas de acordo com os subtipos sorológicos das principais proteínas de superfície viral: a hemaglutinina (HA), que apresenta 16 subtipos (H1-H16) responsável pela ligação do vírus com o ácido siálico da célula hospedeira, e a neuraminidase (NA) com nove subtipos (N1-N9), responsável pela liberação das partículas virais na célula hospedeira (Lamb e Krug, 2001; Tong et al., 2012; Kanaujia et al., 2022). A proteína M1 é responsável por formar a estrutura do capsídeo, enquanto a M2 forma o canal de prótons que acidifica o interior da partícula viral, facilitando a desmontagem do capsídeo de ribonucleoproteínas para o processo de transcrição e replicação dos ácidos nucleicos virais (Seekings et al., 2018). A nucleoproteína (NP) é responsável por proteger e organizar o genoma viral, formação das ribonucleoproteínas e pela replicação e transcrição do RNA viral (Dou et al., 2018) (**Figura 18**).

Por possuir um genoma segmentado, o vírus da influenza aviária sofre rearranjos genéticos, troca de segmentos gênicos entre estirpes e linhagens distintas durante infecções concomitantes, resultado em alto grau de diversidade genética por mutações do tipo mudança antigênica (*antigenic shift*) e deriva antigênica (*antigenic drift*) (Khatchikian, Orlich e Root, 1989; Orlich, Gottwald e Rott, 1994). A mudança antigênica ocorre quando dois ou mais vírus de linhagens distintas infectam a mesma célula hospedeira, trocando segmentos de seus genomas, gerando novos vírus com antígenos de superfície totalmente novos (Lamb, 2008). A deriva antigênica é um processo de evolução gradual e contínuo do vírus, caracterizada pelo

acúmulo de mutações pontuais por erros de replicação do material genético (RNA) em detrimento do mecanismo de “revisão” pouco eficiente da enzima RNA polimerase, fazendo com que essas mutações se acumulem gradualmente ao longo das gerações virais (Yewdell, 2021).

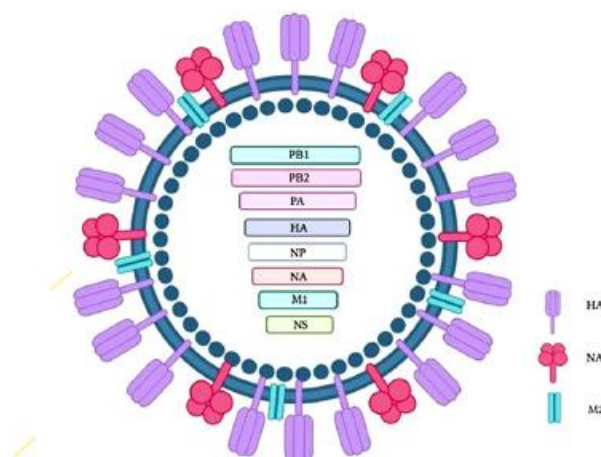


Figura 18. Representação esquemática do vírus da Influenza Aviária. PB1: Polimerase básica 1. PB2: Polimerase básica 2. PA: Polimerase ácida. HA: hemaglutinina. NP: Nucleoproteína. NA: neuraminidase. M: Proteína da Matriz. NS: Proteína não estrutural. Fonte: Kanaujia et al. (2022).

2.2. Epidemiologia

As aves aquáticas pertencentes às ordens Anseriformes (patos, gansos, marrecos e cisnes) e Charadriiformes (maçaricos, batuíras e gaivotas) são consideradas reservatórios naturais do vírus da influenza aviária (Lycett et al., 2016). Grande parte dessas espécies são migratórias, possuindo movimentos cíclicos e previsíveis relacionados à alimentação, reprodução e variações climáticas. A infecção ocorre, majoritariamente, de forma assintomática nessas aves, porém determinados subtipos do vírus se desenvolvem de forma patogênica em outras espécies aviárias. Recentemente, estudos evidenciaram que determinadas estirpes de baixa patogenicidade podem evoluir para formas altamente patogênicas quando a transmissão ocorre horizontalmente entre aves silvestre e domésticas. O contato com aves silvestres, representa um dos principais fatores para o desenvolvimento de surtos da doença em aves domésticas (Lycett et al., 2016; MAPA, 2013).

A influenza aviária é uma ameaça mundial à saúde pública e animal devido a ampla capacidade de disseminação do vírus e ao curto período de incubação, variando de poucas horas a três dias, disseminando-se em cidades em questão de horas e alcançando outros continentes

em poucos dias (Bahl et al., 2016; MAPA, 2013). A disseminação internacional de subtipos da influenza aviária ocorre por vias naturais e comerciais. A circulação natural acontece por meio da migração de aves silvestres e a interação com diferentes espécies de aves durante suas rotas migratórias, enquanto o comércio de aves vivas promove a infecção em seu local de origem, bem como nos países onde são comercializadas, representando um risco à saúde de milhares de aves nas granjas de destino (Anvisa, 2007; WOA, 2023).

A disseminação do vírus varia conforme a estirpe viral, espécie de ave e fatores ambientais. Em geral, a transmissão ocorre predominantemente por contato direto entre aves infectadas e suscetíveis, além da veiculação pela água. O contato direto e extensivo com aves e seus fluidos (secreções respiratórias, sangue, fezes, entre outros), especialmente durante o abate, aumenta significativamente o risco de infecção em função da viabilidade do vírus em matéria orgânica e umidade. O vírus pode resistir até 105 dias na água fria, tornando a água uma importante via de infecção, exigindo dos criadores rigoroso controle de qualidade da água de bebida, incluindo tratamento e cloração da água, quando aplicável (Spachman, 2020; Caron, 2023).

2.3. Fisiopatogenia

Em galináceos (galinhas, perus e codornas), a proteína hemaglutinina (HA) é a principal determinante da patogenicidade, visto que sua sequência de sítio de clivagem proteolítica (PCS) determinará se a infecção será de caráter sistêmico, consequentemente altamente patogênica (HPAIV), ou restrita aos tratos respiratórios e entérico, com baixa patogenicidade (LPAIV) (Rott, 1992).

Assim como outros vírus da família Orthomyxoviridae, a replicação viral inicia-se com o processo de adsorção, por meio da qual ocorre a ligação do vírus com a célula hospedeira com alta afinidade e eficiência. Essa ligação é determinada pela compatibilidade nas barreiras interespecíficas, limitando a infecção do vírus aviário às aves e do vírus humano aos humanos. Tal afinidade é determinada pela hemaglutinina do envelope viral, a qual interage com o receptor de ácido siálico presente na membrana celular. A hemaglutinina (HA) precisa ser clivada por proteases celulares em um sítio específico (PCS) para se tornar funcional. Após a clivagem, o endossomo induz uma alteração conformacional do vírus, possibilitando sua fusão na célula. A capacidade de clivagem é um dos principais fatores que determinam a patogenicidade do vírus. Proteases que clivam subtipos virais de baixa patogenicidade estão localizadas no trato respiratório de mamíferos ou no trato digestivo de aves, culminando em

uma infecção localizada, enquanto proteases que clivam subtipos de alta patogenicidade são expressas em vários sistemas celulares, permitindo a disseminação do vírus em todo o organismo e, conseqüentemente, uma infecção sistêmica (Berchieri Junior et al., 2009; Suguitan Jr. et al., 2012; Gulyaev et al, 2021).

Após a fase de adsorção, o vírus sofre decapsidação no citoplasma da célula, cujo RNA viral migra para o núcleo, servindo de molde para sua replicação e síntese dos RNA mensageiros. Os mRNA saem do núcleo para o citoplasma, onde são codificados os componentes virais através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os novos RNA originados migram juntamente com as proteínas virais para o espaço próximo à membrana plasmática, saindo da célula por um processo denominado de brotamento, facilitado pela ação da neuraminidase, liberando novos vírus para infecção de novas células (Berchieri Junior et al., 2009).

2.4. Sinais clínicos

Historicamente, apenas os subtipos H5 e H7 possuem a capacidade de desencadear quadros clínicos de alta patogenicidade em aves infectadas, as quais apresentam depressão, edema facial com cristas e barbelas edemaciadas e com coloração arroxeada, anorexia, dispnéia com descarga nasal acentuada, hemorragia nas canelas, barbelas e cristas, queda na postura e uma mortalidade de até 100% entre 36-48 horas após a infecção (Swayne e Suarez, 2000; Granato e Bellei, 2007; Kim et al., 2016). Aves infectadas com LPAIV (*Low pathogenic avian influenza virus*) apresentam manifestações respiratórias leves a moderadas (espirro, tosse, corrimento nasal e ocular), diarreia, letargia, anorexia, queda na postura e baixa mortalidade (Nili e Asasi, 2003; Bano, Naeem e Malik, 2003; MAPA, 2023).

Em humanos infectados com subtipos virais de alta patogenicidade, principalmente o H5N1, estirpe viral endêmica de muitos países, há rápida progressão clínica e alta taxa de mortalidade apresentando, na maioria dos casos, pneumonia viral primária evoluindo para uma falha sistêmica culminando em óbito. No início, os pacientes apresentam febre, cefaleia, astenia, mialgia, disfagia, tosse e corrimento nasal (Kim et al., 2016; Kramer et al., 2018).

2.5. Diagnóstico

Como não há sinais clínicos patognomônicos que diferenciem HPAIV e LPAIV em aves, o diagnóstico da doença é conduzido a partir do isolamento viral, detecção de RNA ou proteínas

virais em amostras biológicas, ovos embrionados ou suabes de traqueia e cloaca. Diversas técnicas são empregadas na vigilância sorológica e no diagnóstico, sendo as mais utilizadas a inibição da hemaglutinação (HI) e imunodifusão em gel de agarose para detecção de anticorpos contra a nucleoproteína (NP). Outras técnicas usadas compreendem a vírus-neutralização, fixação de complemento, inibição da neuraminidase e ensaio imunoenzimático (ELISA). Todos os testes sorológicos devem ser feitos 7 a 10 dias após a infecção para que seja possível caracterizá-la e, em casos de positividade, a doença deve ser notificada obrigatoriamente para as autoridades competentes. A abordagem de tais técnicas depende do objetivo do trabalho, sendo necessária a adequação dos propósitos antes da escolha de cada técnica (Moraes et al., 2009; Spackman, 2020).

Outras técnicas de elevada sensibilidade e especificidade apresentaram bons resultados na detecção viral, tais como RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa) e RT-qPCR em tempo real (Realtime RT-qPCR), possibilitando a detecção do genoma viral e sequenciamento do RNA em uma janela relativamente curta de infecção ativa (Fu et al., 2023.)

A coleta de amostras para o diagnóstico oficial da influenza aviária em granjas comerciais é realizada por fiscais do Ministério da Agricultura ou médicos veterinários credenciados, sendo então caracterizadas no Laboratório de Referência Animal (LARA, Campinas) (MAPA, 2013). De acordo com Berchieri Jr. (2009), recomenda-se a realização do diagnóstico diferencial com outras doenças respiratórias de aves, como a Doença de Newcastle, clamidiose, micoplasmose, cólera aviária, laringotraquite infecciosa das galinhas, entre outras.

2.6. Prevenção e controle

Assim como outras infecções virais em animais, não há tratamento antiviral específico para influenza aviária, sobretudo em animais de produção. Portanto, a introdução de medidas de biossegurança que visam reduzir drasticamente o contato de aves selvagens e humanos com aves comerciais é essencial para a prevenção e controle da doença, como controle rigoroso do trânsito de veículos, animais, pessoas e equipamentos, abate e eliminação de plantéis infectados, adoção de sistemas *all in/all out* com período de vazio sanitário adequado, controle de dejetos, fiscalização e tratamento da água e entre outras medidas gerais de biossegurança (Martins, 2001; Berchieri Jr., 2009).

O uso de vacinas comerciais contra influenza aviária é proibido em território nacional, sendo a vacinação autorizada apenas em situações específicas de foco da doença. Nessas situações, toda zona de proteção e vigilância, situada a 10km do foco, é imunizada mediante aprovação do Departamento de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (DSA/MAPA). A anuência para utilização de vacinas em tais áreas está condicionada à concentração de aves na área afetada, características e composição da vacina a ser utilizada e espécies e categorias de aves que serão submetidas à vacinação (MAPA, 2013).

3. METODOLOGIA

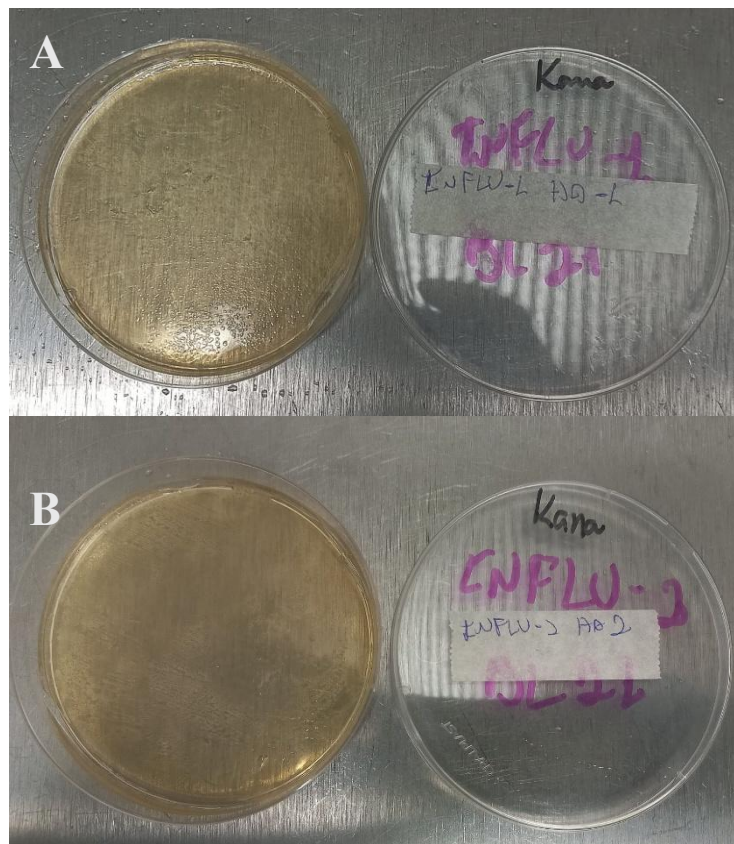
3.1. Transformação de cepas de *Escherichia coli* com plasmídeos comerciais contendo sequências codificadoras do vírus Influenza Aviária

Plasmídeos portadores da sequências codificadoras das proteínas HA (hemaglutinina) e NP (nucleoproteína) do vírus da influenza aviária (**Tabela 1**) foram digeridos com BamHI e HindIII e ligados ao plasmídeo pET28 (Novagen), usando o kit de ligase T4 (Thermo Fisher Scientific) para expressão da cauda de poli-histidina juntamente com as proteínas de interesse. Seguidamente, foram transformados em linhagens de *E. coli* BL21 para expressão, via eletroporação. Um microlitro dos plasmídeos foi adicionado a 50 mL de suspensão de *E. coli* eletrocompetente. A forma recombinante da HA-1, HA-2 e NP com o plasmídeo Pet 28 (5 kDa) tem um peso molecular previsto de 58,3 kDa, 43,5 e 47,8, respectivamente. Após eletroporação, as células foram resuspensas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, dextrose 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM e MgCl₂ 10 mM) e incubadas por 1 hora, 37°C, 300 rpm. O conteúdo total foi plaqueado em LB-ágar seletivo (Difco LB ágar, BD) contendo 50 µg/mL de kanamicina (sulfato de kanamicina; Gibco) (Dower et al., 1988) (**Figura 19A, 19B e 19C**).

Tabela 1. Cobertura de aminoácidos das proteínas HA-1, HA-2 e NP do vírus da Influenza Aviária.

Proteína	Cobertura da proteína (amarelo) + plasmídeo pET28 (verde)
Hemaglutinina 1 (HA-1)	MGSS HHHHH SSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSTVTHAQ DILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFIR VPEWSYIVERANPANDLCYPGSLNDYEELKHMLSRINHFELIQ IIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGAPSSFFRNVVWLIKKNDAYP TIKISYNNTNREDLLILWGIHHSNNAEEQTNLYKNPTTYISVGT STLNQRLAPKIATRSQVNGQRGRMDFFWTILKPDDAIHFEFESNG NFIAPYAYKIVKKGDSSTIMKSGVEYGHGHCNTKCCQTPVGAINSS MPFHNIHPLTIGECPKYVKSNNKLVLATGLRNSPLREKARKRGL

	FGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQ KAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKM EDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQ LRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEKL AAALEHHHHHH
Hemaglutinina 2 (HA-2)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSINSSMPF HNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNSPLREKARKRGLFGAI AGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGF LDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEKLAAL EHHHHHH
Nucleoproteína (NP)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSA SQGTK RSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYIQMCTELKL SDYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKT GGPIYRRRDGKVVRELILYDKEEIRRTWRQANNGEDATAGLT HLMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRR SGAAGA AVKGVGTMMELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTR IAYERMCNILK GKLQTA AQRAMMDQVRESRNP GNAEIEDLIF LARSALILRGSVAHK SCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVGI DPFRLQNSQVFLIRPNENPAHKS QLVWMA CHSAAFEDLRVS SFIRGTRVVPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSSTLEKLAAL HHHHHH



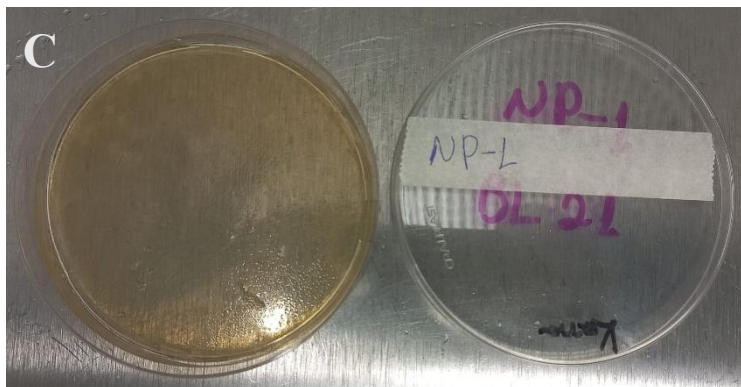


Figura 19. A. Colônias de *E. coli* BL21 contendo plasmídeo do gene da HA-1 de influenza aviária. B. Colônias de *E. coli* BL21 contendo plasmídeo do gene da HA-2 de influenza aviária. C. Colônias de *E. coli* BL21 contendo plasmídeo do gene da NP-1 de influenza aviária
Fonte: Arquivo Pessoal.

3.2. Expressão das proteínas HA e NP a 37°C e 18°C por autoindução

Para verificar as melhores condições de temperatura para expressão das proteínas por autoindução, um pré-inóculo foi feito em 5 mL de meio LB seletivo (7,5 µL/mL de kanamicina) a partir da inoculação de colônias de *E. coli* contendo os plasmídeos dos genes da HA-1, HA-2 e NP-1 do vírus da influenza aviária. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas, sob agitação (70 rpm). Em seguida, foi inoculado 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) em meio LB seletivo com 40 µL/mL de mix de açúcar (glicerol 0,6%, glicose 0,05% e lactose 0,2%) com nova incubação a 37°C por 24 horas, sob agitação, até densidade óptica a 600 nm (DO600) atingir 0,4-0,5 (Studier, 2014).

Na expressão a 18°C, o meio LB seletivo, contendo o inóculo, foi armazenado por 20 minutos no gelo seguido da adição de 40 µL/mL de mix de açúcar (glicerol 0,6%, glicose 0,05% e lactose 0,2%) e incubado a 18°C por 24 horas, sob agitação (120 rpm) até a densidade óptica a 600 nm (DO600) atingir 0,4-0,5 (Studier, 2014).

Um controle negativo (condição sem indução) foi preparado pela transferência de 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) para meio LB seletivo isento do mix de açúcares utilizado na autoindução — composto por glicerol a 0,6%, glicose a 0,05% e lactose a 0,2%. Essa cultura foi incubada nas mesmas condições aplicadas às colônias submetidas ao meio contendo açúcares para indução da expressão proteica.

3.3. Expressão das proteínas HA e NP a 37°C e 18°C sob indução de IPTG

Um pré-inóculo foi feito em 5 mL de meio LB seletivo (7,5 µL/mL de kanamicina) a partir da inoculação de colônias de *E. coli* contendo os plasmídeos dos genes da HA-1, HA-2 e

NP do vírus da influenza aviária. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas, sob agitação (70 rpm). Em seguida, foi inoculado 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) em meio LB seletivo, sendo incubado a 37°C sob agitação (70 rpm) de duas a três horas para induzir o crescimento bacteriano até a fase exponencial. Após o crescimento, adicionou-se 1 µL/mL de IPTG 0,02 mM sendo novamente incubado sob as mesmas condições (Loa et al., 2004).

Na expressão a 18°C, o meio LB seletivo, contendo o inóculo com bactérias na fase exponencial, foi mantido no gelo por 20 minutos, seguido da adição de 1 µL/mL de IPTG 0,02 mM de IPTG 0,02 mM e incubado a 18°C por 24 horas, sob agitação (120 rpm) até a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) atingir 0,4-0,5 (Loa et al., 2004).

Um controle negativo (condição sem indução) foi preparado pela transferência de 1/40 do volume do pré-inóculo (cultura *overnight*) para meio LB seletivo isento de IPTG. A cultura foi incubada nas mesmas condições aplicadas às colônias submetidas ao meio contendo o agente indutor da expressão proteica.

3.4. Análise da solubilidade

Para análise da solubilidade das proteínas expressas em diferentes condições, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto com descarte do sobrenadante, repetindo esse processo. Cada pellet bacteriano foi sonificado com 750 µL de tampão salino Tris-NaCl. Centrifugou-se novamente a 10.000 x g por 5 minutos e repetiu-se a sonicação, mantendo o tampão no tubo. Uma nova centrifugação foi feita e o sobrenadante foi armazenado (extrato solúvel). O pellet restante foi ressuspensão em 750 µL do mesmo tampão (extrato insolúvel). Os extratos solúvel e insolúvel, juntamente com o controle não-induzido, foram analisados por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida).

3.5. Purificação das proteínas HA-1, HA-2 e NP-1 recombinantes produzidas em *E. coli*

A expressão das proteínas HA-1, HA-2 e NP-1 contendo uma cauda de polihistidina foi induzida em 150 mL de meio LB a 18°C por 24 horas, sob agitação (120 rpm) com adição de mix de açúcar. A cultura foi centrifugada (4.000 x g a 4°C por 15 min) e o *pellet* ressuspensão com solução tampão base (50 mM HEPES, 0,3 M NaCl pH 7,0). A suspensão foi centrifugada (10.000 x g, 2 min) e o *pellet* obtido foi submetido à sonicação. Repetiu-se esse processo até que não houvesse redução visível no tamanho do pellet. O sobrenadante foi filtrado em uma seringa filtrante de 0,22 µm (MerckMillipore). A amostra filtrada foi incubada com uma resina

de Níquel-Nuvia IMAC (Nuvia™ IMAC Metal Affinity Resin) embalada em colunas PD-10 (GE Life Sciences) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, a fração de baixa afinidade foi descartada pela gravidade e a resina foi lavada com tampão de lavagem (50 mM HEPES + 300 mM NaCl) contendo diferentes concentrações de Imidazol (Sigma, St. Louis, MO) até que nenhum contaminante fosse detectado pela reação de Bradford. As proteínas recombinantes adsorvidas na matriz cromatográfica foram eluídas com tampão de eluição 250 mM de Imidazol (50 mM HEPES + 300 mM NaCl + 250 mM de Imidazol).

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a detecção das proteínas expressas e purificadas, alíquotas de 50 µL de cada cultura foram misturadas em microtubos de 1,5 mL com 20 µL de β-mercaptoetanol diluído 4x, seguida de incubação em banho seco a 96 °C por 5 minutos. Géis de poliacrilamida a 15% com 1 mm de espessura foram confeccionados e submetidos a um campo elétrico de 120V, 400mA e 10W por 1h e 30min. Após a corrida eletroforética, os géis foram inicialmente submetidos uma solução fixadora contendo corante Coomassie sob agitação por 30 minutos e, em seguida, transferidos para solução de coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250, permanecendo por 18 horas sob agitação. Finalizado esse período, o excesso de corante foi removido por lavagem com água deionizada e os géis foram digitalizados e analisados utilizando o software LabScan.

4. RESULTADOS

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida revelaram a expressão das três proteínas recombinantes tanto a 37°C quanto a 18°C por autoindução e adição de IPTG, cujas bandas expressas em cada proteína corresponderam aos seus respectivos pesos moleculares (**Figura 20 e 21**). Quanto à solubilidade, todas as hemaglutininas foram expressas em corpos de inclusão tanto por autoindução quanto por IPTG a 37°C, enquanto a nucleoproteína mostrou-se parcialmente solúvel na autoindução com adição de mix de açúcar (**Figura 22A e 22B**). Diferentemente, na solubilidade a 18°C, as hemaglutininas apresentam um padrão de solubilidade híbrido, sendo expressas tanto nas frações solúveis quanto nos *pellets* em ambas as condições de expressão (**Figura 23A**). A nucleoproteína, por sua vez, foi observada na fração solúvel e no *pellet* apenas na autoindução, mostrando-se insolúvel na indução da expressão por

adição de IPTG (**Figura 23B**).

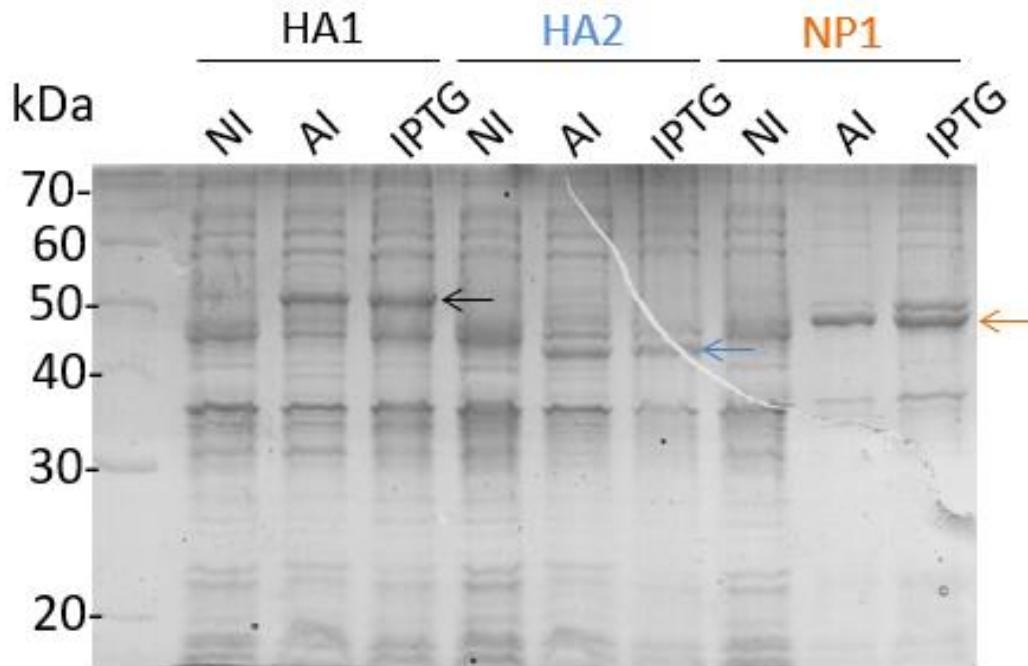
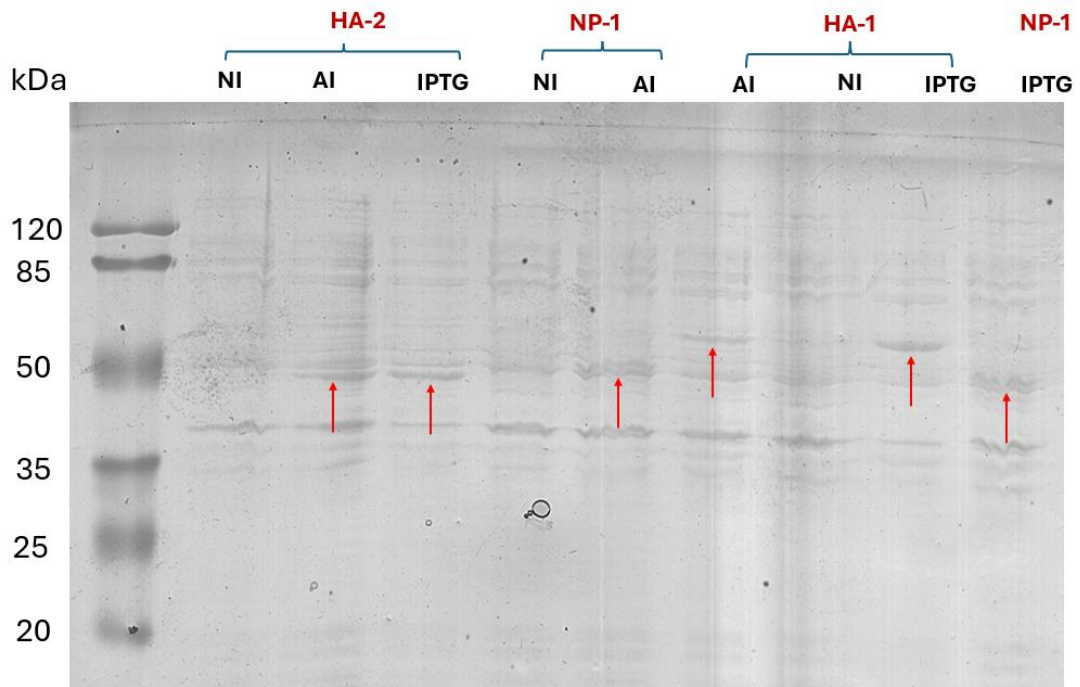


Figura 20. Expressão da HA-1, HA-2 e NP-1 recombinantes a 37°C pela adição de mix de açúcar (autoindução) e IPTG visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa (seta preta), enquanto a HA-2 possui um peso molecular de 43 kDa (seta azul) e NP-1 48 kDa (seta laranja). NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.



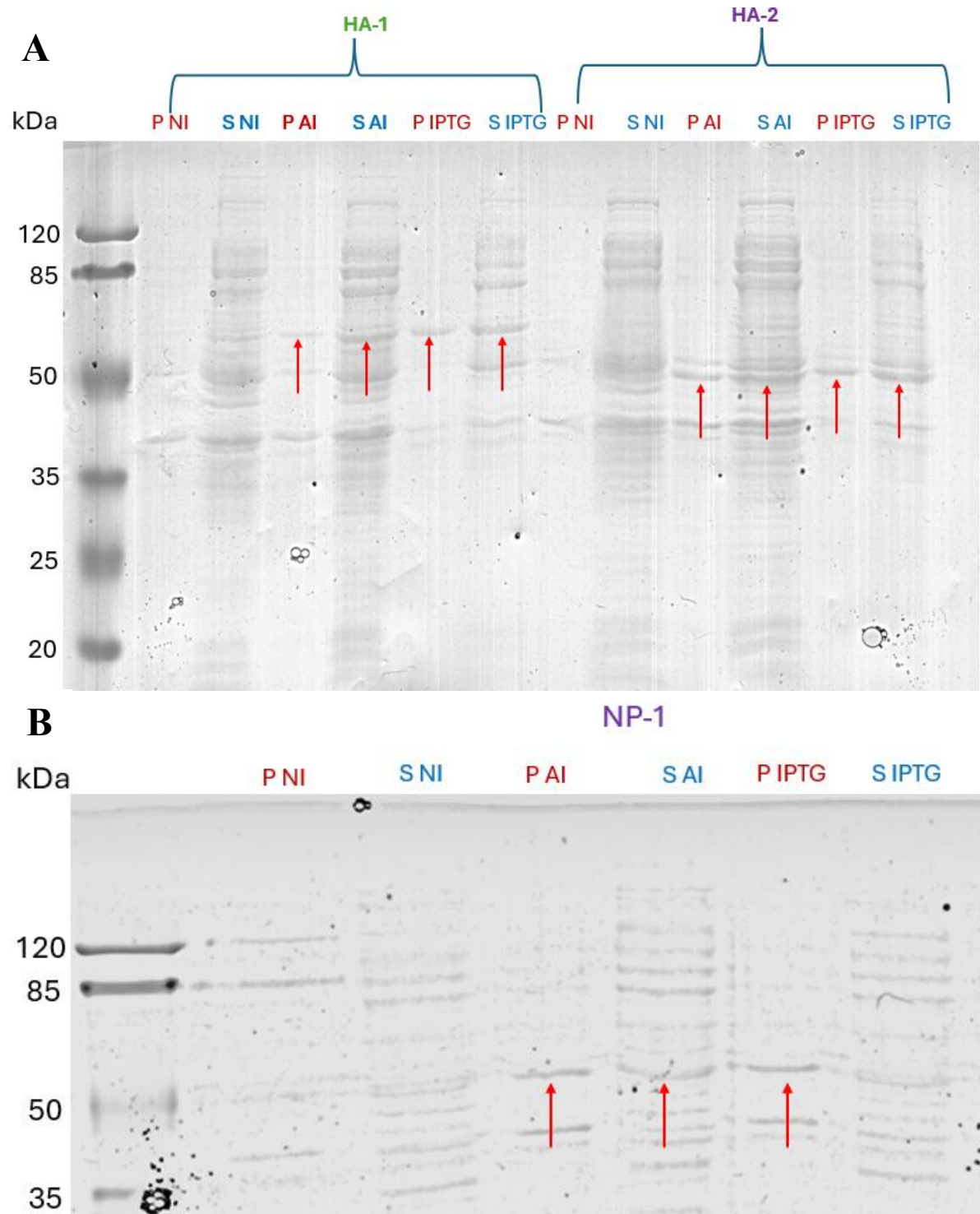


Figura 23. A. Solubilidade da HA-1 e HA-2 recombinantes a 18°C visualizadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A HA-1 possui um peso molecular de aproximadamente 58 kDa, enquanto a HA-2 possui um peso molecular de aproximadamente 43 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições de cada proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal. **B.** Solubilidade da NP-1 recombinante a 18°C visualizada em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. A NP-1 possui um peso molecular de aproximadamente 48 kDa. As setas indicam as bandas de expressão em diferentes condições da proteína. NI: Não indução. AI: Autoindução. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo. S. Sobrenadante. P. Pellet. O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

O gradiente de imidazol da hemaglutinina 1 mostrou que a proteína foi eficientemente expressa no sistema de autoindução a 18°C. No controle não induzido (NI), observaram-se apenas bandas basais, sem a detecção da banda correspondente da HA-1 (~50 – 55 kDa). Na autoindução (AI), observa-se uma banda característica correspondendo ao peso molecular da proteína, confirmando sua expressão de forma detectável. A fração *flow through* (FT) evidencia bandas de proteínas que não se ligaram a resina cromatográfica, apresentando também uma banda tênue na região esperada da HA-1, insinuando que uma porção da proteína não ficou adsorvida na matriz em detrimento da saturação parcial da resina, dobramento incompleto ou baixa acessibilidade da cauda de histidina (his). Nas frações de eluição com diferentes concentrações de imidazol, foi observado um leve desprendimento de proteínas inespecíficas na concentração de 20 mM, enquanto em 50 mM a banda da HA-1 torna-se mais intensa, indicando que grande parte da proteína começa a ser eluída nesta faixa. Nas concentrações seguintes, há uma diminuição nas bandas da hemaglutinina 1, já que grande parte foi eluída em concentrações anteriores (**Figura 24**).

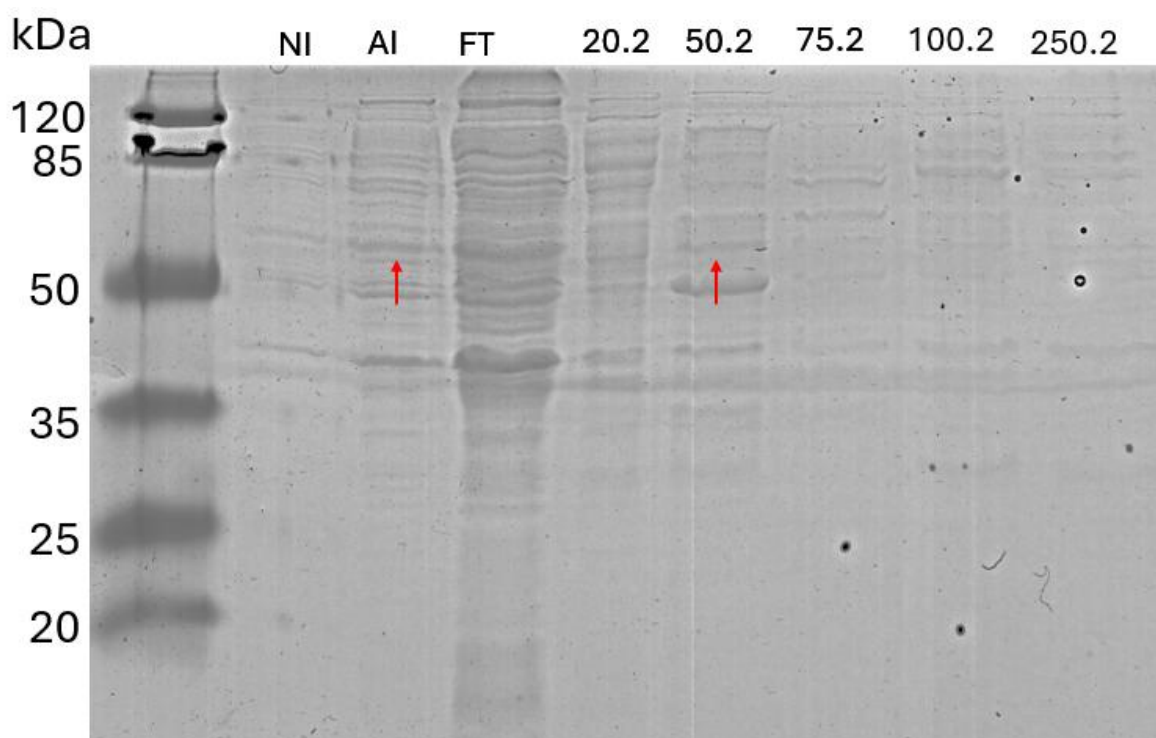


Figura 24. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da hemaglutinina 1 (HA-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 1 (~50 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

A hemaglutinina 2 foi expressa a 18°C e se apresentou majoritariamente como dímero, onde bandas intensas de aproximadamente 85 kDa foram observadas na autoindução, sugerindo a expressão da proteína em forma dimerizada. Grande quantidade de proteínas não ligadas a resina foram observadas no *flow through*, juntamente com uma banda fraca do dímero da proteína. Nas concentrações de 20 mM e 50 mM de imidazol, a hemaglutinina 2 encontra-se fortemente ligada à matriz com proteínas contaminantes sendo eluídas nessa faixa. A primeira fração cujo dímero de HA-2 apresentou-se de forma clara foi a 75 mM, iniciando a liberação da proteína de interesse de forma eficiente. A maior recuperação do dímero foi com 100mM de imidazol, onde a banda tornou-se intensa e com perfil mais limpo em comparação a 75 mM do agente competidor. Por fim, a proteína é totalmente eluída a 250 mM, predominando apenas resíduos de proteínas ligadas fortemente a matriz (**Figura 25**).

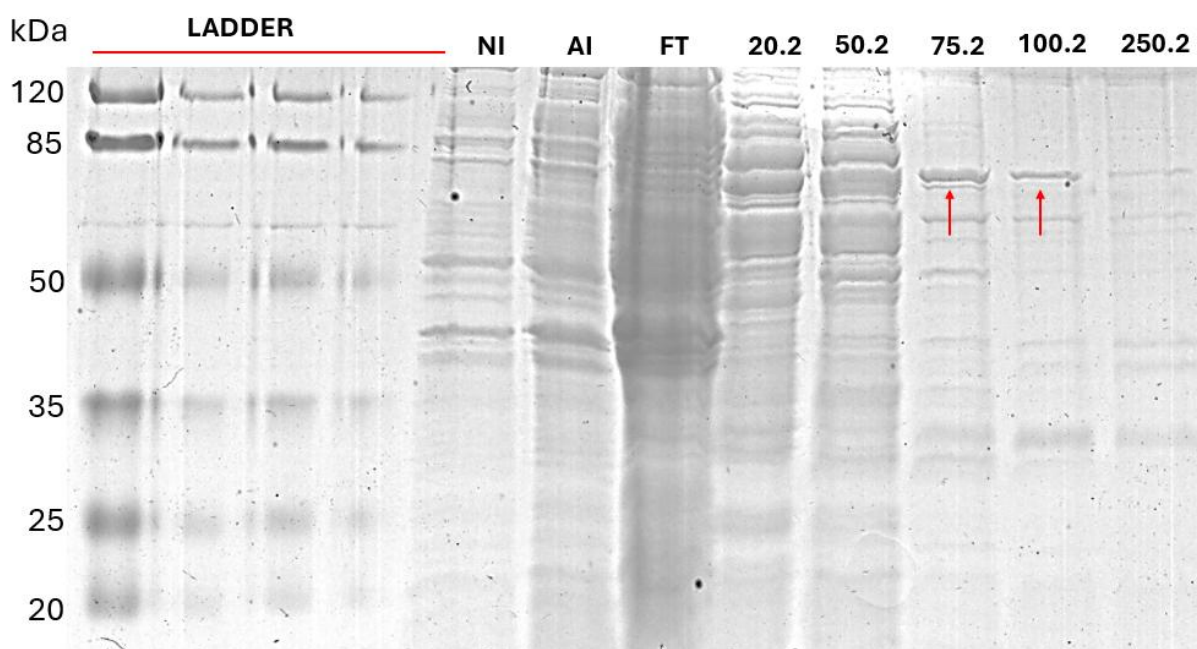


Figura 25. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da hemaglutinina 2 (HA-2) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (*flow-through*). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 2 dimerizada (~85 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

Para obtenção da proteína pura, uma nova purificação foi realizada em condições nativas, cuja matriz foi lavada diversas vezes com tampão de lavagem contendo 50 mM de imidazol até que nenhum contaminante fosse observado no Bradford. As duas primeiras frações de 50 mM possuíram proteínas que se ligaram de forma inespecífica à matriz, juntamente com uma banda tênue na região esperada da HA-2 dimerizada, indicando que uma parte da proteína

não ficou adsorvida na matriz. A hemaglutinina 2 purificada foi obtida na quarta fração de eluição com 250 mM de imidazol na forma clivada e dimerizada (**Figura 26**).

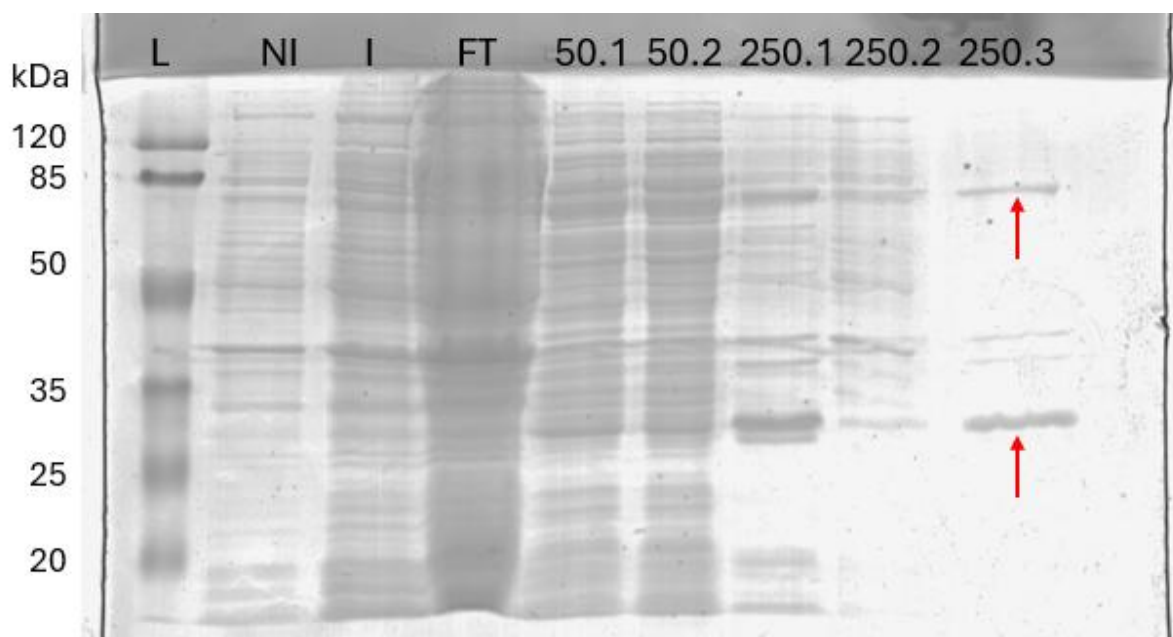


Figura 26. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação em condições nativas da HA-2 (HÁ-2) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de lavagem e eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando 50 mM de imidazol para lavagem e 250 mM de imidazol para eluição. A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da hemaglutinina 2 (~43 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

A nucleoproteína 1 foi expressa por autoindução a 18°C, apresentando uma banda bem definida em torno de 50 kDa, valor previsto para as nucleoproteínas virais. Tal banda não é visível no tratamento de não indução, corroborando que a expressão da proteína ocorreu, exclusivamente, após a adição do mix de açúcar. Uma grande quantidade de proteínas celulares não adsorvidas na matriz cromatográficas foram concentradas no *flow through*, que também não apresentou uma banda corresponde à NP-1, sugerindo que grande parte permaneceu adsorvida na resina. Não houve liberação eficiente da proteína alvo nas concentrações de 20 a 100 mM de imidazol, exibindo apenas bandas fracas, preponderantemente, de proteínas contaminantes que se ligaram de forma inespecífica com a resina, indicando que a NP-1 recombinante interagiu fortemente com a matriz de níquel. A eluição efetiva ocorreu a 250 mM de imidazol (**Figura 27**).

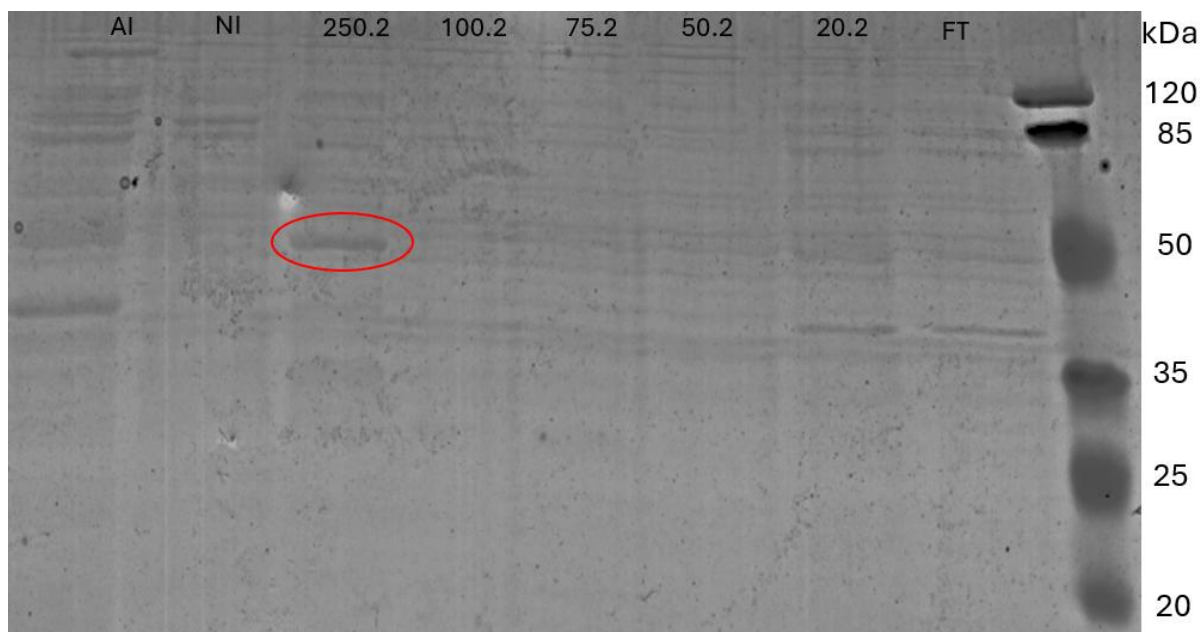


Figura 27. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação da nucleoproteína 1 (NP-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando gradiente crescente de imidazol: 20.2 (20 mM), 50.2 (50 mM), 75.2 (75 mM), 100.2 (100 mM) e 250.2 (250 mM). O círculo vermelho indica a banda compatível com o peso molecular esperado da nucleoproteína 1 (~48 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à direita. Fonte: Arquivo Pessoal.

Visando a obtenção da proteína pura, uma nova purificação foi realizada em condições nativas, onde a matriz foi lavada diversas vezes com tampão de lavagem contendo 75 mM de imidazol até que nenhum contaminante fosse observado no Bradford. As duas primeiras frações de 75 mM possuíam somente proteínas que se ligaram de forma inespecífica a matriz, cuja proteína alvo não foi eluída em tal concentração. A NP-1 purificada foi obtida na primeira fração de eluição com 250 mM de imidazol, embora com uma banda de baixa intensidade devido a menor expressão (**Figura 28**).

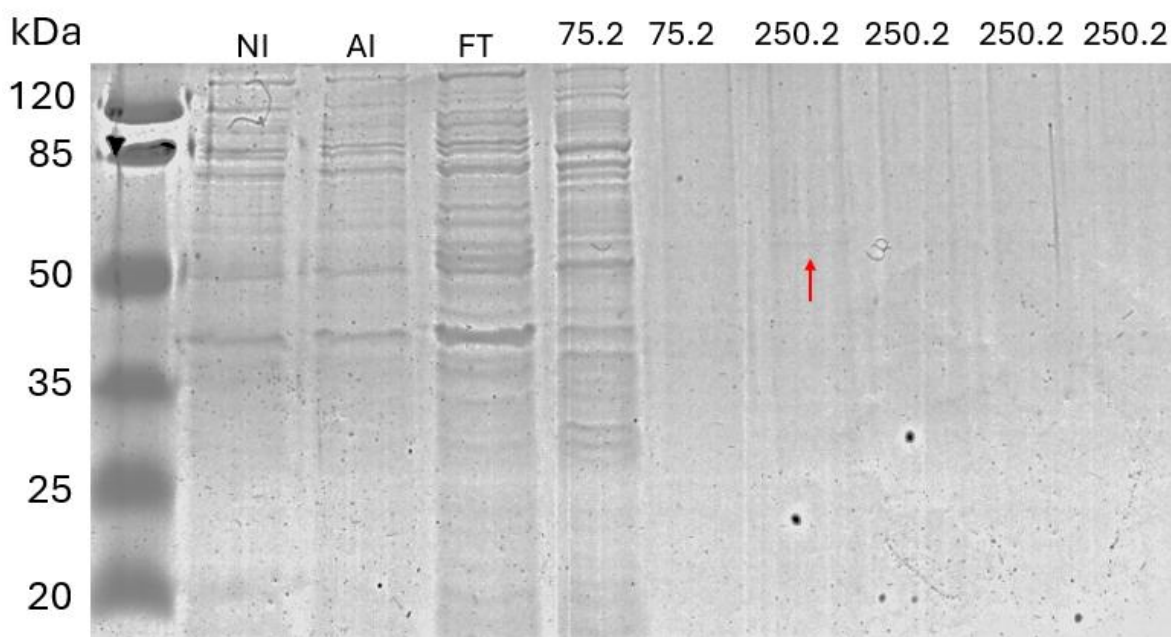


Figura 28. Análise por SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250 da expressão e purificação em condições nativas da nucleoproteína 1 (NP-1) de Influenza aviária expressa em *E. coli* BL21 a 18 °C. As amostras representam: NI – cultura sem indução; AI – cultura em condição de autoindução; FT – fração não ligada (flow-through). As demais canaletas correspondem às etapas de lavagem e eluição da cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando 75 mM de imidazol para lavagem e 250 mM de imidazol para eluição. A seta vermelha indica a banda compatível com o peso molecular esperado da nucleoproteína 1 (~48 kDa). O padrão de massa molecular (kDa) é mostrado à esquerda. Fonte: Arquivo Pessoal.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho contribui para a produção de proteínas recombinantes do vírus da influenza aviária para fins diagnósticos. Aqui realizamos a expressão de três proteínas utilizando o sistema de expressão por autoindução e adição de IPTG em *E. coli* BL21, bem como suas purificações pela técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC).

Nesse estudo, a utilização do sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de *E. coli* justifica-se em prol das suas vantagens como a garantia do crescimento bacteriano acelerado mesmo após a transformação, manipulação relativamente mais simples do que outros sistemas de clonagem e expressão, alto nível de expressão, baixo custo e versatilidade na expressão de uma ampla variedade de proteínas (Fakruddin et al., 2012; Brown, 2003; Tsumoto et al., 2003; Singh e Panda, 2005).

A baixa solubilidade e expressão das proteínas HA-1, HA-2 e NP-1 em corpos de inclusão a 37°C, tanto por autoindução quanto por adição de IPTG, são esperadas, uma vez que a expressão nessa faixa de temperatura favorece interações hidrofóbicas entre proteínas novas, levando à sua agregação e à formação de corpos de inclusão. Ademais, a expressão em

temperaturas superiores a 30°C dificulta o dobramento correto de proteínas heterólogas na bactéria e induz um estresse metabólico pela produção em massa de proteínas heterólogas, afetando a disponibilidade de chaperonas, tRNA e outros componentes vitais para o dobramento e tradução correta (Bueno, 2024). Considerando que a *E. coli* é um organismo procariótico, seu sistema de expressão não possui a maquinária celular necessária para realizar a glicosilação, fazendo com que proteínas complexas como a hemaglutinina sejam sintetizadas na forma não glicosilada, resultando em dobramento incompleto/incorreto e redução da solubilidade.

Estudos relatam que a incorporação de etiquetas de determinados peptídeos ligados à proteína alvo promovem maior estabilidade estrutural, facilitando a obtenção da proteína recombinante de interesse em sua forma solúvel, além de aumentar seu nível de expressão quando produzida em meio de cultura rico em nutrientes (Zuo et al., 2005). No entanto, este trabalho revelou que apenas a redução da temperatura de expressão de 37° para 18°C foi suficiente para obtenção das proteínas em sua forma solúvel.

No que diz respeito ao padrão de solubilidade das proteínas, a nucleoproteína apresentou maior solubilidade em comparação as hemaglutininas quando expressa em sistemas contendo células de *E. coli* BL21 a 37°C, uma vez que nessa faixa de temperatura a proteína mostrou-se parcialmente solúvel, diferentemente das hemaglutininas, cuja expressão ocorreu na forma de corpos de inclusão. As hemaglutininas são glicoproteínas de superfície com domínios que exigem dobramento correto e glicosilação para manter sua conformação nativa, condição essas que sistemas procarióticos sozinhos são incapazes de sustentar (Farahmand et al., 2012).

Sabendo que a hemaglutinina é a principal proteína de superfície do vírus da influenza aviária e o principal alvo do sistema imunológico do hospedeiro, diversos trabalhos relataram sua obtenção em forma recombinante em sistemas *de E. coli* BL21 com resultados semelhantes ao relatados nesse presente trabalho. Farsad e colaboradores (2016) expressaram a HA-1 a 37°C por indução com 1 mM de IPTG do subtipo viral de alta patogenicidade H5N1 de influenza aviária em *E. coli* BL21, obtendo a proteína em corpos de inclusão, recuperando-a por *refolding* e demonstrando imunogenicidade significativa em coelhos. Uma vacina baseada em HA1 do subtipo viral pandêmico H1N1 foi produzida em sistemas de expressão em *E. coli* a 30°C com 1 mM de IPTG, apresentando boa antigenicidade e imunogenicidade em modelo murino (Aguilar-Yáñez et al., 2010). Entretanto, para que as hemaglutininas obtidas neste estudo possam ser utilizadas para fins diagnósticos, estudos objetivando a quantificação da proteína e análise da antigenicidade devem ser conduzidos.

A dimerização da hemaglutinina 2 observada em seu gradiente de imidazol e na purificação, é compatível com o comportamento oligomérico descrito em domínios de HA, sendo um processo vital para internalização e fusão do vírus na célula hospedeira que, uma vez dentro do endossomo, sofre mudança conformacional expondo o peptídeo de fusão da HA2, levando a dimerização das suas subunidades (Nobusawa, 1997). Além disso, a ausência de agentes redutores de pontes de dissulfetos, como o β -mercaptoetanol, durante a purificação por IMAC pode ter contribuído para a formação de dímeros. A presença de proteases bacterianas nos sistemas de expressão em *E. coli* BL21 pode ter influenciado na obtenção da HA-2 clivada, observado durante sua purificação. Embora a proteína se apresente em fragmentos menores, sua antigenicidade pode ser preservada para utilização em testes sorológicos, como o ELISA.

A NP é uma proteína extremamente conservada sendo utilizada como antígeno para o diagnóstico da influenza aviária. Tal proteína já foi clonada e expressa com êxito em diversos sistemas, como em célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Upadhyay et al., 2009) e *Pichia pastoris* (Abubakar et al., 2012), células de insetos transfectadas por baculovírus (Zhou et al., 1998; Shafer et al., 1998), além do sistema de *E. coli* BL21, utilizado nesse estudo (Wu et al., 2007; Velumani et al., 2008). Resultado semelhante foi obtido por Borzi (2015), cuja clonagem e expressão da NP em *E. coli* BL21 com 0,5 e 1 mM de IPTG a 22°C, usando o vetor de expressão pET SUMO, levou a obtenção da proteína recombinante de forma solúvel como tamanho de 56 kDa, sendo 43 kDa referentes à NP e 12 kDa ao vetor de expressão SUMO-poli-histidina.

A expressão de proteínas recombinantes do vírus da influenza aviária por autoindução já foi aplicada em diferentes contextos, como a produção de antígenos para imunização de camundongos infectados com subtipos de alta patogenicidade de influenza aviária (Koday et al., 2016), desenvolvimento de vacinas para a cepa H9N2 (Zhang et al., 2025) e geração de inibidores contra H1NI (Van Dongen et al., 2019), entre outros propósitos. Tais estudos, em conjunto com os resultados obtidos neste trabalho corroboram a eficiência do sistema de autoindução para obtenção de proteínas recombinantes com alto rendimento e solubilidade como efeito da indução gradual que atenua o estresse metabólico. Embora o IPTG não seja degradado pela célula, fazendo com que sua concentração permaneça constante e promovendo uma indução reprodutível, a ativação abrupta da expressão favorece a formação de corpos de inclusão em detrimento do estresse metabólico. Essa condição, associada à elevada taxa de síntese proteica, aumenta a probabilidade de proteínas mal dobradas e agregação, o que explica o menor nível de solubilidade observado nas condições induzidas por IPTG neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu caracterizar experimentalmente a expressão, solubilidade e purificação das proteínas recombinantes HA-1, HA-2 e NP-1 do vírus da influenza aviária em sistemas heterólogos de *E. coli*. As análises demonstraram que ambas as metodologias de indução, autoindução e adição de IPTG, foram capazes de promover a expressão das três proteínas nas temperaturas de 37 °C e 18 °C, com bandas compatíveis com seus pesos moleculares previstos. Contudo, observou-se diferença substancial no perfil de solubilidade de cada proteína, especialmente entre hemaglutininas e nucleoproteína, evidenciando a influência crítica da temperatura e do método de indução no dobramento proteico.

A 37 °C, todas as proteínas foram majoritariamente direcionadas para corpos de inclusão, independentemente da estratégia de indução, como amplamente descrito na literatura. Em contraste, a expressão a 18 °C favoreceu a solubilidade parcial das hemaglutininas, com melhoria significativa na NP-1 em condição de autoindução. Esses achados reforçam a importância da redução de temperatura para aprimorar o dobramento e a recuperação de proteínas virais estruturalmente complexas.

As etapas de purificação por cromatografia de afinidade demonstraram que a cauda de polihistidina conferiu boa capacidade de adsorção à matriz de níquel, ainda que cada proteína apresentasse um comportamento particular frente ao gradiente de imidazol. A HA-1 apresentou eluição predominante entre 50 e 75 mM, enquanto a HA-2, observada em sua forma dimerizada, apresentou melhor recuperação entre 75 e 100 mM. Já a NP exibiu forte interação com a resina, sendo eficientemente eluída apenas em 250 mM de imidazol. Esses resultados confirmam tanto a efetividade do sistema de expressão quanto a viabilidade da purificação em condições nativas.

De modo geral, o trabalho atingiu seu objetivo principal ao demonstrar a produção bem-sucedida de antígenos recombinantes do vírus da influenza aviária, oferecendo subsídios para etapas posteriores de padronização de testes diagnósticos.

7. REFERENCIAS

ABUBAKAR, I.; GATRETT, P.; BRUNETTE, G.; BLUMBERG, L.; JOHNSON, D.; POUMEROL, G.; et al. Global perspectives for prevention of infectious diseases associated with mass gatherings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 66–74, jan. 2012. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70246-8.

AGUILAR-YÁÑEZ, J. M.; PORTILLO-LARA, R.; MENDOZA-OCHOA, G. I.; GARCÍA-ECHAURI, S. A.; LÓPEZ-PACHECO, F.; BULNES-ABUNDIS, D.; SALGADO-

GALLEGOS, J.; LARA-MAYORGA, I. M.; WEBB-VARGAS, Y.; LEÓN-ÁNGEL, F. O.; RIVERO-ARANDA, R. E.; OROPEZA-ALMAZÁN, Y.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; ZERTUCHE-GUERRA, M. I.; DUBOIS, R. M.; WHITE, S. W.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RUSSELL, C. J.; ÁLVAREZ, M. M. An influenza A/H1N1/2009 hemagglutinin vaccine produced in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, e11694, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0011694.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informes Técnicos. 2007. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/legislacao/comunicados-1/2007>. Acesso em: 15 nov. 2007.

ARTOIS, J.; JIANG, H.; WANG, X.; QIN, Y.; PEARCY, M.; LAI, S.; LIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, J.; YANG, X.; LIU, Q.; WANG, Q.; CHEN, R.; WU, J.; HE, J.; HUANG, F.; TIAN, L.; LI, X.; YANG, X.; PENG, Y. Changing geographic patterns and risk factors for avian influenza A(H7N9) infections in humans, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 87–94, 2018. DOI: 10.3201/eid2401.171393.

BAHL, J.; PHAM, T. T.; HILL, N. J.; HUSSEIN, I. T. M.; MA, E. J.; EASTERDAY, B. C.; HALPIN, R. A.; STOCKWELL, T. B.; WENTWORTH, D. E.; KAYALI, G.; KRAUSS, S.; SCHULTZ-CHERRY, S.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J.; SWARTZ, M. D.; SMITH, G. J. D.; RUNSTADLER, J. A. Ecosystem interactions underlie the spread of avian influenza A viruses with pandemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 5, e1005620, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005620.

BANO, S.; NAEEM, K.; MALIK, S. A. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3 (Suppl), p. 817–822, 2003. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.817.

BERCHIERI JR., A. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009.

BORZI, M. M. **Produção da nucleoproteína recombinante do vírus da influenza aviária para aplicação no imunodiagnóstico**. 2015. xiv, 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CARON, L.; BASTOS, A. P.; ESTEVES, P. A. Vírus da influenza aviária de alta patogenicidade na América do Sul. **Avicultura Industrial**, ano 114, n. 1, ed. 1324, 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **1918 Pandemic (H1N1 virus). 2023**. Disponível em: <https://archive.cdc.gov>. Acesso em: 8 out. 2023.

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 6127–6145, 1988. DOI: 10.1093/nar/16.13.6127.

BUENO, M. P. S. **Expressão e análise de atividade enzimática da deubiquitinase usp2A recombinante**. 2024. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências-Bioquímica)– Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2024.

DOU, D.; REVOL, R.; ÖSTBYE, H.; WANG, H.; DANIELS, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1581, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01581.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDAR, R. M.; BIN MANNAN, K. S.; CHOWDHURY, A.; HOSSAIN, M. N. Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *Escherichia coli*. **ISRN Biotechnology**, 2013:590587, 2012. DOI: 10.5402/2013/590587.

FARAMAND, B.; KHODABANDEH, M.; MAHBOUDI, F.; FOTOUHI, F.; SALEH, M.; BARKHORDARI, F.; TABATABAIAN, M.; NASAB, F. P.; KHEIRI, M. T. Hemagglutinina do vírus da influenza: um modelo para N-glicosilação de proteínas em *Escherichia coli* recombinante. **Intervirolgy**, v. 55, n. 3, p. 219–224, 2012. DOI: 10.1159/000327784.

FARSAD, N.; YILMAZ, H. B.; ECKFORD, A.; CHAE, C.-B.; GUO, W. A comprehensive survey of recent advancements in molecular communication. **IEEE Communications Surveys & Tutorials**, v. 18, n. 3, p. 1887–1919, 2016. DOI: 10.1109/COMST.2016.2527741.

FU, X.; WANG, Q.; MA, B.; ZHANG, B.; SUN, K.; YU, X.; YE, Z.; ZHANG, M. Z. Advances in detection techniques for the H5N1 avian influenza virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17157, 2023. DOI: 10.3390/ijms242417157.

GOVINDARAJ, G.; SRIDEVI, R.; NANDAKUMAR, S. N.; VINEET, R.; RAJEEV, P.; BINU, M. K.; BALAMURUGAN, V.; RAHMAN, H. Economic impacts of avian influenza outbreaks in Kerala, India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. e361–e372, 2018. DOI:10.1111/tbed.12766

GRANATO, C. F. H.; BELLEI, N. C. J. As novas facetas e a ameaça da gripe aviária no mundo globalizado. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 249–256, 2007. DOI: 10.1590/S1676-24442007000400005.

GULTYAEV, A. P.; SPRONKEN, M. I.; FUNK, M.; FOUCHIER, R. A. M.; RICHARD, M. Insertions of codons encoding basic amino acids in H7 hemagglutinins of influenza A viruses occur by recombination with RNA at hotspots near snoRNA binding sites. **RNA**, v. 27, n. 2, p. 123–132, 2021. DOI: 10.1261/rna.077495.120.

JIMENEZ-BLUHM, P.; SIEGERS, J. Y.; TAN, S.; SHARP, B.; FREIDEN, P.; JOHOW, M.; OROZCO, K.; RUIZ, S.; BAUMBERGER, C.; GALDAMES, P.; GONZÁLEZ, M. A.; ROJAS, C.; KARLSSON, E. A.; HAMILTON-WEST, C.; SCHULTZ-CHERRY, S. Detection and phylogenetic analysis of highly pathogenic A/H5N1 avian influenza clade 2.3.4.4b virus in Chile, 2022. **Emerging Microbes & Infections**, v. 12, p. 2220569, 2023. DOI: 10.1080/22221751.2023.2220569.

KANAUJIA, R.; BORA, I.; RATHO, R. K.; THAKUR, V.; MOHI, G. K.; THAKUR, P. Avian influenza revisited: concerns and constraints. **Virusdisease**, v. 33, n. 4, p. 456–465, 2022. DOI: 10.1007/s13337-022-00800-z.

KHATCHIKIAN, D.; ORLICH, M.; ROTT, R. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. **Nature**, v. 340, p. 156–157, 1989. DOI: 10.1038/340156a0.

KIM, S.; KIM, Y.; NORIEL, P.; CHOI, Y. Avian Influenza A viruses: evolution and zoonotic infection. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 7, n. 1, p. 501–511, 2016. DOI: 10.1055/s-0036-1584953.

KODAY, M. T.; NELSON, J.; CHEVALIER, A.; KODAY, M.; KALINOSKI, H.; STEWART, L.; CARTER, L.; NIEUSMA, T.; LEE, P. S.; WARD, A. B.; WILSON, I. A.; DAGLEY, A.; SMEE, D. F.; BAKER, D.; FULLER, D. H. A Computationally Designed Hemagglutinin Stem-Binding Protein Provides In Vivo Protection from Influenza Independent of a Host Immune Response. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 2, e1005409, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005409.

KRAMMER, F.; SMITH, G. J. D.; FOUCHIER, R. A. M.; PEIRIS, M.; KEDZIERSKA, K.; DOHERTY, P. C.; PALESE, P.; SHAW, M. L.; TREANOR, J.; WEBSTER, R. G.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 3–21, 2018. DOI: 10.1038/s41572-018-0002-y.

LAMB, R. A.; KRUG, R. M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1487–1532, 2001.

LAMB, R. A. Influenza. In: MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. (eds.). **Encyclopedia of Virology**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 95–104. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00654-3.

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*. **Journal of Virological Methods**, v. 116, n. 2, p. 161–167, 2004. DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.11.006.

LYCETT, S. J.; BODEWES, R.; POHLMANN, A.; BANKS, J.; BÁNYAI, K.; BONI, M. F.; BOWSTRA, R.; BREED, A. C.; BROWN, I. H.; CHEN, H.; DÁN, Á.; DeLIBERTO, T. J.; DIEP, N.; GILBERT, M.; HILL, S.; IP, H. S.; KE, C. W.; KIDA, H.; KILLIAN, M. L.; KOOPMANS, M. P.; KWON, J.-H.; LEE, D.-H.; LEE, Y. J.; LU, L.; MONNÉ, I.; PASICK, J.; PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A.; ROBINSON, T. P.; SAKODA, Y.; ZOHARI, S.; SONG, C.-S.; SWAYNE, D. E.; TORCHETTI, M. K.; TSAI, H.-J.; FOUCHIER, R. A. M.; BEER, M.; WOOLHOUSE, M.; KUIKEN, T. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. **Science**, v. 354, n. 6309, p. 213–217, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf8852.

MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola: Plano de Contingência para Influenza Aviária**. Brasília, 2013. Disponível em: <https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Sa%C3%BAde-Animal/plano-de-contingencia-para-influenza-aviaria-e-doenca-de-newcastle>. Acesso em: 19 de novembro de 2025.

MAPA. **Ficha Técnica Influenza Aviária (IA)**. 2023. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 19 de novembro de 2025.

MARTINS, N. R. S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, p. 97–140, 2001. DOI: 10.1590/S1516-635X2001000200001.

MERCKX, J.; WALI, R.; SCHILLER, I.; CAYA, C.; GORE, G. C.; CHARTRAND, C.; et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 6, p. 394–409, 2017. DOI: 10.7326/M17-0848.

MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; CARON, L. F. **Doenças das Aves: Influenza aviária**. 2. ed. Campinas: Facta-fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009.

MORENS, D. M.; PARK, J.; TAUBENBERGER, J. K. Many potential pathways to future pandemic influenza. **Science Translational Medicine**, v. 15, eadj2379, 2023. DOI:10.1126/scitranslmed.adj2379

NILI, H.; ASASI, K. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. **Avian Diseases**, v. 47 (Suppl 3), p. 828–831, 2003. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.828.

NOBUSAWA, E. Structure and function of the hemagglutinin. **Nihon Rinsho**, v. 55, n. 10, p. 2562–2569, 1997.

ORLICH, M.; GOTTWALD, H.; ROTT, R. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 462–465, 1994. DOI: 10.1006/viro.1994.1555.

PHILIPPON, D. A. M.; WU, P.; COWLING, B. J.; LAU, E. H. Y. Avian influenza human infections at the human–animal interface. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, p. 528–537, 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiaa105.

PLAZA, P. I.; GAMARRA-TOLEDO, V.; RODRÍGUEZ EUGUÍ, J.; LAMBERTUCCI, S. A. Recent changes in patterns of mammal infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus worldwide. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 444–452, 2024. DOI: 10.3201/eid3003.231098.

ROTT, R. The pathogenic determinant of influenza virus. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 303–310, 1992. DOI: 10.1016/0378-1135(92)90058-2.

SCHÄFER, M.; SUTER, C.; KLAIBER, Ch.; WEHRLI, H.; FREI, E.; KRÄHENBÜHL, L. Spilled gallstones after laparoscopic cholecystectomy. A relevant problem? A retrospective analysis of 10,174 laparoscopic cholecystectomies. **Surgical Endoscopy**, v. 12, p. 305–309, 1998. DOI: 10.1007/s004649900659.

SEEKINGS, A. H.; SLOMKA, M. J.; RUSSELL, C.; HOWARD, W. A.; CHOUDHURY, B.; NUÑEZ, A.; LÖNDT, B. Z.; COX, W.; CEERAZ, V.; THORÉN, P.; IRVINE, R. M.; MANVELL, R. J.; BANKS, J.; BROWN, I. H. Direct evidence of H7N7 avian influenza virus mutation from low to high virulence on a single poultry premises during an outbreak in free-range chickens in the UK, 2008. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 64, p. 13–31, 2018. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.005.

SHI, J.; DENG, G.; KONG, H.; GU, C.; MA, S.; YIN, X.; ZENG, X.; CUI, P.; CHEN, Y.; YANG, H.; WAN, X.; WANG, X.; LIU, L.; CHEN, P.; JIANG, Y.; LIU, J.; GUAN, Y.; SUZUKI, Y.; LI, M.; QU, Z.; GUAN, L.; ZANG, J.; GU, W.; HAN, S.; SONG, Y.; HU, Y.; WANG, Z.; GU, L.; YANG, W.; LIANG, L.; BAO, H.; TIAN, G.; LI, Y.; QIAO, C.; LI, L.; BU, Z.; CHEN, H. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans. **Cell Research**, Londres, v. 27, p. 1409–1421, 2017. DOI: 10.1038/cr.2017.129.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005. DOI: [10.1263/jbb.99.303](https://doi.org/10.1263/jbb.99.303).

SMITH, G. J. D.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBAY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. T.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHATT, S.; PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, p. 1122–1125, 2009. DOI: 10.1038/nature08182.

SPACKMAN, E. **Animal influenza virus: Methods and Protocols**. 3. ed. Springer, 2020.

STUDIER, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1091, p. 17–32, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_2.

SUGUITAN JR., A. L.; MATSUOKA, Y.; LAU, Y. F.; SANTOS, C. P.; VOGEL, L.; CHENG, L. I.; ORANDLE, M.; SUBBARAO, K. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2706–2714, 2012. DOI: 10.1128/JVI.05546-11.

SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L. Highly pathogenic avian influenza. **Rev Sci Tech**, v. 19, n. 2, p. 463–482, 2000. DOI: 10.20506/rst.19.2.1230.

SZABLEWSKI, C. M.; IWAMOTO, C.; OLSEN, S. J.; GREENE, C. M.; DUCA, L. M.; DAVIS, C. T.; COGGESHALL, K. C.; DAVIS, W. W.; EMUKULE, G. O.; GOULD, P. L.; FRY, A. M.; WENTEORTH, D. E.; DUGAN, V. G.; KILE, J. C.; AZZIZ-BAUMGARTNER. Reported global avian influenza detections among humans and Animals During 2013-2022: Comprehensive Review and Analysis of Available Surveillance Data. **JMIR Public Health Surveillance**, v. 9, e46383, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2196/46383>

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A.; CHEN, L. M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A.; TURMELLE, A. S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M. R.; TANG, K.; ROWE, L. A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K. A.; COX, N. J.; ANDERSON, L. J.; RUPPRECHT, C. E.; DONIS, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1116200109.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; EJIMA, D.; ARAKAWA, T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1383-1386, 2003. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.055.

UPADHYAY, A.; JABER, B. L.; MADIAS, N. E. Epidemiology of hyponatremia. **Seminars in Nephrology**, v. 29, n. 3, p. 227–238, 2009. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2009.03.004.

VAN DONGEN, M. J. P.; LIN, S.; DE BRUIJN, A.; VON LAER, D.; WILSON, I. A.; et al. A small-molecule fusion inhibitor of influenza virus is orally active in mice. **Science**, v. 363, n. 6431, eaar6221, 2019. DOI: 10.1126/science.aar6221.

VELUMANI, S.; DU, Q.; FENNER, B. J.; PRABAKARAN, M.; WEE, L. C.; NUO, L. Y.; KWANG, J. Development of an antigen-capture ELISA for detection of H7 subtype avian influenza from experimentally infected chickens. **Journal of Virological Methods, Amsterdam**, v. 147, n. 2, p. 219-225, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.004>

WEBSTER, R. G.; WRIGHT, S. M.; CASTRUCCI, M. R.; BEAN, W. J.; KAWAOKA, Y. Influenza—a model of an emerging virus disease. **Intervirology**, v. 35, p. 16–25, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1159/000150292>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Gripe Aviária**. 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/>. Acesso em: 15 nov. 2025.

WU, R.; HU, S.; XIAO, Y.; LI, Z.; SHI, D.; BI, D. Development of indirect enzyme linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against Avian Influenza Virus. *Veterinary Research Communications*, Dordrecht, v. 31, n. 5, p. 631-641, 2007. DOI: 10.1007/s11259-007-3510-x.

YEWDELL, J. W. Deriva antigênica: entendendo a COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2681–2687, 2021. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.11.016.

ZHANG, N.; QUAN, K.; LIN, M.; LU, Z.; LI, Z.; YANG, Y.; XU, N.; YANG, H.; ZHU, J.; ZHANG, G. F.; QIN, T.; CHEN, S.; PENG, D.; LIU, X. Withdrawn: Comprehensive evaluation of HA epitope modifications in H9N2 subtype avian influenza vaccines for broad cross-protection. **Journal of Infection and Public Health**, 2025. DOI: 10.1016/j.jia.2025.09.009.

ZHOU, L.; TAN, Y.; KANG, M.; LIU, F.; REN, R.; WANG, Y.; CHEN, T.; YANG, Y.; LI, C.; WU, J.; ZHANG, H.; LI, D.; GREENE, C. M.; ZHOU, S.; IULIANO, A. D.; HAVERS, F.; NI, D.; WANG, D.; FENG, Z.; UYEKI, T. M.; LI, Q. Preliminary Epidemiology of Human Infections with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1355-1359, 2017. DOI: 10.3201/eid2308.170640.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1395, p. 509–515, 1998. DOI: 10.1098/rspb.1998.0324.

ZUO, Y.; LIN, A.; CHANG, P.; GAN, W.-B. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. **Neuron**, v. 46, n. 2, p. 181-189, 2005. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.001.