

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

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA S1 RECOMBINANTE DO VÍRUS
DA BRONQUITE INFECCIOSA EM *Saccharomyces cerevisiae*
PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO**

Andressa Peres de Oliveira

Bióloga

Jaboticabal - SP - Brasil

Agosto – 2008

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

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA S1 RECOMBINANTE DO VÍRUS
DA BRONQUITE INFECCIOSA EM *Saccharomyces cerevisiae*
PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO**

Andressa Peres de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia – Área de Concentração em Microbiologia.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Agosto – 2008

O48e Oliveira, Andressa Peres de
Expressão da Proteína S1 Recombinante do Vírus da Bronquite
Infecciosa em *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação no
imunodiagnóstico / Andressa Peres de Oliveira. – Jaboticabal, 2008
xiii, 54p.; il.; 28 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Ana Maria Iba Kanashiro, Jose Moacir
Marin.
Bibliografia

1. Clonagem e Expressão. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. VBI. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8.:616.988.73

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA**ANDRESSA PERES DE OLIVEIRA-**

nascida em 24 de janeiro de 1982, em São Paulo, SP, graduou-se em Bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, em 30 de novembro de 2005.

Dedico

Aos meus pais **Maria Aparecida** “in memoriam”
e **Osny** pela contribuição para a
minha realização pessoal e profissional

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e as bênçãos que recebo;

A Jesus, pelas provas que nos aperfeiçoam o raciocínio e nos abrandam o coração, pelas infinitas possibilidades de crescimento manifestadas em cada instante em minha vida;

Ao Prof Dr Hélio J. Montassier, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida e pela orientação. Dessa forma tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões nos meus relatórios, artigo, entre outros;

À Profª Drª Ana Iba Kanashiro, membro da banca examinadora, pela sua atenção, sugestões e contribuições de grande valor;

Ao Prof Dr Jose M. Marin, membro da banca examinadora, pela sua atenção, sugestões e contribuições de grande valor;

Ao Prof Dr Manoel Victor Lemos, membro da banca qualificadora, pela sua atenção e contribuições valiosas;

À Drª Maria de Fátima Montassier, pela amizade, pela atenção, pelo carinho, pelos conhecimentos, que foram de extrema importância para o andamento deste trabalho e o enriquecimento da minha profissional;

À Aliandra M. Gibertoni Malaman e Aline G. Caetano, pela amizade e pelos conhecimentos que contribuíram na elaboração deste trabalho;

À Lurdes Feres “Lurdinha”, uma excelente técnica, que sempre nos auxilia nos experimentos. E também por sua amizade;

Aos colegas de laboratório **Cibele, Camila, Cintia, Daniel, Juliana, Mariana, Igor, Vanessa, Philipp**, pela amizade e ajuda;

À Edna, uma secretária excelente, sempre prestativa e pronta para nos ajudar em tudo que precisamos;

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Veterinária;

Ao colegas mais recentes presentes no laboratório;

Aos meus grandes amigos **Vivian Boter Bergamasco e Rafael Marini Ferreira**, amigos de profissão e de vida, pela amizade, ajuda em todos momentos e incentivo;

À Merial Saúde Animal pela doação dos ovos embrionados SPF;

À FAPESP pelo apoio financeiro a este trabalho através do Projeto Temático (proc. 01/14650-3 E proc. 02/06083-0);

A CAPES pela bolsa auxílio concedida;

Ao CNPq pelo apoio financeiro deste projeto (proc. 477140/2003-3);

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, através do corpo docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Microbiologia, pelas disciplinas ministradas.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Glicoproteína S.....	6
2.2 Diagnóstico da infecção pelo VBI e a Aplicação de Técnicas Imunológicas	8
2.3 Controle da infecção pelo VBI	10
2.4 Clonagem e Expressão das proteínas recombinantes	10
III. OBJETIVOS	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Propagação Viral.....	15
4.2. Titulação da infectividade viral	15
4.3. Oligonucleotídeos Iniciadores	15
4.4. Extração do RNA viral	16
4.5. Obtenção do gene da proteína S1 do VBI.....	16
4.6. Expressão da proteína recombinante S1 na cepa INVSc1 de <i>S. cerevisiae</i>	18
4.7. Extração da proteína recombinante S1 das células lisadas de levedura	19
4.8. Purificação da proteína recombinante S1 por coluna de cromatografia de afinidade com níquel – agarose	20
4.9. Análise bioquímica e imunológica da proteína recombinante S1 do VBI expressa em leveduras pela técnica Eletroforese de gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS) e Western blotting.....	20
4.10. Soros de Galinha Positivos e Negativos para o VBI.....	21
4.11. Soro de galinhas infectadas ou vacinadas com o VBI.....	22
4.11.1. Soros de Aves Infectadas Experimentalmente.....	22
4.11.2 Soros de Aves Vacinadas e Infectadas Experimentalmente	22
4.12. Amostras séricas de campo	22
4.13. Teste de Y-S1-ELISA	22
4.14. Método indireto Comercial de ELISA.....	23
4.15. Análise Estatística	24
V. RESULTADOS.....	25
5.1. Propagação e Titulação da infectividade viral	25
5.2. Extração de RNA e amplificação.....	25
5.3. PCR com Gradiente de Temperatura para otimizar a temperatura de anelamento os oligonucleotídeos iniciadores	26
5.4. Reação de purificação e quantificação do cDNA	27
5.5. Ligação do gene com o vetor pYES 2.1/V5-His-TOPO ® (Invitrogen), e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	28

5.6. Identificação dos clones bacterianos portadores do gene do gene S1 e de sua inserção no vetor pYES2.1. – TOPO –TA	29
5.7. Transformação das células competentes de levedura	31
5.8. Identificação dos clones de leveduras portadoras do gene do gene S1 e de sua inserção no vetor pYES2.1. – TOPO –TA	32
5.9. Seqüenciamento do DNA do inserto gênico nos clones bacterianos transformantes	33
5.10. Indução e extração do RNA mensageiro	35
5.11. Extração e quantificação do extrato protéico total das células de leveduras transformadas pelo vetor pYes2.1. TOPO – TA com o inserto do gene S1	36
5.12. Western Blotting	36
5.12.1. Indução da expressão e purificação da proteína recombinante S1	36
5.13. Teste de ELISA - (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	40
5.13.1. Desenvolvimento do ELISA com a proteína S1 do VBI expressa em leveduras (Y-S1-ELISA).....	40
5.13.2. Aplicação do teste Y-S1-ELISA para a detecção de anticorpos específicos em aves vacinadas ou não e experimentalmente infectadas	41
5.13.3. Relações entre os resultados do Y-S1-ELISA e do kit comercial de ELISA usados na detecção de anticorpos contra o VBI	43
VI. DISCUSSÃO	46
VII. CONCLUSÕES	51
VIII. BIBLIOGRAFIA	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Comparação entre os resultados do kit comercial de ELISA e do Y-S1-ELISA para a detecção de anticorpos contra o VBI presentes no soro de galinhas.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa. São destacadas as proteínas estruturais: S, glicoproteína de superfície; N. Proteína fosforilada de nucleocapsídeo, e a M, glicoproteína de membrana.....</p>	5
<p>Figura 2. Esquema representativo do genoma completo do vírus da bronquite infecciosa.....</p>	5
<p>Figura 3. Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> http://www.diwinetaste.com/dwt/it2007016.php.....</p>	12
<p>Figura 4- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE). Na canaleta 1 Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Na canaleta 2, o produto da RT-PCR, com o tamanho da banda esperada, com aproximadamente 1580 pares de base.....</p>	25
<p>Figura 5- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para o gradiente de temperatura do pareamento dos primers. Na canaleta 1, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 11, os produtos de RT-PCR 5 µl provenientes das seguintes temperaturas 48,2°C; 48,8 °C; 49,5°C; 50,6°C; 51,9°C; 53,4°C; 54,7°C; 55,7 °C; 56,3°C; e 56,8°C, respectivamente. Melhores temperaturas correspondem as canaletas 5 e 6.....</p>	26
<p>Figura 6- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para quantificar cDNA purificado. Na canaleta 1, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), Canaleta 2 produto de RT-PCR e na canaleta 4, 3 µl Low Mass</p>	

Ladder.....27

Figura 7- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para confirmar presença do inserto e do vetor após a extração. Na canaleta 1: 7 µl de marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), canaleta 2, 3 e 4 a extração do DNA plasmidial da *E.coli*. Respectivamente clones A6, D3, F10.

Canaleta 5, 3 µl Low Mass Ladder.....27

Figura 8- Combinação de Primers visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1 , 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 13 os clones submetidos a combinação dos primers. De 2 a 5 clone A6; de 6 a 9 clone D3; e de 10 a 13 clone

F10.....29

Figura 9 - Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1 , 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), canaleta 2 DNA plasmidial digerido.29

Figura 10 – Combinação de primers visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE).. Na canaleta 1e 18, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas 2, 3, 4 e 5 o clone A1; canaletas 6, 7, 8, e 9 C3; canaletas 10, 11, 12 e 13 clone G12; e nas canaletas 14, 15, 16 e 17 clone H12.31

Figura 11. Visualização dos “scores” dos nucleotídeos seqüenciados do clone de *E.coli* obtidos através do BLAST no site

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.....32

Figura 12. Em A e B, nucleotídeos seqüenciados do clone de *E.coli* mostrando homologia com a seqüência obtida no “BLAST”.32

Figura 13 - Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE). Canaleta 1 contém 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

E as canaletas 2 e 3 contém o RNAm dos clones G12 e H12 respectivamente33

Figura 14. Caracterização por Western Blotting da Proteína S1 recombinante expressa em *S. cerevisiae*. Canaleta 1= BenchMark Invitrogen; Canaleta 2 = Proteína recombinante do clone G12 de *S. cerevisiae*; Canaleta 3= Proteína recombinante do clone G12 de *S. cerevisiae*. O monoclonal Anti-His6 MAb foi usado como detector e conjugado de anti-camundogo IgG - HRP foi usado

como enzima para quebrar o substrato DAB-H₂O₂.34

Figura 15. Visualização da membrana de Western Blotting, após revelação. Canaleta 1, contém 20 µL Marcador de tamanho molecular (Rainbow Molecular Weight Markers GE Healthcare); canaleta 2, levedura sem inserto; canaleta 3, extrato protéico bruto; canaleta 4, extrato protéico purificado.

Anticorpos utilizados são provenientes de um pool de soro de

galinhas.....35

Figura 16. Visualização da membrana de Western Blotting, após revelação. Canaleta 1, contém 20 µL Marcador de tamanho molecular (Rainbow Molecular Weight Markers GE Healthcare); canaleta 2, proteína recombinante S1 purificada; canaleta 3, purificação do eluato da canaleta 2; canaleta 4, mudança no pH dos tampões de ligação e eluição para pH 7,0.

Anticorpos utilizados são provenientes de um pool de soro de galinhas.....36

Figura 17. Membrana de Western, teste de diferentes soros de galinha, anticorpos policlonais, para observar a sua reatividade contra a proteína recombinante de S1. Cada canaleta contém 30 µL proteína e 30 µL levedura e

10 µL Marcador de tamanho molecular (Bench Marck-Invitrogen).....36

Figura 18. Resultados do método Y-S1-ELISA realizado com diferentes concentrações da proteína recombinante da estirpe M41 do VBI expressa em *S.cerevisiae*, ensaiando-se amostras de soro positivo e soro negativo de galinha, em diluições de 1:25 a 1:80038

Figura 19. Cinética das respostas de anticorpos em grupo de aves infectadas e re-infectadas com o VBI (A) ou em grupo de aves vacinadas e desafiadas com este mesmo vírus (B) através da técnica de Y-S1-ELISA. Os níveis de anticorpos são expressos como valores A/P médios. As setas indicam os dias do desafio (D) ou da vacinação (V).....39

Figura 20. Correlação entre os níveis de anticorpos (valor A/P) obtidos no Y-S1-Elisa e no kit comercial de ELISA para o VBI.....41

Expressão da Proteína S1 Recombinante do Vírus da Bronquite Infecciosa em *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação no imunodiagnóstico

RESUMO

A glicoproteína de superfície (S) do vírus da bronquite infecciosa (VBI) em aves; é um alvo antigênico importante para a indução de imunidade e como antígeno utilizado no imunodiagnóstico da infecção causada por este vírus. Nesse estudo, a forma recombinante da subunidade S1 da glicoproteína S da estirpe M41 do VBI foi clonada e expressa como proteína de fusão contendo uma cauda de poli-histidina e o epítipo V-5 em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O gene codificador dessa proteína foi amplificado a partir do RNA genômico da estirpe M41 do VBI, por meio das técnicas da reação de transcrição reversa (RT) e da reação da polimerase em cadeia (PCR). Foi amplificada toda a seqüência codificadora de interesse e fossem geradas extremidades compatíveis com a inserção no vetor pYES2.1/V5-His-TOPO. Este vetor foi usado na transformação de leveduras, tendo sido obtidos os clones transformantes específicos portadores do inserto gênico. A expressão da proteína de fusão foi então induzida, em células de *S. cerevisiae*, sendo produzida a proteína recombinante S1 de fusão com peso molecular 95 kDa. Essa proteína apresentou com uma elevada reatividade cruzada para a proteína S do próprio vírus, tal como demonstraram os resultados das análises pelo Western blotting e ELISA. Essa proteína de fusão foi, devido à presença da cauda de poli-histidina, prontamente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel - agarose e, posteriormente utilizada com sucesso no desenvolvimento de um método indireto de ELISA para a detecção de anticorpos específicos de galinhas infectadas com o VBI.

Palavras chaves: Glicoproteína S1, Vírus da Bronquite infecciosa (VBI), Clonagem e Expressão, *Saccharomyces cerevisiae*

Expression of the S1 Protein from Infectious Bronchitis Virus in *Saccharomyces cerevisiae* to immunodiagnosis application

SUMMARY

The surface glycoprotein of infectious bronchitis virus (IBV) is an important antigenic target for the induction of immunity and as an antigen in the immunodiagnosis of infection caused by this virus. In this study, the gene of S1 glycoprotein of M41 strain of the IBV was cloned and expressed as a fusion protein containing a poly-histidine and epitope V-5 tags in the yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. The S1 gene was amplified from genomic RNA of the M41 strain of VBI, by reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR). The entire coding sequence of S1 gene was amplified and inserted in the vector pYES2.1/V5-His-TOPO. This construct was used for transforming yeast cells, and to obtain specific clones carrying the inserted gene. The expression of the fusion protein was induced in transformed cells of *S. cerevisiae*, and a recombinant S1 protein was produced with a molecular weight of 95 kDa. A high cross-reactivity with the original S1 protein from the virus was detected by Western blotting and ELISA. The presence of the poly-histidine tail in the fusion recombinant protein favored their prompt purification by affinity chromatography in a column of nickel-sepharose. This recombinant S1 protein was successfully used in the development of an indirect method of ELISA for the detection of specific anti-IBV antibodies in chickens experimentally infected or vaccinated with this virus.

Keywords: S1 glycoprotein, Infectious Bronchitis Virus (IBV), Cloning and Expression, *Saccharomyces cerevisiae*

I. INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI), patógeno causador da Bronquite Infecciosa, dissemina-se com rapidez e facilidade entre as espécies de aves susceptíveis, gerando uma infecção que acomete principalmente matrizes, galinhas de postura e frangos de corte, nos quais provoca lesões no trato respiratório e urogenital. Além disso, a infecção pelo VBI apresenta ampla distribuição mundial, ocasionando grandes prejuízos a atividade avícola industrial.

Os surtos da infecção provocados por este vírus ocorrem com elevada frequência ao longo do ano. Esse vírus possui elevada variabilidade genética e antigênica em decorrência das mutações e recombinações. No campo, isso leva a um isolamento contínuo de novas estirpes variantes desse vírus, causando a quebra da imunidade conferida pelas estirpes vacinais.

O alvo principal das variações genéticas é a glicoproteína S. Essa proteína sofre alterações na composição de seus aminoácidos que estão localizados em determinadas seqüências associadas com variações antigênicas imunogênicas relevantes determinadas pelos testes de vírus neutralização e pelo ensaio de protectotipos. Ainda, a glicoproteína S apresenta sítios importantes relacionados a adsorção com receptores de células alvo de infecção e sítios antigênicos, voltados a interação com anticorpos neutralizantes ou inibidores da hemaglutinação.

A aplicação de meios mais rápidos para o diagnóstico da bronquite infecciosa, tem uma estreita dependência da utilização de técnicas sorológicas que objetivam, além do sorodiagnóstico, fazer também a avaliação da resposta imunológica vacinal. Dessa forma as análises sorológicas são de enorme importância para se conseguir um controle mais efetivo dos surtos de infecção pelo VBI, tanto nas criações de matrizes / reprodutores, galinhas de postura, como de frangos de corte.

Dentre os vários testes sorológicos existentes para serem aplicados no imunodiagnóstico do VBI, destacam-se os ensaios imunoenzimático em fase sólida (ELISA), que têm sido extensivamente usados, principalmente em razão da

disponibilidade de kits comerciais dessa reação e de sua capacidade de gerar bons indicadores dos níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou vacinadas com VBI, favorecendo, dessa forma, o monitoramento sorológico do estado imune em granjas onde é mantido um número muito grande de aves. Há, porém, algumas limitações dos métodos atualmente existentes de ELISA, incluindo os kits comerciais dessa reação, pois eles detectam anticorpos que reagem com todas os antígenos protéicos do VBI e, obviamente, não discriminam aqueles anticorpos que interagem com os sítios antigênicos mais específicos e relevantes como os que estão localizados, por exemplo, na subunidade S1.

Sendo assim, a clonagem e expressão da glico-proteína S1 do VBI pode trazer algumas vantagens para o preparo de antígenos a serem utilizados em testes sorológicos, tais como os ensaios imuno-enzimáticos, utilizadas soro-diagnóstico de aves infectadas ou vacinadas a campo pelo VBI.

Com relação à obtenção da subunidade S1 do VBI, a literatura revela que formas recombinantes dessa glicoproteína podem ser produzidas com sucesso em sistemas eucariotos de clonagem e expressão, como são os binômios fowlpoxvírus - fibroblastos de embrião de galinha, ou baculovírus - células de insetos, ou ainda vetor de *Agrobacterium spp.* - células de batata.

As leveduras já foram usadas como sistemas hospedeiros para a clonagem e expressão de proteínas heterólogas virais recombinantes. Entretanto, tal metodologia foi empregada para um número bem menor de patógenos virais se comparada com aquela que utiliza os sistemas de hospedeiros procaríotos como *E. coli*, ou por meio de células de vertebrados ou invertebrados. Assim, as células de levedura, como as do gênero *Saccharomyces* e *Picchia*, possuem um conjunto significativo de vantagens e apresentam um elevado crescimento, por serem econômicas e simples, e também capazes de produzirem proteínas heterólogas recombinantes de forma segura e mais barata.

A possibilidade de fazer a clonagem, a expressão e a caracterização da glicoproteína S do VBI, abre perspectivas interessantes com grande potencial de ser aplicada no imunodiagnóstico da infecção causada por esse vírus, ou no monitoramento

da imunidade humoral induzida após a administração de vacinas contra a bronquite infecciosa.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A BI causada pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV) é uma doença de grande impacto econômico na avicultura (MOSCOSO ,et.al. 2005) devido a perdas decorrentes de doença respiratória e/ou renal grave, queda de postura e alterações na qualidade dos ovos. Além destes quadros da doença, a partir do ano de 2003 no Brasil vêm ocorrendo novos surtos atípicos de BI, associados com a apresentação de um novo tipo de lesão caracterizado por degeneração e necrose da musculatura peitoral. Esta nova apresentação da doença sugere a ocorrência de novas estirpes atípicas no Brasil, cujo quadro de miopatia parece semelhante aos surtos causados por um novo sorotipo viral, a exemplo dos vírus conhecidos como 4/91(793B) primeiramente descritos por COOK et al. (1984).

A bronquite Infecciosa foi observada pela primeira vez em 1930, no estado norte americano de Dakota do Norte, sendo descrita por SCHALK e HAWN (1931). No Brasil, foi diagnosticada primeiramente por HIPÓLITO (1957).

Essa enfermidade configura-se como um grande problema para a avicultura nacional já que o Brasil é o maior produtor avícola do mundo (USDA, 2004) e o conjunto das características que envolvem a doença revela a importância de serem adotados métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis, a fim de se poder adotar programas mais efetivos de controle desta doença.

O agente etiológico da BI é o Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) que foi isolado pela primeira vez em ovos embrionados, após a inoculação da cavidade alantóide, tendo sido constatado que ele pode causar lesões embrionárias características de nanismo e enrolamento e após sucessivas passagens por ovos embrionados podem provocar um aumento da mortalidade do embrião (BEAUDETE e HUDSON, 1937).

O vírus da bronquite infecciosa pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Coronavirus* (grupo III) (CAVANAGH, 1997). Esse vírus se caracteriza por possuir envelope lipo-protéico e apresentar o capsídeo com simetria

helicoidal e um diâmetro do virion completo variando de 90 a 200nm. Ainda, as partículas virais são pleomórficas, embora predominem as formas esféricas e o virion apresenta projeções em sua superfície, as quais conferem um formato de coroa, por isso o nome Coronavírus. O genoma do VBI é composto por uma fita de RNA simples, não segmentados, com polaridade positiva e 27,6 Kb de comprimento (BOURSNELL et al., 1987). Três diferentes genes são responsáveis por codificar as principais proteínas estruturais deste vírus, isto é, a glicoproteína de superfície S, a glicoproteína de matriz M e a proteína de nucleocapsídeo N. A glicoproteína S é clivada após tradução em duas subunidades S1 (84 kDa) e S2 (92 kDa) (LAI e CAVANAGH, 1997).

O principal sítio de replicação do VBI são as células do sistema respiratório e as principais lesões e sinais clínicos produzidos pela infecção com esse vírus são caracterizados por ronqueira, respiração ofegante e descargas nasais. As lesões podem ser complicadas pela presença de infecções bacterianas secundárias, implicando na redução no ganho de peso, condenação de carcaças de frangos de corte e mortalidade devido ao desenvolvimento de aerossaculite, pericardite e perihepatite. O vírus também pode comprometer o sistema reprodutor, resultando na redução da produção e comprometimento da qualidade interna e externa dos ovos, além do sistema urinário, levando á quadros de nefrite-nefroze. Existem ainda os sorotipos enterotrópicos, os quais são capazes de causar lesões no intestino causando diarréia e desidratação. A taxa de mortalidade é baixa em aves acima de 6 semanas de idade e maior em aves jovens. (WANG, 1994)

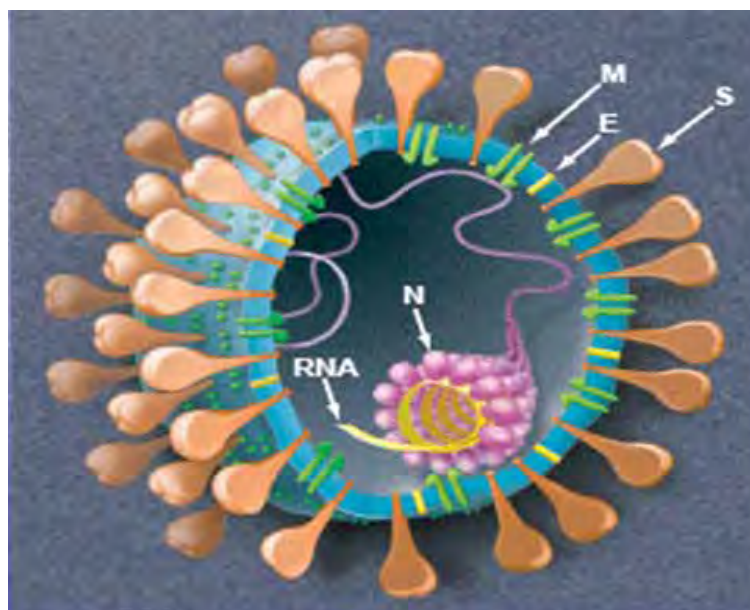


Figura 1. Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa. São destacadas as proteínas estruturais: S, glicoproteína de superfície; N, proteína fosforilada de nucleocapsídeo, e a M, glicoproteína de membrana.

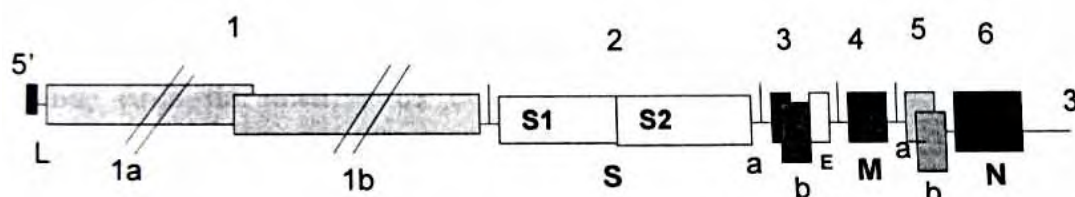


Figura 2. Esquema representativo do genoma completo do vírus da bronquite infecciosa.

2.1. Glicoproteína S

Foi demonstrado que o gene da glicoproteína S consiste de aproximadamente 3400 a 3500 nucleotídeos e codifica uma proteína de 1145 a 1157 resíduos de aminoácidos. Esta proteína é clivada após tradução em S1, com 520 a 532 resíduos de aminoácidos, compreendendo desde a extremidade aminoterminal para uma região mais central da molécula e, em S2 com 625 resíduos de aminoácidos, que se distribuiu

desde essa região mediana do polipeptídio S até a extremidade carboxi-terminal dessa mesma molécula (NIESTERS et.al. 1986)

Um outro aspecto a respeito das propriedades genéticas do VBI é que a região gênica codificadora do polipeptídio S1 varia muito em sua composição de nucleotídeos. Tais variações estão principalmente agrupadas dentro de regiões Hipervariáveis (HVRs) desse gene, as quais coincidem principalmente com a codificação de resíduos de aminoácidos que compõem os sítios antigênicos mais relevantes do VBI (CAVANAGH et al., 1984) .

Foi constatada a ocorrência de uma extensa variabilidade no gene codificador da glicoproteína S, o que acarreta o delineamento de regiões mais variáveis, denominadas hipervariáveis e que se distribuem ao longo da molécula dessa glicoproteína. Ademais, com o auxílio de técnicas de indução de mutantes com determinados anticorpos monoclonais neutralizantes contra o VBI, foram mapeados os principais sítios antigênicos nessa glicoproteína. Dessa forma, foi verificado que a glicoproteína S apresenta oito sítios antigênicos mais importantes, sendo que seis estão presentes na subunidade S1, e são identificados por S1- A/B/C; que se encontram sobrepostos e S1-D, S1-E e S1-F. Já, na subunidade S2, localizam-se mais dois sítios antigênicos S2-G e S2-H. Foi relatado, também, que esses sítios antigênicos, com exceção de S1-F e S2-H, podem induzir a produção de anticorpos vírus-neutralizantes, sendo, portanto, críticos na definição dos diferentes sorotipos do VBI (CAVANAGH et al., 1984)

Em suma, deve ser destacado também que a subunidade S1 está envolvida com a infectividade viral e contém os principais epítomos vírus-neutralizantes, os quais são constituídos por determinadas seqüências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo a cada estirpe do VBI e, ainda, apresenta sítios responsáveis pela atividade hemaglutinante desse mesmo vírus (LAI e CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 1995). A glicoproteína S1 se caracteriza ainda por apresentar uma variabilidade acentuada em determinadas seqüências de aminoácidos de sua estrutura, fenômeno este que foi identificado quando se fez a comparação dessas proteínas provenientes de diferentes estirpes européias e também de algumas estirpes pertencentes ao sorotipo Massachusetts (Mass) do VBI. Tais seqüências são

denominadas de regiões hipervariáveis (HVR), tendo sido mapeadas 3 dessas regiões para a glicoproteína S1: a região HVR I, que é delimitada pelos resíduos 56-69 de aminoácidos, a região HVR II, compreendida entre os resíduos 117-131 de aminoácidos e a região HVR III, que se estende do resíduo 250 ao 386 de aminoácidos. Vários estudos têm demonstrado que todas essas três regiões estão diretamente associadas na interação com anticorpos vírus-neutralizantes e, por conseguinte constituem os determinantes sorotipo-específicos apresentados pelas diferentes estirpes do VBI (CAVANAGH, et al., 1984)

2.2 Diagnóstico da infecção pelo VBI e a Aplicação de Técnicas Imunológicas

A técnica convencional para diagnosticar o VBI depende diretamente do isolamento viral em ovos embrionados SPF (*“Specific Pathogen Free”*) (GELB et al., 1991) ou em culturas celulares, seguido da identificação por meio da reação de vírus-neutralização (SN) (COOK, 1984).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BI são o teste de vírus-neutralização, de inibição de hemaglutinação e o ELISA com anticorpos monoclonais ou policlonais (IGNJATOVIC e ASHTON, 1996).

Por outro lado, deve-se salientar que o diagnóstico rápido da infecção pelo VBI e a determinação do estado de imunidade contra esse mesmo vírus em um plantel de aves, são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da BI. Para tanto, foi comprovado que os testes sorológicos e, dentre estes, os ensaios imunoenzimáticos, quando realizados com reagentes e padrões apropriados, indicam com elevada acurácia, as concentrações de anticorpos específicos anti-VBI, podendo contribuir de forma relevante na avaliação e o monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (MARQUARDT et al., 1981; SNYDER et al., 1983).

Atualmente a suspensão purificada do VBI por ultra-centrifugação em gradiente de sacarose é rotineiramente usada para ser adsorvida, na primeira etapa da reação, ao suporte sólido (superfície da cavidade da microplaca), dentro do desenho dos atuais

kits comerciais de ELISA. A purificação de partículas do VBI requer, por sua vez, a propagação freqüente desse vírus em sistemas de células eucarióticas, no caso específico desse vírus, em ovos embrionados SPF. Em adição a isso, os imunoreagentes mais eficientes e confiáveis para serem usados nos ensaios imunoenzimáticos, exigem a utilização de preparações altamente purificadas desse vírus. Isso torna bastante difícil e oneroso os procedimentos para purificação de um vírus envelopado e com elevada labilidade de conservação da estrutura nativa dos seus mais importantes antígenos; especialmente as glicoproteínas das espículas de superfície, como é o VBI (NDIFUNA et al., 1998, WANG et al., 2002).

Dentre os vários testes sorológicos para o VBI, o ELISA tem-se mostrado o mais sensível e o mais amplamente usado para o monitoramento dos plantéis avícolas, especialmente nas criações industriais de maior porte. Uma vez que o ELISA não é um ensaio sorotipo-específico para o VBI (MARQUADT et al., 1981), ele se torna apropriado para avaliar as respostas imunes induzidas por vacinas preparadas com diferentes sorotipos do VBI. O uso de kits comerciais de ELISA para a detecção de anticorpos é rotineiramente adotado em várias partes do mundo e, inclusive, no Brasil. Considerando-se que as microplacas dos kits comerciais de ELISA são adsorvidas com partículas virais inteiras do VBI, esses ensaios detectam anticorpos contra todos os principais antígenos desse vírus e já é reconhecido que a glicoproteína S1 é diretamente responsável pela interação com anticorpos vírus-neutralizantes e inibidores da hemaglutinação (KUSTERS et al., 1990). Dessa forma, se for possível revestir as cavidades das microplacas de ELISA apenas com a glicoproteína S1, os anticorpos detectados nessa reação poderiam apresentar uma maior correlação com aqueles que exercem atividade vírus-neutralizante, o que proporcionaria algumas informações adicionais biologicamente relevantes quando da aplicação desse tipo de técnica imunológica.

2.3 Controle da infecção pelo VBI

O controle da BI está principalmente fundamentado no uso de vacinas formuladas com estirpes "vivas" e atenuadas do VBI, ou ainda com estirpes inativadas associadas a adjuvantes oleosos. No entanto, a BI permanece, em vários países, inclusive no Brasil, como um dos problemas mais proeminentes para a sanidade avícola, mesmo com a ampla utilização das vacinas acima mencionadas, indicando a importância e a necessidade de que sejam procuradas algumas novas alternativas de preparações imunogênicas mais eficazes para fazer frente aos mecanismos de evasão desse vírus que não raro conduzem a ruptura do estado de imunidade conferido por essas vacinas nos hospedeiros imunizados. Assim, surtos de infecção pelo VBI continuam ocorrendo em aves vacinadas, devido à baixa proteção cruzada conferida pelas estirpes vacinais em relação às variantes de campo, que constantemente estão surgindo em plantéis de aves comerciais (COOK, 1984; DAVELAAR, KOUWENHOVEN e BURGER, 1984; GELB, WOLFF e MORAN, 1991; JIA et al., 1995; KING, 1988).

2.4 Clonagem e Expressão das proteínas recombinantes

A expressão de proteínas recombinantes em células onde elas não ocorram naturalmente é denominada produção heteróloga. Atualmente uma gama de sistemas heterólogos estão disponíveis como bactérias (*E. coli*), levedura (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*), entre outros (WALSH, 1998). A escolha do bio processo para síntese e purificação de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de fatores, como as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, da finalidade e sua obtenção, e da viabilidade econômica do método.

As bactérias, particularmente a *E.coli*, estão certamente entre os sistemas mais comumente empregados na produção de proteínas recombinantes heterológicas, sendo atualmente utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como a insulina, hormônio do crescimento humano, entre outros, obtendo altos níveis de expressão (WALSH, 1998). O fato de estas bactérias terem sido

intensamente utilizadas como modelo para estudos da genética de procariotos, fez com que sua biologia molecular já esteja bem estabelecida, sendo de fácil manipulação e por multiplicarem-se rapidamente em meios relativamente simples.

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

A glicoproteína S do VBI, especialmente a fração S1 de estirpes isoladas de Taiwan (IBVA1171), Coréia (K91p6), Austrália (Vic S), China (ZJ971) e Europa (Beaudette), já foi clonada e expressa em *E.coli* (WANG et.al., 2002), em poxvírus (TOMLEY et.al., 1987), baculovírus (SONG et.al., 1998), adenovírus (JONHSON et.al., 2003), ou ainda , e em células vegetais de batatas (ZHOU et.al., 2003) tendo sido obtidas, na maioria desse casos, proteínas recombinantes S1 que apresentaram um bom nível de reatividade cruzada com a glicoproteína S1 nativa , isto é, do próprio VBI e/ou que foram capazes de induzir imunidade parcial em aves contra o desafio feito com estirpe virulenta do VBI.

As leveduras da espécie de *S. cerevisiae* vem ganhando cada vez mais popularidade como organismo hospedeiro, sendo utilizadas para a produção de uma variedade de proteínas heterólogas. Essas células oferecem um conjunto considerável de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão gênica. Uma das vantagens que se destaca, é que esses microorganismos não produzem endotoxinas (lipossacarídeos-LPS), sendo portanto reconhecidos como muitos seguros para produção de alimentos, medicamentos ou imunobiológicos. A produção em larga escala e o processamento de derivados de levedura são procedimentos já bem estabelecidos e podem ser facilmente adaptados para produção de proteínas heterólogas (CHEN et. al .2000).

Muitas proteínas biologicamente importantes são naturalmente secretadas e podem adotar a sua conformação tridimensionalmente correta dentro da via secretora

intracelular das leveduras (ROMANOS, et.al., 1992). Assim como ocorre nos eucariotos superiores, a secreção de proteínas em leveduras é dirigida por uma seqüência aminoterminal que faz a translocação co-transducional no reticulo endoplasmático (RE). Esta seqüência denominada de peptídeo sinal é removida por uma peptidase sinal. No lúmem do RE, grupos aspargina-glicosil ligadas podem ser adicionadas a molécula protéica. O sinal para adição desses açúcares N-Ligados é o mesmo para glicoproteínas de leveduras e de animais, facilitando o trânsito dessas proteínas pelas vesículas do RE em direção ao complexo de Golgi onde ocorrem modificações nas estruturas moleculares glicosiladas.

Vários são os estudos que relatam o sucesso da produção de proteínas heterólogas em leveduras, tanto os que fazem uso de seqüências sinais próprias da proteína recombinante, ou seja, seqüências sinal heterólogas, como as seqüências sinal da própria levedura, isto é seqüências sinal homólogas (HAKKAART et.al., 1998).

Há um número elevado de pesquisadores que empregado com sucesso, leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Picchia* para fazer a expressão de uma gama de diferentes antígenos virais como aqueles derivados de HIV, papilomavírus, hepatite B, vírus da influenza, vírus da raiva, vírus da língua azul, vírus da leucose bovina (KLEPPER et.al., 1993)

A *S. cerevisiae* já foi usada com sucesso para a produção de VP2 proveniente do vírus da doença de Gumboro (AZAD et. al., 1991) e mais recentemente para o vírus da bronquite infecciosa com a proteína N (GIBERTONI, 2005) e para fragmento peptídico S1 (FURUYAMA, 2005).

Considerando que os procedimentos mais atraentes e promissores para o desenvolvimento de novas preparações vacinais contra vírus em geral e, em especial o VBI, bem como de antígenos virais para a utilização em ensaios imunológicos, estão diretamente relacionados à utilização de técnicas de engenharia genética que envolva a clonagem e a expressão dos genes codificadores das proteínas virais, sob o ponto de vista de imunogenicidade (FURUYAMA, 2005), julgou-se oportuno desenvolver a presente investigação com o objetivo principal de fazer a clonagem e a expressão do gene codificador da glicoproteína S1 do VBI em *S. cerevisiae*.



Figura 3. Células de *Saccharomyces cerevisiae* <http://www.diwinetaste.com/dwt/it2007016.php>

III. OBJETIVOS

- 3.1. Desenvolver e estabelecer um sistema hospedeiro heterólogo de células de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para a expressão o gene da glicoproteína S1 da estirpe M41 do vírus da bronquite infecciosa aviária, obtido a partir do produto amplificado de toda a *open reading frame (orf)* desse mesmo gene por RT-PCR a partir do RNA genômico viral.
- 3.2. Purificar a proteína S1 recombinante expressa em leveduras.
- 3.3. Caracterizar imunoquimicamente a proteína S1 recombinante expressa em leveduras.
- 3.4. Utilizar a proteína S1 recombinante na montagem e aplicação de um ensaio imunoenzimático para fazer a detecção de anticorpos específicos contra o VBI em aves infectadas ou vacinadas com esse vírus.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propagação Viral

A estirpe M41 foi multiplicada na cavidade córion-alantóide de ovos embrionados, livres de patógenos específicos SPF (*Specific Pathogen Free*), com 9 a 11 dias de idade. Após 36 h de inoculação, estes ovos foram resfriados a 4 °C, por um período mínimo 4 h. Após decorrido esse tempo, o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido e centrifugado a 10.000 xg a 4 °C por 30 min, ocorrendo assim a clarificação da suspensão viral. O volume total obtido foi separado em alíquotas de 2 ml, e armazenadas a - 70°C.

4.2. Titulação da infectividade viral

O vírus foi titulado também em ovos embrionados SPF, com idade de 9 a 11 dias. Estes ovos sofreram inoculação na cavidade alantóide com diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-9}) da estirpe M41 do VBI. Durante uma semana os ovos foram observados diariamente, lembrando que as mortes que ocorreram dentro das primeiras 24 h pós-inoculação, foram consideradas inespecíficas. Durante os sete primeiros dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas diariamente e o cálculo do número de doses infectante 50 % para os embriões/ml (DIE_{50}/ml) foi determinado pelo método recomendado por REED e MUENCH (1938).

4.3. Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para flanquear toda *open reading frame (orf)* do gene codificador da glicoproteína S1, que no caso da estirpe M41 do VBI perfaz um total de 1580 pb. Para isso consultou-se a seqüência de nucleotídeos do VBI cadastrado sob n-º de acesso M21883 do *GeneBank*. Com auxílio de programas computacionais como *Gene Runner* (versão 3.05, *Hastings Software, Inc.*) e *BioEdit Sequence Alingment* Editor (versão 7.0.4.1, 1997-2005 Tom Hall) as

características físico-químicas e desempenho da técnica de PCR foram analisadas. Os iniciadores obtidos então foram: *Forward*: 5'-GAAATGGTGGTAAACACC-3' (S1+) com a seqüência de KOZAK incluída, e *Reverse* 5'-AATGTAAACTGGTTCTCA-3' (S1-). A seqüência de KOZAK foi incluída, pois é uma exigência do sistema de expressão utilizado neste trabalho: o sistema pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®).

4.4. Extração do RNA viral

A extração do RNA da estirpe M41 do VBI foi realizada a partir de suspensão de líquido alantóide infectado e através dos procedimentos do *kit* comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.5. Obtenção do gene da proteína S1 do VBI

Primeiramente foi preparado o cDNA a partir do RNA genômico, tendo sido aplicada a técnica de RT (transcrição reversa) e de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para tanto, incubou-se dNTP (0,5 mM), *Randon Primers* (0,15 µg/l) a 65°C por 5 min. Acrescentou-se, em seguida, o tampão apropriado da enzima transcriptase reversa [Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 ; HCl 75mM, MgCl₂ 3mM] incubando-se por 2 min a 42°C. Após esse procedimento foi acrescentada a enzima transcriptase reversa (*Superscript* da Invitrogen). A reação total foi encubada a 42°C por 50 min, e por fim, a 70 °C por 15 min em um Termociclador TECHNE PROGENE ® (Techne Incorporat, Duxfod CAMBRIDGE, UK).

O produto amplificado contendo o gene de interesse (1580 pb) foi purificado através da utilização do “kit” comercial Wizard PCR® Preps DNA Purification Systems (Promega), de acordo com as especificações do fabricante, para depois ser clonado dentro do vetor pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen®), o qual foi usado para a transformação de células de *E. coli* da linhagem DH5α, sendo que os transformantes foram cultivados em meio 2x LB 50 µg/ml de ampicilina. Foram extraídas as amostras de DNA plasmidial dos clones em placas de 96 cavidades, os quais haviam sido incubados em meio “Circle Grow”, com ampicilina 50 µg/ml. Ao final dessa etapa,

preparações de DNA plasmidial obtidas a partir dos clones transformantes foram digeridas com as enzimas *PvuII* e *XbaI*, cujos sítios de clivagem estão localizados no vetor e no inserto e os fragmentos obtidos foram analisadas por eletroforese em gel de agarose para constatar a orientação correta de clonagem. O sistema pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®) possibilita a expressão de uma proteína heteróloga recombinante com etiquetas na sua porção carboxi-terminal (cauda), do epítipo V-5 e de uma seqüência de 6 histidinas (poli-histidina).

Após a extração do DNA de seis clones bacterianos foi feita a confirmação da presença de plasmídeos contendo o inserto do gene S1 do VBI, por meio da técnica de PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores, bem como se fez a determinação da quantidade de DNA, em espectrofotômetro UV, nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm (SAMBROOK, et al. 1989).

Além disso, as amostras de DNA plasmidial obtidas submetidas à reação de seqüenciamento, utilizando-se 2µl de “Big Dye Terminator” (Perkin Elmer), 2µl de tampão [2,5X] (Tris-HCl 200mM, pH 9,0 e MgCl₂ 5Mm), 10 pmoles/µl de cada um dos iniciadores VBI-S+, VBI-S/T+ e VBI-S-, bem como os iniciadores específicos para os vetores empregados, *GAL 1* Forward, ou *V 5 C- term Reverse*, 100ng de DNA e água destilada grau Milli-Q, previamente esterilizada (q.s.p) 10µl. As amplificações foram realizadas em placas de 96 poços conforme o programa recomendado pelo fabricante. Após amplificação, o produto da reação de PCR, “cycle-sequencing”, foi purificado por meio da adição de isopropanol. Ao final, as placas foram mantidas à temperatura ambiente, por 20 min, para a secagem das amostras.

A reação de seqüenciamento do DNA foi realizada no aparelho ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster-City, CA, U.S.A). A seqüência de nucleotídeos foi compilada e analisada usando-se o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e para comparar a similaridade de cada um dos clones analisados com a estirpe M41 do VBI, foi empregada a seqüência do gene S depositada no GenBank citada anteriormente, bem como se fez uma avaliação das seqüências de nucleotídeos

presentes nas extremidades 5' e 3' com aquelas pertencentes à estrutura presente nas extremidades dos dois vetores utilizados nesse estudo.

4.6. Expressão da proteína recombinante S1 na cepa INVSc1 de *S. cerevisiae*

Para a expressão da proteína recombinante S1 da estirpe M41 do VBI em células de levedura transformadas, seguiu-se o protocolo preconizado pelo sistema pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®), que contém o promotor GAL-1, o qual permite a expressão do gene inserido no sítio múltiplo de clonagem, e o gene URA-3 para seleção de um grande número de cópias em levedura, além de ser um vetor episossomal para a clonagem de produtos de PCR, e se fez a transformação de células competentes de levedura, as quais foram preparadas com o auxílio dos reagentes e dos procedimentos do Kit S.c. EasyComp™ Invitrogen Co.

Em suma, um clone da levedura transformante e previamente confirmado como portador do inserto gênico de interesse foi inicialmente cultivado em meio YPD líquido, de forma a se obter um bom crescimento a 30⁰ C no período de 2 a 3 dias. Em seguida, repicou-se novamente a levedura em meio YPD sólido (extrato de levedura; peptona; dextrose e agar), visando à obtenção de colônias isoladas, sendo as placas então incubadas a 30⁰C por aproximadamente 4 dias. Uma colônia isolada de levedura, contendo o vetor e o inserto do gene S1 do VBI foi inoculada em meio seletivo SC-U (6,7g de “Yeast Nitrogen Base”, 1,92g de “Yeast Synthetic Dropout” sem URA), contendo glicose e cultivada durante a noite a 30⁰C, com agitação. Em seguida, a densidade óptica a 600 nm foi mensurada e a partir do valor obtido, foi calculada a quantidade de cultura necessária para se alcançar uma DO₆₀₀ final igual a 0,4, sendo feita a centrifugação a 1,500 x g por 15 min. O sedimento de células de leveduras foi então ressuspenso em meio de indução 6,7g de “Yeast Nitrogen Base”, 1,92g de “Yeast Synthetic Dropout” sem URA, 0,004% de adenina sulfato, e uma solução de 20% de galactose estéril. A cultura foi incubada a 30⁰C com agitação, sendo feita a colheita de alíquotas da cultura, cujas células foram sedimentadas por centrifugação a 1.500 x g

/5 min / 4°C, sendo os pellets estocados a -80°C, para posterior avaliação da expressão, usando-se a técnica de PAGE-SDS e o Western-Blotting .

4.7. Extração da proteína recombinante S1 das células lisadas de levedura

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

As células de levedura contendo a proteína recombinante foram ressuspensas em 500 µl de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio, pH 7.4; 1 mM de EDTA; 5% de glicerol e 1mM de PMSF- Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil), sendo então centrifugadas a 1500 xg por 5 min a 4°C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas no tampão de lise, em um volume adequado e de forma a se obter uma DO₆₀₀ entre 50 – 100.

Foi adicionado um volume igual de esférulas de vidro com 0.4-0.6µm de diâmetro previamente submetidas à lavagem ácida segundo recomendação do fabricante (Sigma). Em seguida, as células de leveduras foram agitadas em vórtex, por 30 s, sendo transferidas por mais 30 s no gelo, repetindo-se estes procedimentos por 4 x, num total de 4 min, para se obter um maior grau de lise das células. Ao final dessa etapa, foi feita a dosagem da proteína total, utilizando-se o kit “Protein Assay” (BIO-RAD) baseado no método de Bradford (1976) e usando-se uma solução de soroalbumina bovina com concentração padronizada de a 1 mg/ml.

O extrato de levedura transformada contendo a proteína S1 recombinante do VBI foi analisado por SDS-PAGE e Western blotting para se pesquisar a presença de produção da proteína S1 recombinante do VBI.

4.8. Purificação da proteína recombinante S1 por coluna de cromatografia de afinidade com níquel - agarose

Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante da resina de Agarose-Níquel (Amersham). Em resumo, o extrato bruto de levedura transformada contendo a proteína S1 recombinante do VBI foi clarificado por meio de centrifugação a 10,000 x g por 30 min, e o sobrenadante obtido foi purificado através da técnica de cromatografia de afinidade tendo sido aplicado em um volume 1ml de agarose-Níquel (Amersham) equilibrado com tampão de ligação contendo 20mM de Imidazol para reduzir a combinação com proteínas celulares não específicas. A proteína S1 recombinante foi eluída da matriz da resina após a aplicação do tampão de eluição contendo 500mM de Imidazol. Frações de 1 ml foram colhidas da coluna. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford.

4.9. Análise bioquímica e imunoquímica da proteína recombinante S1 do VBI expressa em leveduras pela técnica Eletroforese de gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS) e de Western blotting

As amostras foram misturadas em um tampão de preparo da amostra contendo 62,5mM Tris-HCl, pH6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol e fervidas por 5 min e aplicadas em 2 géis de poliacrilamida, sendo usado o "stacking" gel na concentração de 3% e o gel de separação na concentração de 9%. A separação eletroforética pela técnica de SDS-PAGE foi então realizada, utilizando-se um sistema de tampão descontínuo segundo LAEMMLI (1970). As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com Coomassie-Brilliant Blue.

Os polipeptídeos previamente separados pela eletroforese no outro gel de poliacrilamida com SDS foram eletro-transferidos em cuba de transferência úmida para uma membrana de HPVDF (Amersham Bioscience), utilizando-se um tampão de transferência contendo 50 mM de Tris; 384 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol pH 8,3; sendo o processo realizado a 15 V por 35 min e a 4°C. Após o fim da transferência,

a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1% Ponceau S dissolvido em ácido acético 1% e fazendo-se, a seguir, a descoloração, com água destilada. Em seguida, a membrana foi submetida ao bloqueio com 10 mL de PBS (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4); 5% de leite em pó desnatado (LPD) e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por 1h, a temperatura ambiente. Procedeu-se, na fase seguinte, a reação com o conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de cabra anti-IgM de galinha (Bethyl Laboratories Inc. – Montgomery, TX, USA), utilizado para a detecção da proteína recombinante FCH_μ, na diluição 1:500 em PBS-LPD 5%. Após a incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada com PBST e PBS e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura do cromógeno mais substrato específico (FAST DAB - Sigma) contendo dietil-amino-etil-benzidina (0,7 mg) e peróxido de hidrogênio - uréia (1,6 mg). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente dessecada em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979).

4.10. Soros de Galinha Positivos e Negativos para o VBI

O soro de referência positivo de galinha contra a estirpe M41 foi preparado por meio de processo de hiperimunização de 6 galinhas adultas SPF da linhagem leghorn Branca, que foram mantidas em isolador com pressão positiva. Essas aves receberam por via óculo-nasal (1 gota por via) de suspensão viral contendo 10^{4.5} DIE₅₀/ml, tendo sido repetidas 3 inoculações com intervalos de 14 dias entre cada uma delas. Depois de 14 dias da última inoculação as aves foram sangradas e separou-se o soro, que foi armazenado a -20°C, até o momento do uso. O soro colhido de 6 aves SPF da linhagem Leghorn Branca mantidas em outra unidade isoladora com pressão negativa, foi utilizado como soro de referência negativa.

4.11. Soro de galinhas infectadas ou vacinadas com o VBI

4.11.1. Soros de Aves Infectadas Experimentalmente

Doze aves SPF foram alojadas em um isolador compressão positiva, com um dia de idade. Essas aves foram desafiadas aos 42 e 72 dias de idade por meio da inoculação por via ocular de $10^{4.5}$ DIE₅₀/ave da estirpe M41 do VBI. Amostras de soro sanguíneo foram coletadas nas idades de 14, 42, 47, 57, 72, 87 e 102 dias para posteriormente serem analisadas pelo Y-S1-ELISA.

4.11.2 Soros de Aves Vacinadas e Infectadas Experimentalmente

Doze aves SPF foram alojadas em um isolador compressão positiva, com um dia de idade. Essas aves foram vacinadas, aos 14 dias de idade, por via ocular com vacina atenuada constituída pela estirpe H120 do VBI e desafiadas 4 semanas depois (42 dias de idade) por meio da inoculação por via ocular de $10^{4.5}$ DIE₅₀/ave da estirpe M41 do VBI. Amostras de soro sanguíneo foram coletadas nas idades de 14, 42, 47, 57, 72, 87 e 102 dias para posteriormente serem analisadas pelo Y-S1-ELISA.

4.12. Amostras séricas de campo

Um total de 104 amostras de soro de galinhas colhidos de diferentes granjas nas quais havia sido relatado o aparecimento de casos suspeitos de infecção pelo VBI, foram usados nesse estudo. As amostras séricas foram testadas individualmente, tanto pelo teste de Y-S1-ELISA, como pelo teste convencional de ELISA através de kit comercial (SYMBIOTICS, Gaithersburg, MD).

4.13. Teste de Y-S1-ELISA

Microplacas de ELISA com 96 cavidades (Costar) foram adsorvidas com 50 μ l de uma solução da proteína recombinante em diferentes concentrações, diluídas em tampão carbonato/bicarbonato (0.05M, pH 9.6). As placas foram então incubadas a 4°C, durante a noite, depois lavadas 3x com PBS-Tween-20 e bloqueadas por 45 min com 100 μ l por cavidade de tampão de bloqueio (10% de leite em pó desnatado, 0,2% Tween-20, 0,02% de azida de sódio em PBS). As placas foram a seguir, lavadas com PBS Tween-20 3x e foi adicionado 50 μ l por cavidade das amostras de soro de galinha (anticorpo primário), diluídas no tampão de bloqueio, sendo feita, em seguida a incubação à temperatura de 37°C por 1h. As placas foram então novamente lavadas com PBS-Tween-20 por 3x e depois foi adicionado, em sua diluição ideal de uso (1:2.000) o conjugado imunoenzimático constituído por IgG de coelho anti-IgG de galinha com a peroxidase, que também foi diluído no tampão de bloqueio. As placas foram incubadas a 37°C por 1h e, ao final desta etapa foram lavadas por 3x, tal como se descreveu anteriormente. Em seguida foi feita a adição, em volumes de 50 μ l/cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / Orto-fenileno-diamina-OPD), preparada em tampão citrato-fosfato pH 5.0, deixando-se a reação se desenvolver por 15 min à temperatura ambiente, quando foi adicionado HCl 2M em volumes de 50 μ l/cavidade para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas (DOs) obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD - Modelo 550) e no comprimento de onda de 492 nm. Para cada amostra de soro teste a DO média das duplicatas (DO_{MTS}) foi expressa em relação à DO média das duplicatas do soro de referência positiva (DO_{MPRS}) e das duplicatas de soro de referência negativa (DO_{MNRS}), como a denominada relação amostra/positivo e de acordo com a fórmula A/P = (DO_{MTS} - DO_{MPRS}) / (DO_{MPRS} - DO_{MNRS}).

4.14. Método indireto Comercial de ELISA

Para comparar o desempenho do novo ensaio de ELISA desenvolvido com a glicoproteína S1 recombinante de VBI expressa em leveduras, um kit de diagnóstico comercial de ELISA, o chamado *ProFlok IBV antibody test kit* (Symbiotics, Gaithersburg, MD) foi utilizados seguindo as recomendações do fabricante.

4.15. Análise Estatística

Os níveis de anticorpos (valores A/P) foram analisados a fim de se determinar a sensibilidade e a especificidade relativa, bem como a acurácia. Sensibilidade no caso, foi definida como porcentagem de amostras positivas no kit comercial de ELISA que foi corretamente identificada pelo Y-S1-ELISA, enquanto que a especificidade correspondeu a porcentagem de amostras negativas no kit comercial de ELISA que também foi detectada pelo Y-S1-ELISA. Já, acurácia foi definida como a porcentagem de resultados corretos entre essas 2 técnicas. Os níveis de anticorpos (valores A/P) anti-VBI mensurados pelo Y-S1-ELISA foram analisados por regressão linear com os valores de A/P obtidos para cada um dos 104 soros de galinha testados, obtendo-se o coeficiente de correlação (r de Pearson).

V. RESULTADOS

5.1. Propagação e Titulação da infectividade viral

No procedimento de multiplicação da estirpe M41 do VBI em ovos embrionados SPF de galinha, obteve-se um rendimento em termos de massa viral relativamente elevado caracterizado nesse caso, por um título infectante correspondente a $10^{6,1760}$ DIE₅₀/ ml e, portanto suficiente para se empreender, de forma mais apropriada a execução das etapas subseqüentes do desenvolvimento experimental de nosso projeto.

5.2. Extração de RNA e amplificação

Os produtos obtidos nos procedimentos de extração do RNA viral genômico e na técnica de RT e amplificados na PCR estão documentados na figura 4, onde constam os resultados da PCR com iniciadores S1+ e S1-, tendo sido obtido amplificação do fragmento correspondente ao gene codificados da proteína S1 do VBI com tamanho esperado, isto é, 1580 pb. A dimensão do fragmento amplificado foi comparada a um padrão de tamanho molecular de DNA 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) aplicado em uma das canaletas do gel onde foram aplicadas as amostras a serem analisadas, em cada corrida eletroforética.

O fragmento gênico alvo foi, depois de purificado, quantificado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose, (Figura 4) utilizando-se um padrão de quantificação de DNA (pGEM DNA Markers), tendo-se revelado que a preparação continha uma concentração de cerca de 35ng/μl de DNA.

5.3. PCR com Gradiente de Temperatura para otimizar a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores

Para se obter um melhor resultado e ter a confirmação da temperatura adequada para o pareamento dos oligonucleotídeos, foi feito através do Termociclador TECHNE PROGENE[®] (Techne Incorporat, Duxford, CAMBRIDGE, UK), um gradiente com as seguintes temperaturas: 48,2°C; 48,8 °C; 49,5°C; 50,6°C; 51,9°C; 53,4°C; 54,7°C; 55,7 °C; 56,3°C; e 56,8°C.

Através da confirmação por gel de agarose verificou-se que as duas melhores temperaturas foram as de 50,6°C e 51,9°C, dessa forma foi determinada um valor médio de temperatura de pareamento, e equivalente a 51 °C, o que proporcionou a amplificação do produto do gene S1 com o tamanho esperado de 1589 pb (Figuras 4 e 5).

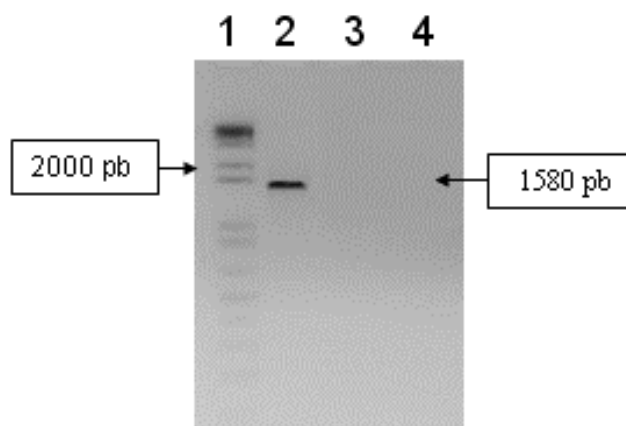


Figura 4- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE). Na canaleta 1 Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Na canaleta 2, o produto da RT-PCR, com o tamanho da banda esperada, com aproximadamente 1580 pares de base.

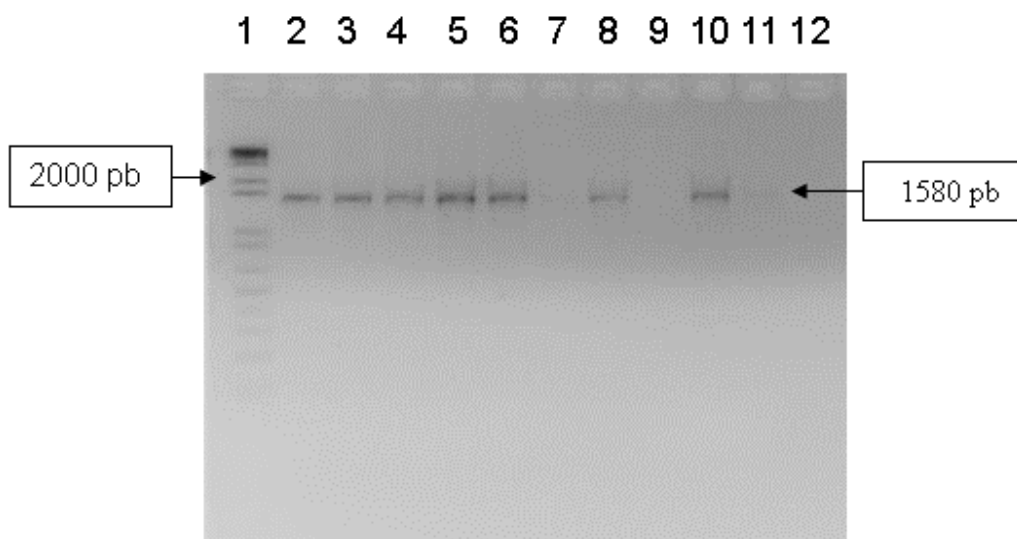


Figura 5- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para o gradiente de temperatura do pareamento dos primers. Na canaleta 1, 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 11, os produtos de RT-PCR 5 μ l provenientes das seguintes temperaturas 48,2°C; 48,8 °C; 49,5°C; 50,6°C; 51,9°C; 53,4°C; 54,7°C; 55,7 °C; 56,3°C; e 56,8°C, respectivamente. Melhores temperaturas correspondem as canaletas 5 e 6.

5.4. Reação de purificação e quantificação do cDNA

Para obter o cDNA puro, sem resíduos, a partir da reação de RT-PCR foi utilizado o kit comercial *Wizard PCR[®] Preps DNA Purification Systems* (Promega). Através da D.O. lida em espectrofotômetro e com a utilização do *Low Mass Ladder* (Invitrogen), em gel de agarose 1%, obtivemos respectivamente os seguintes valores: 132 ng/ μ l e 80 ng/ μ l. Uma vez que através da comparação do cDNA com o marcador molecular, tomou-se como 80 ng/ μ l (Figura 6), a concentração de cDNA para, em seguida, ser realizada a ligação com o vetor plasmidial.

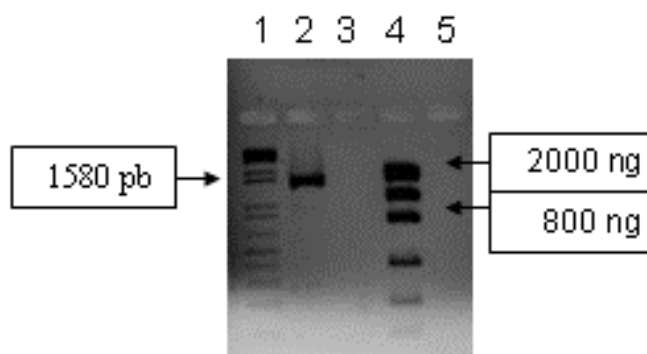


Figura 6- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para quantificar cDNA purificado. Na canaleta 1, 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), Canaleta 2 produto de RT-PCR e na canaleta 4, 3 μ l Low Mass Ladder.

5.5. Ligação do gene com o vetor pYES 2.1/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen), e transformação das células competentes de *E.coli*

Com base nos dados acima e de acordo com o protocolo de ligação padronizado pelo fabricante foram utilizados 1,6 μ l de cDNA. Essa mistura de reação foi mantida 22°C por 18 h e posteriormente foi inserida em células de *E.coli*, através do choque térmico, para que se pudesse obter a clonagem do inserto. As células foram cultivadas em meio sólido LB para que também houvesse a clonagem do vetor contendo o inserto gênico de interesse. Cada colônia obtida foi estocada em uma cavidade diferente da placa *cluster*, totalizando 96 clones diferentes.

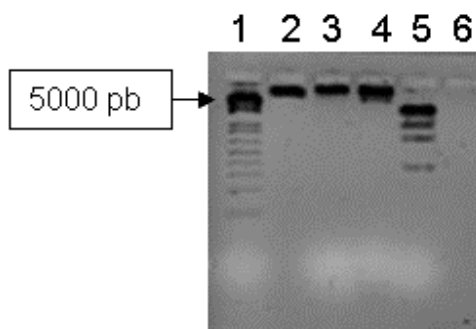


Figura 7- Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para confirmar presença do inserto e do vetor após a extração. Na canaleta 1: 7 μ l de marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), canaleta 2, 3 e 4 a extração do DNA plasmidial da *E. coli*. Respectivamente clones A6, D3, F10. Canaleta 5, 3 μ l Low Mass Ladder.

5.6. Identificação dos clones bacterianos portadores do gene do gene S1 e de sua inserção no vetor *pYES2.1. – TOPO – TA*

Após ter sido feita a ligação do gene codificador do gene S1 da estirpe M41 do VBI no vetor *pYES2.1. – TOPO – TA*, (Invitrogen, Carlsbad, CA) previamente aberto, foi realizada com o produto obtido a transformação de *E. coli* da linhagem DH5 α . Logo após o plaqueamento, foram obtidos 96 clones transformantes, que cresceram no meio seletivo usado. Três desses clones transformantes (D3; A6; e F10) foram então selecionados, para se pesquisar a presença do vetor contendo o inserto gênico de interesse, por meio das análises, ou dos produtos amplificados na PCR com a combinação de iniciadores específicos para o gene de interesse ou para o vetor *pYes2.1. TOPO - TA* (Invitrogen, Carlsbad, CA), ou então dos fragmentos gerados pela clivagem com as enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI*, em amostras do DNA plasmidial extraídas desses mesmos clones. Inicialmente, foi verificado que, na reação de PCR realizada com os iniciadores sense e reverso sobre as amostras de DNA plasmidial colhidas dos clones bacterianos transformantes, houve a amplificação de toda a região gênica codificadora do gene S1 do VBI, gerando um fragmento com o tamanho esperado, isto é, de 1580 pb. (canaletas 2, 6 e 10 da Figura). Nas canaletas 3, 7 e 11, estão demonstrados os produtos da amplificação da reação realizada com os primers sense do vetor juntamente com anti-sense desenhado do gene S1, sendo que o

tamanho esperado para esse produto amplificado. Nas canaletas 4, 8 e 12 estão apresentados os resultados da amplificação quando se foram utilizados os primers sense desenhado para o gene S1 juntamente com o primer anti-sense do vetor. Por fim, as canaletas 5, 9 e 13, estão demonstrados os resultados da amplificação quando a PCR foi realizada com os primers do vetor.

Em adição a isso e com o objetivo de complementar a análise realizada pela técnica de PCR, os mesmos clones bacterianos transformantes testados anteriormente foram selecionados para digestão com as enzimas de restrição *PvuII* ou *XbaI*, cujos sítios de clivagem estão presentes, ou nas extremidades do vetor junto aos sítios de inserção do gene de interesse, ou dentro da seqüência gênica codificadora do fragmento polipeptídico S1-S2 do VBI. Tomando-se como referência o tamanho dos fragmentos obtidos após o processo de clivagem enzimática e separação eletroforética, foi constatado que esses três clones analisados são efetivamente portadores dos insertos do gene codificador do gene S1 do VBI, pois os fragmentos de restrição apresentaram os tamanhos moleculares esperados; isto é, o primeiro de 1402 pb, 314 pb, 209 pb e de 4170 pb, sendo que tais resultados serviram também para confirmar o posicionamento correto do gene dentro do vetor.

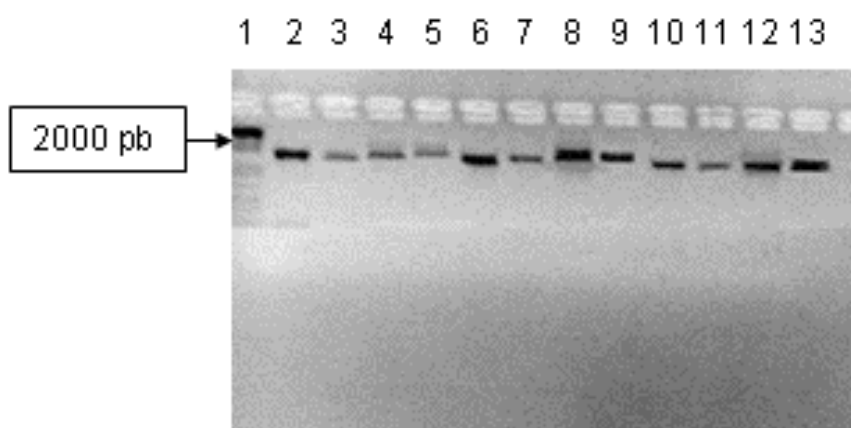


Figura 8- Combinação de Primers visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1, 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 13 os clones submetidos a combinação dos primers. De 2 a 5 clone A6; de 6 a 9 clone D3; e de 10 a 13 clone F10

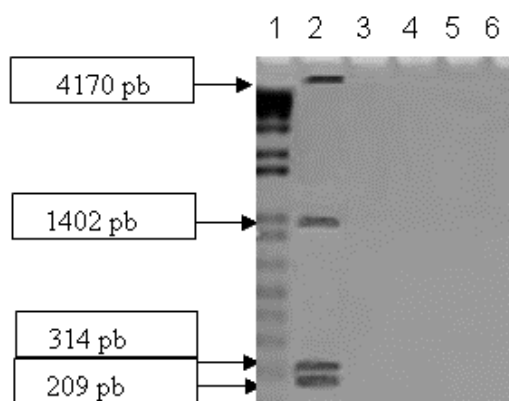


Figura 9 - Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1 , 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), canaleta 2 DNA plasmidial digerido.

5.7. Transformação das células competentes de levedura

Ao se observar e comparar a banda do DNA plasmidial obtido com as correspondentes ao padrão - Low Mass indicado a figura 6, o DNA escolhido foi do clone D3, cuja concentração é de aproximadamente 750 ng/ μ l. Dessa forma segundo o protocolo utilizado, foi colocado 8 μ l desse DNA para fazer a transformação em *Saccharomyces cerevisiae*. O protocolo utilizado está descrito em Material e Métodos, e as colônias transformantes foram cultivadas em duas placas contendo meio sólido SC-URA, foram coletadas e transferidas para uma placa *cluster*, que serve como estoque e da qual foram selecionados aleatoriamente 4 clones para os posteriores testes: A1; C3; G12; H12.

5.8. Identificação dos clones de leveduras portadoras do gene do gene S1 e de sua inserção no vetor pYES2.1. – TOPO –TA

Novamente, assim como foi feito para os clones transformados de de *E.coli*, o DNA foi extraído das células transformadas da levedura *S. cerevisiae* e, através da técnica de PCR feita a combinação com os primers do vetor com os primers desenhados, tal como explanado anteriormente, foram obtidos produtos amplificados ou do inserto do gene S1 ou de partes do vetor utilizado, para ambos os clones de leveduras testados (G12 e H12) (Figura 10). Dessa forma esses dois clones de leveduras foram selecionados para serem submetidos ao processo de indução de expressão do gene de interesse, tendo sido avaliados a expressão de RNAm e da proteína S1 do VBI.

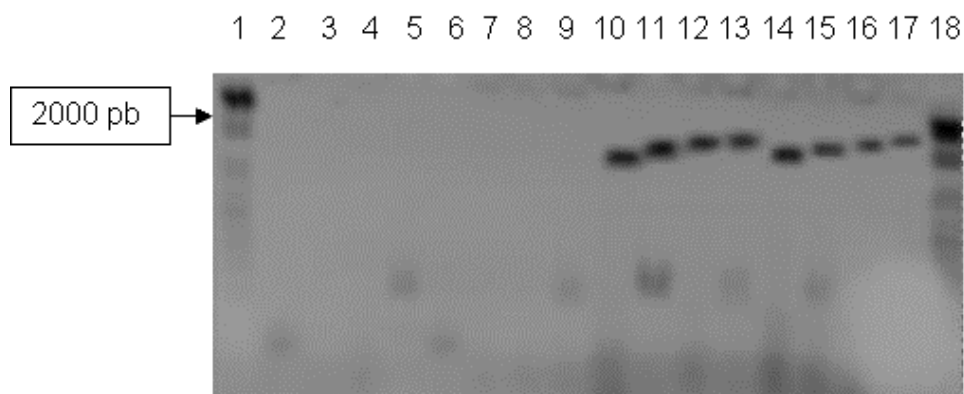


Figura 10 – Combinação de primers visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE).. Na canaleta 1e 18, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas 2, 3, 4 e 5 o clone A1; canaletas 6, 7, 8, e 9 C3; canaletas 10, 11, 12 e 13 clone G12; e nas canaletas 14, 15, 16 e 17 clone H12.

5.9. Seqüenciamento do DNA do inserto gênico nos clones bacterianos transformantes

Após a clonagem e extração do DNA plasmidial dos clones transformantes de *E.coli* DH5 α , realizou o seqüenciamento do inserto, e a análise das seqüências foi feita, utilizando o programa "BLAST 2 sequences" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> , onde foi possível constatar a homologia existente entre a seqüência de nucleotídeos da glicoproteína S1 da estirpe M41 do VBI disponível no "GeneBank" sob o número de acesso M21883 com os do inserto nos clones bacterianos. Esse seqüenciamento demonstrou que o ATG encontra-se na fase correta de leitura. O e-value obtido no Blast foi de 0.0, e a porcentagem da semelhança atingiu 99%.

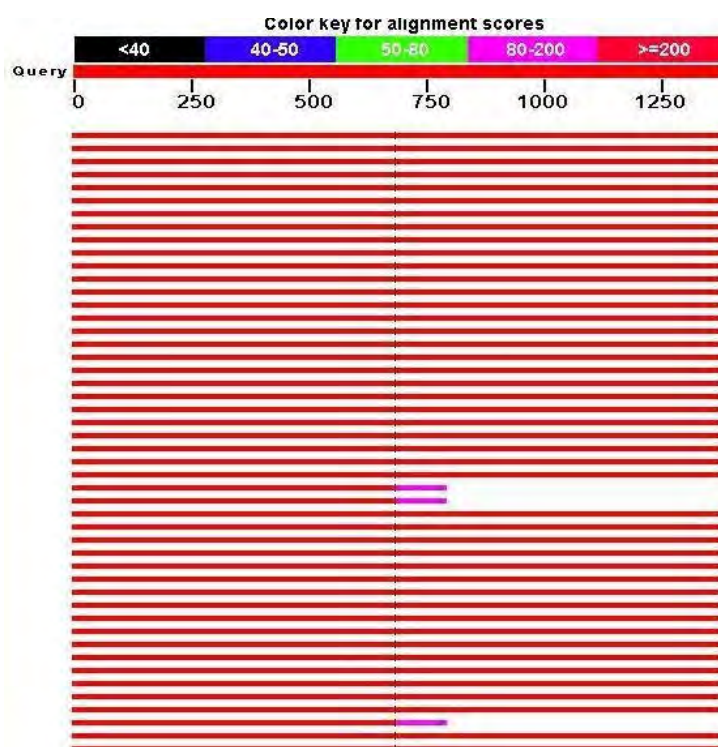


Figura 11. Visualização dos “scores” dos nucleotídeos seqüenciados do clone de *E.coli* obtidos através do BLAST no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

```

Score = 1225 bits (1358), Expect = 0.0
Identities = 683/686 (99%), Gaps = 0/686 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTACTATGTAGTCTGCTTTG 60
Sbjct 1 ATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTACTATGTAGTCTGCTTTG 60

Query 81 TATGACAGTAGTCTTACGTTTACTACCAAGTGCCTTAGACCACCTAATGGTTGG 120
Sbjct 81 TATGACAGTAGTCTTACGTTTACTACCAAGTGCCTTAGACCACCTAATGGTTGG 120

Query 121 CATTTACACGGGGTCTTATGCGGGTAGTAATAATTTCTAGCGAATCTAATAATGAGGC 180
Sbjct 121 CATTTACACGGGGTCTTATGCGGGTAGTAATAATTTCTAGCGAATCTAATAATGAGGC 180

Query 181 TCTTCACC TGGGTATGTTGGTACTATTCATGGTGGTGTGTGTTAAATGCTTCTCT 240
Sbjct 181 TCTTCACC TGGGTATGTTGGTACTATTCATGGTGGTGTGTGTTAAATGCTTCTCT 240

Query 241 ATAGCTATGACGGCACCCGTCATCGAGTATGGCTGGTCTAGCAGTCAAGTTTGTACTGCA 300
Sbjct 241 ATAGCTATGACGGCACCCGTCATCGAGTATGGCTGGTCTAGCAGTCAAGTTTGTACTGCA 300

Query 301 CACTGTAACTTTTCAGATACAGTGTGTTTACACATTTGTAATAATGATGGTGT 360
Sbjct 301 CACTGTAACTTTTCAGATACAGTGTGTTTACACATTTGTAATAATGATGGTGT 360

Query 361 CCTATACTGGCATGCTCAAAAAGATTTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAATGGCCAG 420
Sbjct 361 CCTATACTGGCATGCTCAAAAAGATTTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAATGGCCAG 420

Query 421 CTTTTCTATAATTTAACAGTAAAGTGTACTAGTACCCCTACTTTAAATCAATTCAGTGT 480
Sbjct 421 CTTTTCTATAATTTAACAGTAAAGTGTACTAGTACCCCTACTTTAAATCAATTCAGTGT 480

Query 481 GTAAATAATTTAACACCCGATATTTAAATGGTATCTTTGTACACCTCAATGAGACC 540
Sbjct 481 GTAAATAATTTAACACCCGATATTTAAATGGTATCTTTGTACACCTCAATGAGACC 540

Query 541 ACAGATGTTACATCTGACGTGTTTATTTAAAGCTGGTGGACATATACTTATAAAGTT 600
Sbjct 541 ACAGATGTTACATCTGACGTGTTTATTTAAAGCTGGTGGACATATACTTATAAAGTT 600

Query 601 ATGAGAAAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTAAAGTGTGACAAAGATGTTATTTTC 660
Sbjct 601 ATGAGAAAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTAAAGTGTGACAAAGATGTTATTTTC 660

Query 661 TGTGATGGATCACC TAGAGCTGTT 686
Sbjct 661 TGTGATGGATCACC TAGAGCTGTT 686

Score = 1254 bits (1390), Expect = 0.0
Identities = 696/701 (99%), Gaps = 0/701 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 687 CCAAACCAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTAATTTTCTCTTCTGAGTAGTT 740
Sbjct 879 CCAAACCAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTAATTTTCTCTTCTGAGTAGTT 938

Query 747 YGTTTAAAGGACTCTAAATTTATGATGGATCTTACACCCAGTTGTAATTTAGACT 808
Sbjct 939 TGTTTAAAGGACTCTAAATTTATGATGGATCTTACACCCAGTTGTAATTTAGACT 998

Query 807 AGAACTATTAAATAGGCTTTGGTAAATTTACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCA 866
Sbjct 999 AGAACTATTAAATAGGCTTTGGTAAATTTACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCA 1058

Query 867 TCTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGCTTTACTGGTGGAGCAACTGTTGTATGCTTA 926
Sbjct 1059 TCTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGCTTTACTGGTGGAGCAACTGTTGTATGCTTA 1118

Query 927 TFCATATGGAGTCTTCTGCTGTATAAGGTGTTTATTCAGGTGATGATCTTAATTT 986
Sbjct 1119 TFCATATGGAGTCTTCTGCTGTATAAGGTGTTTATTCAGGTGATGATCTTAATTT 1178

Query 987 TGAATGTGGACTTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGTGGCTCTGTATCAAAACAGCCAC 1046
Sbjct 1179 TGAATGTGGACTTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGTGGCTCTGTATCAAAACAGCCAC 1238

Query 1047 TGAAGCCAGTTTAACTGACACAAATTAATAATKTTACTTTAAATCACTGTGTGA 1106
Sbjct 1239 TGAAGCCAGTTTAACTGACACAAATTAATAATKTTACTTTAAATCACTGTGTGA 1298

Query 1107 TTAATAATATANGCAGAACGCCCCAGGTTTTATTACTAATGTACCCAGCTGCT 1166
Sbjct 1299 TTAATAATATANGCAGAACGCCCCAGGTTTTATTACTAATGTACCCAGCTGCT 1358

Query 1187 TACTTATAATTTCTAGCAGACCCAGTTTGGCTATTTAGATACATCTGGTTCATAGA 1226
Sbjct 1359 TACTTATAATTTCTAGCAGACCCAGTTTGGCTATTTAGATACATCTGGTTCATAGA 1418

Query 1227 CATCTTGTGTACAAAGGTGAATGGTCTTACTTATATANGGTTAACCCTTGCGAAGA 1286
Sbjct 1419 CATCTTGTGTACAAAGGTGAATGGTCTTACTTATATANGGTTAACCCTTGCGAAGA 1478

Query 1287 TGTCAACCAGCTTTGTAGTTCTGGTGGTAAATGATAGGATTTCTTCACTCACGTAA 1346
Sbjct 1479 TGTCAACCAGCTTTGTAGTTCTGGTGGTAAATGATAGGATTTCTTCACTCACGTAA 1538

Query 1347 TGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAAGAACAGTTTACATTA 1387
Sbjct 1539 TGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAAGAACAGTTTACATTA 1579

```

A **B**
Figura 12. Em A e B, nucleotídeos seqüenciados do clone de *E. coli* mostrando homologia com a seqüência obtida no “BLAST”.

5.10. Indução e extração do RNA mensageiro

Uma vez obtido o RNA mensageiro das células transformantes de levedura, foi possível observar-se o primeiro indicio de que a proteína recombinante estaria possivelmente sendo expressa, pois o RNA mensageiro uma vez transformado em cDNA, pela técnica de RT, apresentou um produto amplificado na técnica de PCR com aproximadamente 1580 pb, o que equivale ao tamanho da *orf* do gene S1 da estirpe M41 do VBI, que havia sido clonado no vetor *pYes2.1*. TOPO TA (Figura 11).

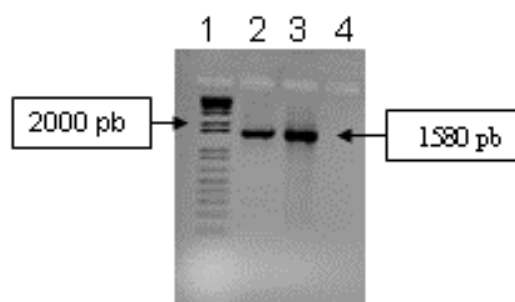


Figura 13 - Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE). Canaleta 1 contém 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). E as canaletas 2 e 3 contém o RNAm dos clones G12 e H12 respectivamente

5.11. Extração e quantificação do extrato protéico total das células de leveduras transformadas pelo vetor *pYes2.1*. TOPO – TA com o inserto do gene S1

Extratos protéicos brutos foram obtidos, nos materiais clarificados após a ruptura das células de levedura dos clones G12 e H12, os quais revelaram pelo método de BRADFORD, concentrações proteicas, respectivamente, de 14,579 ng/ml e 11,566 ng/ml.

5.12. Western Blotting

5.12.1. Indução da expressão e purificação da proteína recombinante S1

A análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de Western-Blotting do extrato bruto da levedura submetida ao processo de indução da expressão com a D-galactose, demonstrou a presença de uma banda com peso molecular estimado em aproximadamente 95 kDa, juntamente com várias outras frações proteicas da própria levedura, tal como já havia sido observado em análise similar sobre a cinética de indução da expressão da proteína recombinante (Figura 14).

Com o objetivo de dirimir dúvidas e de identificar com mais clareza a expressão da proteína S1 recombinante pelas leveduras transformadas, foi examinado na canaleta

4, (Figura 14) um extrato da levedura sem inserto. O anticorpo monoclonal Anti-His6, usado neste método como anticorpo detector, juntamente com o conjugado imunoenzimático de coelho anti-IgG de camundongo com a peroxidase, revelou a presença de proteína recombinante nos extratos de proteína bruta derivados dos clones G12 e H12, enquanto que não houve nenhuma marcação com relação ao extrato preparado com as células de levedura sem o inserto desse mesmo gene (Figura 14).

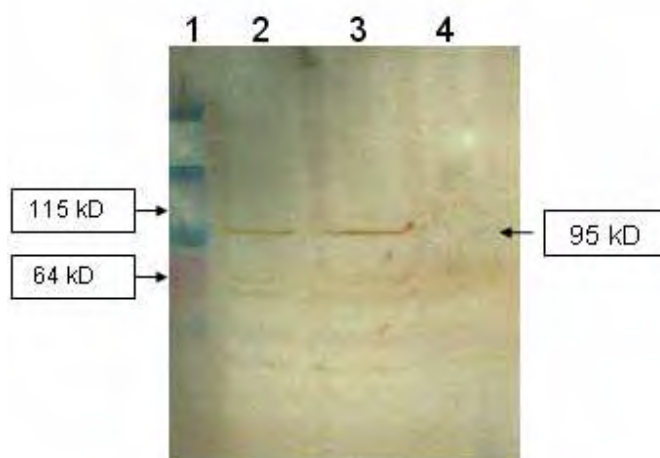


Figura 14. Caracterização por Western Blotting da Proteína S1 recombinante expressa em *S. cerevisiae*. Canaleta 1= BenchMark Invitrogen; Canaleta 2 = Proteína recombinante do clone G12 de *S. cerevisiae*; Canaleta 3= Proteína recombinante do clone G12 de *S. cerevisiae*. O monoclonal Anti-His6 MAb foi usado como detector e conjugado de anti-camundongo IgG - HRP foi usado como enzima para quebrar o substrato DAB-H₂O₂.

Utilizando apenas o clone H12 partiu-se então, para a um protocolo de expressão em média escala a fim de se obter uma massa maior de proteína S1 recombinante das leveduras transformadas, visando uma posterior purificação dessa mesma proteína. Na figura 15 pode-se comparar o extrato bruto (canaleta 3) com a proteína purificada (canaleta 4). Nessa membrana, verificou-se que ainda havia um contaminante sendo eluído em conjunto com a proteína S1 recombinante, o qual era possivelmente derivado de proteínas da própria levedura. Na canaleta 2 há apenas as proteínas da levedura não transformada com a introdução do vetor mais o inserto do gene S1, a qual foi utilizada como controle negativo de expressão do gene de interesse.

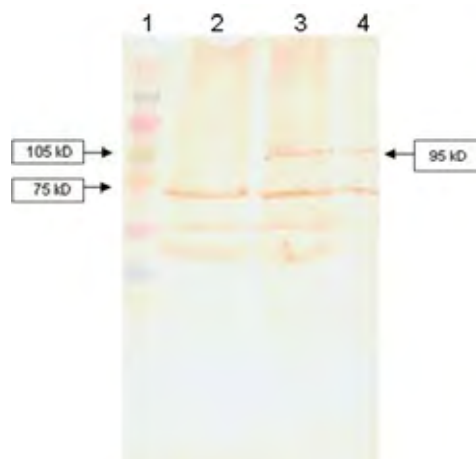


Figura 15. Visualização da membrana de Western Blotting, após revelação. Canaleta 1, contém 20 μ L Marcador de tamanho molecular (Rainbow Molecular Weight Markers GE Healthcare); canaleta 2, levedura sem inserto; canaleta 3, extrato protéico bruto; canaleta 4, extrato protéico purificado. Anticorpos utilizados são provenientes de um pool de soro de galinhas.

Para eliminar esse contaminante, foi necessário fazer algumas modificações no protocolo de purificação especificamente com relação ao tampão de eluição 500 mM de imidazol diluído no tampão fosfato 20 mM e 0.05M de NaCl com pH 7,0. Diferente do usualmente recomendado (Figura 4). Ao final do processo de purificação, a análise do Western-Blotting revelou a presença de uma única banda de proteína com peso molecular de cerca de 95 kDa, que é similar ao tamanho esperado da proteína de fusão S1 contendo a cauda de poli-histidina e com o epítipo V-5.

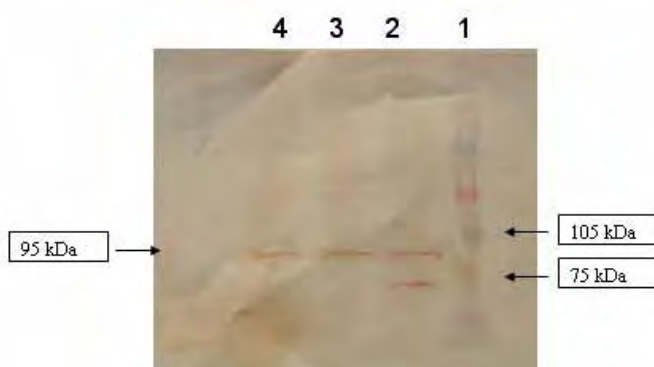


Figura 16. Visualização da membrana de Western Blotting, após revelação. Canaleta 1, contém 20 μ L Marcador de tamanho molecular (Rainbow Molecular Weight Markers GE Healthcare); canaleta 2, proteína recombinante S1 purificada; canaleta 3, purificação do eluato da canaleta 2; canaleta 4, mudança no pH dos tampões de ligação e eluição para pH 7,0. Anticorpos utilizados são provenientes de um pool de soro de galinhas.

Além disso, na técnica de Western-blotting foi verificado que a proteína recombinante S1 purificada foi reconhecida pelo soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe M41 do VBI. Inicialmente, foi feita uma busca de soros positivos entre amostras provenientes de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI, através da técnica de Western Blotting a fim de identificar os que apresentassem uma maior reatividade tanto com a proteína S1 derivada do próprio VBI como da proteína S1 recombinante expressa pelas células de levedura *S. cerevisiae* (Figura 16).

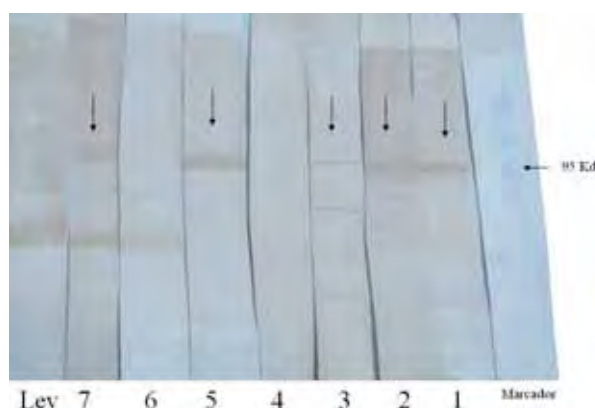


Figura 17 . Membrana de Western, teste de diferentes soros de galinha, anticorpos policlonais, para observar a sua reatividade contra a proteína recombinante de S1. Cada canaleta contém 30 μ L proteína e 30 μ L levedura e 10 μ L Marcador de tamanho molecular (Bench Marck-Invitrogen).

Os resultados evidenciaram que tanto o pool de soros fortemente positivos para o VBI como alguns das amostras de soros analisadas estão efetivamente reagindo com a proteína recombinante S1 (Figura 15). Na canaleta 1 encontra-se o resultado da interação do pool de 11 soros fortemente positivos para o VBI com a proteína recombinante S1 expressa em leveduras, enquanto que nas canaletas 2 a 7 foram testados 6 diferentes amostras de soros de galinha experimentalmente infectadas com o VBI. As setas na figura indicam onde houve reatividade de cada um dos soros

testados com a proteína recombinante S1, com tamanho molecular de aproximadamente 95 kDa. As amostras de soros testadas nas canaletas 4 e 6 não reagiram com a proteína recombinante S1, sendo que apenas revelaram reatividade com proteínas da própria levedura, tal como demonstra a reatividade do pool de soros fortemente positivos para o VBI na canaleta “Lev” a qual contem apenas o extrato das proteínas de leveduras não transformadas com o vetor e o inserto do gene S1.

5.13. Teste de ELISA - (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

5.13.1. Desenvolvimento do ELISA com a proteína S1 do VBI expressa em leveduras (Y-S1-ELISA)

O teste Y-S1-ELISA foi padronizado, colocando-se para reagir várias concentrações da proteína S1 recombinante, previamente adsorvidas às cavidades da microplaca com diferentes diluições; desde 1:50 a 1: 800, dos soros de galinha de referência negativa e positiva contra a estirpe M 41 do VBI. A maior discriminação entre as reações com cada um desses soros de galinhas, foram observadas em concentrações da proteína s1 recombinante de 2 µg/mL e quando as diluições séricas eram correspondentes a 1:25. A capacidade da proteína S1 recombinante em discriminar o soro positivo do negativo foi melhor observada em 2 µg/ml (Figura 18). Uma vez que as amostras de soro de referência positivo e negativo revelaram resultados bem distintos nas diluições de 1:25, passou-se a se usar esta diluição para testar as demais amostras de soro de aves infectadas e re-infectadas com o VBI, bem como as amostras séricas de campo.

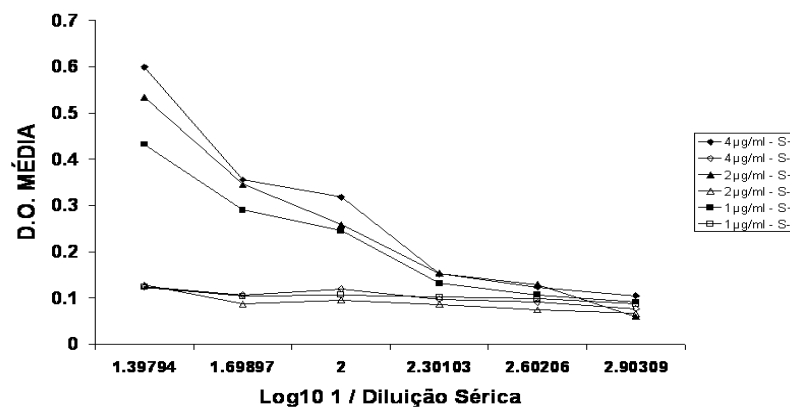


Figura 18. Resultados do método Y-S1-ELISA realizado com diferentes concentrações da proteína recombinante da estirpe M41 do VBI expressa em *S.cerevisiae*, ensaiando-se amostras de soro positivo e soro negativo de galinha, em diluições de 1:25 a 1:800.

5.13.2. Aplicação do teste Y-S1-ELISA para a detecção de anticorpos específicos em aves vacinadas ou não e experimentalmente infectadas

Com relação à aplicação do método indireto de ELISA usando-se a proteína S1 recombinante produzida em leveduras, para a mensuração de anticorpos em galinhas SPF submetidas à infecção e à re-infecção com a estirpe M41 do VBI, verificou-se que os níveis de anticorpos aumentaram de forma acentuada logo após a infecção dessas aves com a estirpe M41 desse vírus (Figura 19-A). A cinética da resposta imune humoral pós-infecção mostrou uma elevação de forma marcante da 2ª (5 dias pós-infecção) para a 3ª colheita (15 dias pós-infecção), atingindo valores de A/P média de 0.50, os quais sofreram, a partir daí, pequenas flutuações, havendo um ligeiro decréscimo deste intervalo de tempo até 30º dia pós-infecção e uma elevação reduzida no 45º dia pós-infecção, ocasião em que as aves foram re-infectadas com essa mesma estirpe viral, o que ocasionou um incremento muito ligeiro dos níveis de anticorpos para valores médios de A/P de aproximadamente 0.70 (Figura 19).

Perfis semelhantes da cinética da resposta imune humoral foram observados no grupo de aves vacinadas com a estirpe H120 do VBI e desafiadas 4 semanas depois

com a estirpe M41 desse mesmo vírus (Figura 19-B). A exceção, nesse caso, é que as magnitudes de respostas detectadas em termos de valores A/P foram maiores do que nas aves após a primo-infecção e re-infectadas, sendo que os níveis sofreram pequenas oscilações mas não apresentaram maiores elevações.

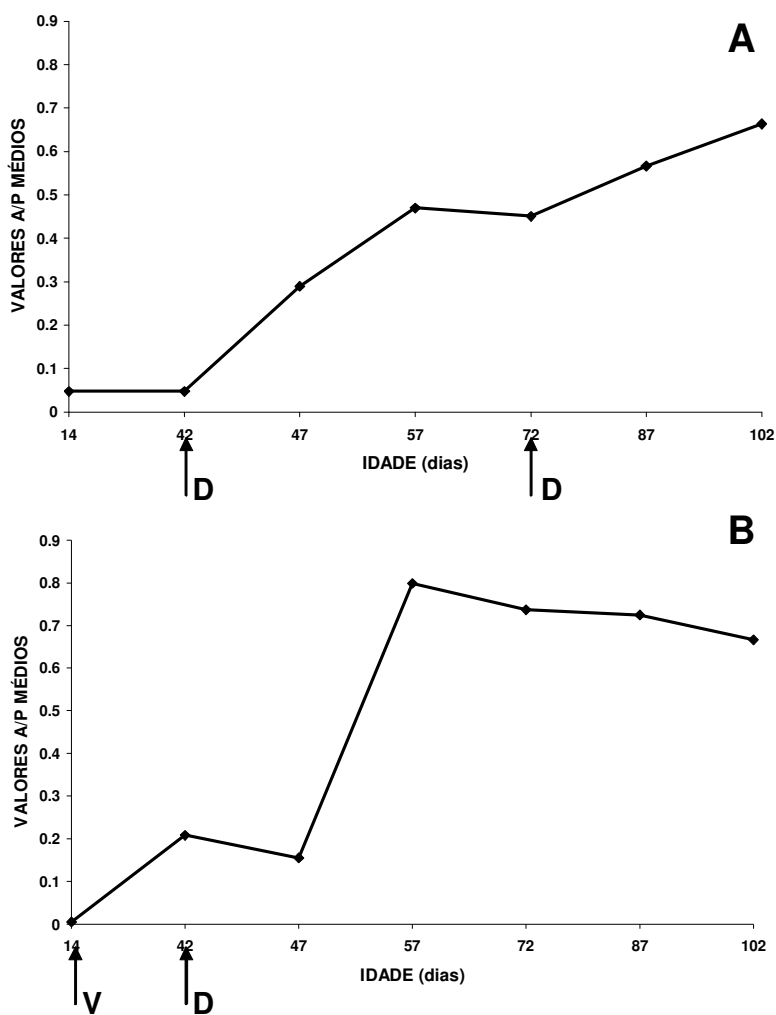


Figura 19. Cinética das respostas de anticorpos em grupo de aves infectadas e re-infectadas com o VBI (A) ou em grupo de aves vacinadas e desafiadas com este mesmo vírus (B) através a técnica de Y-S1-ELISA. Os níveis de anticorpos são expressos como valores A/P médios. As setas indicam os dias do desafio (D) ou da vacinação (V).

5.13.3. Relações entre os resultados do Y-S1-ELISA e do kit comercial de ELISA usados na detecção de anticorpos contra o VBI

A fim de avaliar de forma mais acurada a sensibilidade e a especificidade do novo teste de Y-S1-ELISA, os níveis de anticorpos observados na análise por essa técnica em uma coleção de 104 soros colhidos de aves de campo criadas em granjas onde houve a suspeita clínica da presença de infecção pelo VBI, foram comparados com os resultados observados no kit comercial de ELISA. A sensibilidade relativa do Y-S1-ELISA foi de 87,5%, enquanto que a especificidade foi de 81,25% e a acurácia foi de 84,61%. Um total de 49 amostras séricas foram classificadas como positivas e 39 como negativas, em ambas técnicas de ELISA (Tabela 1). Dezesesseis soros apresentaram resultados discordantes, sendo que 09 amostras foram classificadas como positivas somente pelo Y-S1-ELISA, enquanto que outras 07 amostras foram positivas apenas no kit comercial de ELISA.

Uma boa correlação ($r = 0,819697$) foi observada entre os níveis de anticorpos detectados pelo Y-S1-ELISA e aqueles determinados no kit comercial de ELISA ($P < 0,0001$) na análise de regressão linear feita para comparar a performance desses 2 testes (Figura 21).

Tabela 1. Comparação entre os resultados do kit comercial de ELISA e do Y-S1-ELISA para a detecção de anticorpos contra o VBI presentes no soro de galinhas.

Y-S1-ELISA	KIT COMERCIAL DE ELISA		
	VBI Positivos	VBI Negativos	Total
VBI Positivos	49	09	58
VBI Negativos	07	39	46
Total	56	48	104

*Sensibilidade Relativa = $(49/56) \times 100 = 87,5\%$.

*Especificidade Relativa = $(39/48) \times 100 = 81,25\%$.

*Acurácia = $[(49 + 39) / 104] \times 100 = 84,61\%$

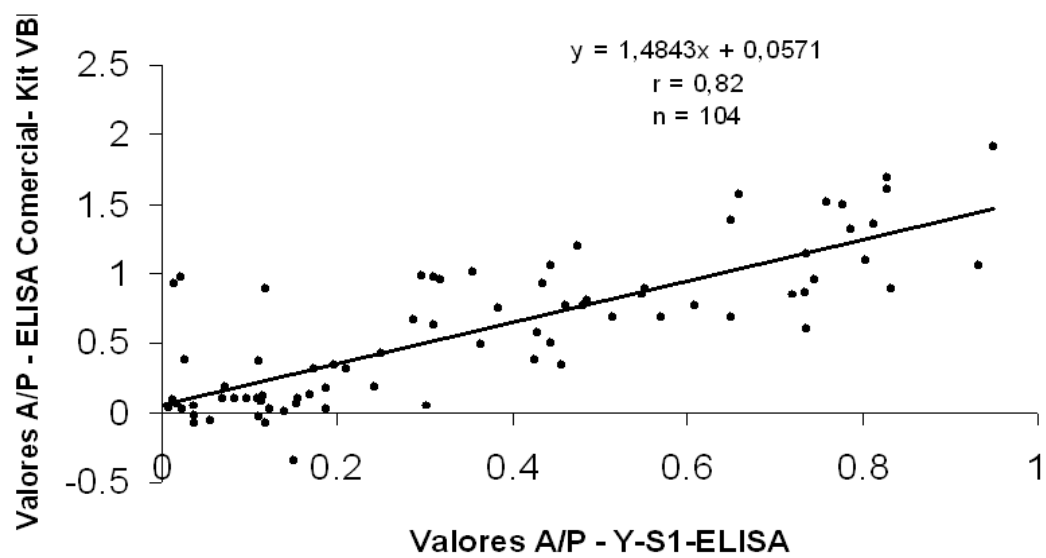


Figura 20. Correlação entre os níveis de anticorpos (valor A/P) obtidos no Y-S1-Elisa e no kit comercial de ELISA para o VBI.

VI. DISCUSSÃO

A emergência de novas doenças gera grande impacto na queda de produtividade animal levando a redução das oportunidades comerciais para todo o setor. Inúmeras doenças infecciosas estão presentes na avicultura e necessitam ser diagnosticadas de forma rápida e precisa para não atrapalhar o desempenho dessa produtividade.

Para então diagnosticá-las há a necessidade de métodos que possuam reagentes que sejam além de rápidos e precisos sejam também de baixo custo e apresentem boa reprodutibilidade em sua utilização.

Um dos problemas encontrados nesses métodos sorológicos é que estes dependem da existência e do preparo de antígenos purificados, encarecendo-o e dependendo de técnicas demoradas e trabalhosas, como a purificação de massa do VBI por meio de inoculação em ovos embrionados SPF seguido de ultra centrifugação em gradiente de sacarose para serem utilizados no preparo dos kits comerciais de ELISA, que são usados na detecção e mensuração de anticorpos contra diversos patógenos virais aviários. Os kits comerciais de ELISA disponíveis no mercado atualmente utilizam partículas integras do vírus (NDIFUNA et. al., 1998).

As técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas de procaríotos e eucariotos são técnicas alternativas para a produção de antígenos isolados e, ainda, podem contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios. Nesse contexto, a literatura mostra possibilidades de uso de sistemas de clonagem e expressão cada um com suas vantagens e desvantagens, e principalmente, apropriados ou não para a expressão de um determinado antígeno viral. Para tanto existem sistemas constituídos por procaríotos, como a *E.coli*, ou por eucariotos, como as leveduras *Saccharomyces spp.*, *Picchia spp.*, acrescentando-se ainda, da possibilidade de serem usados vetores virais como Poxvírus, Baculovírus juntamente com células animais em culturas *in vitro* (CHANG, et.al., 1998). Ainda, foi demonstrado também que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Picchia pastoris* foram utilizadas

na expressão da proteína N desse mesmo vírus (GIBERTONI, 2005; SLIBINSKAS R., et.al. 2004)

Apesar disso, há um número muito pequeno de estudos versando sobre a clonagem e a expressão de glicoproteínas recombinantes, em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, eles vem sendo utilizados uma vez que esses microrganismos não produzem endotoxinas (lipopolissacárides - LPS), sendo, portanto reconhecidos como muito seguros para a produção de alimentos, medicamentos ou imunobiológicos. Estes microrganismos também se mostram imprescindíveis para a produção de proteínas glicosiladas ou de proteínas que necessitem sofrer modificações que dependam por exemplo de clivagens pós-traducionais (KANG, 1988); como é o caso da proteína S1 do VBI.

Com base nas propriedades acima destacadas, utilizou-se nesse trabalho o sistema de expressão constituído pelo vetor pYes TOPO-TA e as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção da glicoproteína S1 da estirpe M41 do VBI, o qual oferece, em adição a isso, a vantagem de possibilitar a purificação dessa proteína em coluna de níquel-sepharose, já que esse vetor possui seqüências codificadoras da cauda de poli-histidina e do epítipo V-5 nas proteínas recombinantes expressas.

O tamanho molecular observado, na análise feita por meio da técnica de PAGE-SDS e de Western-Blotting, para a proteína S1 recombinante produzida em leveduras correspondeu a 95 kDa, o qual está dentro da faixa de variação esperada para a glicoproteína S1 do VBI contendo a cauda adicional de poli-histidina e o epítipo V-5, conforme foi explanado acima. Na verdade, há trinta aminoácidos na cauda de Poli-histidina e do epítipo V-5 que foram adicionados pelas sequências gênicas que codificam tais sequências de aminoácidos junto à extremidade C-terminal da proteína recombinante de fusão S1, acarretando um ligeiro aumento na massa molecular que foi observada e em comparação com a que foi reportada para a proteína viral nativa homóloga do VBI (CAVANAGH, 1997).

Além disso, a técnica de Western-blotting demonstrou um elevado grau de homologia antigênica entre a proteína S1 recombinante produzida em leveduras e a proteína nativa do próprio VBI uma vez que os anticorpos policlonais presentes no soro

de galinhas hiperimunizadas com estirpe M41 do VBI foram capazes de reconhecer a proteína recombinante da mesma forma que interagem com a proteína do VBI.

De posse desses resultados relativos à caracterização imunológica da proteína recombinante S1 expressa em leveduras, foi desenvolvido um teste de Y-S1-ELISA adsorvendo-se na superfície da microplaca diferentes concentrações da glicoproteína S1 recombinante do VBI. Os resultados encontrados demonstram que este teste foi capaz de detectar e de mensurar os níveis de anticorpos específicos contra VBI, presentes nas amostras de soros sanguíneos de aves infectadas com este vírus. Além disso, o teste Y-S1-ELISA foi também capaz de identificar as aves que sofreram infecção, ou que foram vacinadas e depois infectadas, tendo sido caracterizada a variação dos níveis dos anticorpos nos diferentes intervalos de tempo após a vacinação e/ou a infecção.

Além disso, os resultados da cinética das respostas de anticorpos anti-VBI específicos que foram determinados pelo Y-S1-ELISA, em aves infectadas experimentalmente e vacinadas ou não previamente, foram muito similares aos que foram previamente obtidos por IGNJATOVIC e GALLI (1995) através de um método indireto de ELISA realizado com a glicoproteína S1 purificada em colunas de imunoafinidade.

A funcionalidade do teste Y-S1-ELISA foi também avaliada com relação a um grupo representativo de 104 amostras séricas colhidas de aves com suspeita clínica de infecção pelo VBI. O conjunto de resultados revelou que há uma correlação esperada entre esse novo método de ELISA, realizado com a glicoproteína S1 expressa em leveduras e o kit comercial de ELISA, que vem sendo rotineiramente empregado na sorologia do VBI. Em adição a isso, foram observados níveis relativamente elevados de sensibilidade, acurácia e bom nível de especificidade.

Levando em consideração que a glicoproteína S1 é menos imunogênica e apresenta maior reatividade cruzada em relação às diferentes estirpes do VBI do que as demais proteínas estruturais do VBI (S e M) (SNEED et al., 1989, WILLIAMS et al., 1992, SEO et al., 1997, NDIFUNA et al., 1998), os resultados acima observados, devem ser levados em consideração embora o ELISA comercial tenha adsorvido na superfície

das cavidades de suas microplacas uma composição de antígenos do VBI mais completa e complexa, incluindo as 3 proteínas estruturais mais importantes do VBI (S, M e N), provavelmente a proporção e a quantidade de cada uma dessas proteínas sejam diferentes daquela existente e que foi adsorvida na superfície da microplaca em nosso teste de ELISA (Y-S1-ELISA). Este, por seu turno, apresenta, adsorvido à fase sólida, apenas a glicoproteína S1 do VBI.

O kit comercial de ELISA possui adsorvido na superfície das cavidades da microplaca uma composição antigênica mais complexa, a qual inclui as 3 proteínas estruturais principais do VBI (S, N e M). Dessa forma, a quantidade e a proporção de cada uma dessas proteínas são diferentes daquela que está adsorvida na superfície das microplacas do Y-S1-ELISA, que contém somente a proteína recombinante S1. Em adição a isso, estudos prévios relataram que a nucleoproteína do VBI é mais imunogênica e apresenta maior reatividade cruzada entre diferentes estirpes desse vírus (SNEED et al., 1989, IGNJATOVIC e GALLI 1995, SEO et al., 1997) do que a proteína S1 do VBI e tende a reagir com anticorpos produzidos mais precocemente durante uma resposta imune após a infecção pelo VBI tal como foi demonstrado por GIBERTONI et al. (2005). Portanto, todas essas considerações ajudam a entender a razão da ocorrência de resultados diferentes na sensibilidade e na especificidade da técnica de Y-S1-ELISA quando comparada às técnicas de Y-N-ELISA ou dos kits comerciais de ELISA.

Também deve-se levar em conta que para um número considerável de proteínas estruturais virais, as leveduras foram e continuam sendo sistemas de excelência para a expressão de proteínas recombinantes. Algumas razões que tornam atraente as leveduras como sistema de expressão de genes heterólogos devem-se ao fato de que as leveduras são microrganismos unicelulares eucarióticos capazes de fazer o processamento pós-transducional dos polipeptídeos expressos, adicionando-se o fato de que a sua manipulação genética é relativamente mais fácil (ROMANOS et al., 1992, FABER et al., 1995).

Assim, uma vez que as leveduras são eucariotos, seu ambiente intra-celular é mais adequado para que ocorra o correto dobramento, ou formação da estrutura

terciária das proteínas virais (ROMANOS et al., 1992, FABER et al., 1995). Têm sido crescentes os relatos na literatura sobre a produção de estruturas semelhantes a partículas virais (“virus like particles – VLPs) homólogas e heterólogas em leveduras e, ainda, o sistema de expressão em leveduras tem também sido usado para produzir vacinas recombinantes de uso licenciado contra o vírus da hepatite B humana, a qual representa a primeira vacina formulada e que tem sido utilizada, há um longo período de forma bem sucedida, com um antígeno preparado pela engenharia genética (MCMAHON & WAINWRIGHT, 1993).

Da maneira como foi evidenciado no presente estudo, a proteína recombinante S1 expressa em leveduras parece conter a estrutura antigênica original encontrada na glicoproteína S1 do próprio VBI, sendo que tal estrutura inclui os sítios antigênicos mais relevantes, que são críticos na indução de imunidade protetora e, por conseguinte, para o monitoramento dessa mesma imunidade. Além disso, essa proteína S1 recombinante foi expressa em níveis elevados e foi purificada com facilidade. Assim todas essas características tornam então sistema adequado e eficiente para ser usado na obtenção de proteínas virais a serem aplicadas em técnicas sorológicas como o ELISA.

Ficou caracterizado, assim, o grande potencial dessa preparação antigênica recombinante produzida por clonagem e expressão em células de *S. cerevisiae*, ser utilizada, com sucesso, no método indireto de ELISA ou de outros ensaios sorológicos de fase sólida para ser aplicado no sorodiagnóstico da bronquite infecciosa.

VII. CONCLUSÕES

7.1 A estratégia de amplificação a partir do RNA genômico viral por RT-PCR, juntamente com o sistema constituído pelo vetor pYes TOPO – TA e tendo como células hospedeiras a levedura *S. cerevisiae* usado para a clonagem e expressão da proteína S1 da estirpe M41 do VBI provaram ser um método alternativo excelente para a produção da proteína S1 da estirpe M41 do VBI a ser empregada na detecção de anticorpos anti-virais específicos em galinhas infectadas e/ou vacinadas com esse mesmo vírus.

7.2 A proteína recombinante S1 expressa em *S. cerevisiae* apresenta um elevado grau de homologia antigênica com a proteína S1 do próprio VBI;

7.3 O método indireto de ELISA realizado com a proteína recombinante S1 é capaz de detectar e de mensurar de forma específica os níveis de anticorpos específicos contra o VBI, presente nas amostras de soros sanguíneos de aves infectadas ou de aves vacinadas com este vírus, mostrando, assim, sua utilidade para ser aplicado no imunodiagnóstico da infecção por este vírus, ou no monitoramento das respostas imunes pós-vacinais

VIII. BIBLIOGRAFIA

AZAD, A.A. et al. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host – protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, London, v. 9, p. 715-722, 1991.

BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C.B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis, *J.Am.Vet. Med.Assoc.*, Philadelphia, v. 90, p. 51-60, 1937.

BIOEDIT BioEdit Sequence Alingment Editor (versão 7.0.4.1, 1997-2005 Tom Hall).

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteiun using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. Orlando. V. 72, p. 248-254, 1976.

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

CAVANAGH, D. et. al., Induction of humoral neutralizing and haemagglutination inhibiting antibody by spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, Hoghton, v. 13, p 573-583, 1984.

CAVANAGH, D. and NAQI, S.A. Infectious bronchitis Virus. IN B.W. Calnek et al. *Diseases of Poultry*, 10^o ed, 511-26, 1997.

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

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

CHANG, S., et.al Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus Journal of General Virology , 79, 719–723. Printed in Great Britain 1998.

CHEN, C.M. et.al. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containg enriched growth hormone. Life Sci., Elmsford, v. 67, p. 2103-2115,2000.

COOK, JKA., ORBELL, SJ, WOODS, MA, HUGGINS, MB. Veterinary Record 1996; 138: 178-180.

COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. Avian Pathol., Houghton, v. 13, p. 733-741, 1984.

DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVEN, B. & BURGER, A . G. Occurrence and significance of infectious bronchitis variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. Vet. Q., Washington, v.6, p.114-120, 1984.

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA). <http://www.fas.usda.gov>. Consultado em 03/11/04, 08/02/05.

FABER, K.N. et al Review: methylotrophic yeast as factories for the production pf foreign proteins. Yeast, Chichester, v. 11, p 1331-1344, 1995.

FURUYAMA, C., R., A , G., Clonagem e expressão do gene da proteína S do vírus da bronquite infecciosa em levedura.,Jaboticabal, 2005

GENE RUNNER Runner (versão 3.05, Hastings Software, Inc.)

GELB, Jr. J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. Avian Dis., Kennett Square, v. 35, n. 1, p. 82-87, 1991.

GIBERTONI, A, M., Expressao da proteina recombinante de nucleocapsídeo do vírus da bronquite infecciosa em *Saccharomices cerevisiae*.

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

HAKKAART,G. A., et.al. Expression of the house dust mite allergen DER p2 in the baker s yeast *Saccharomices cerevisiae*. Clin. Exp Allergy., Oxford, v.28, p.45-52,1998.

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

HITCHNER, S.B. A virus neutralization screening test: its limitations in classifying field isolates of infectious bronchitis virus. Avian Pathol., v. 2, p. 103-109, 1973.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. Arq. Esc. Vet., Belo Horizonte, v.10, p.131-163, 1957.

IGNJATOVIC, J. e ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using a monoclonal antibody-based ELISA. *Avian Pathol.*, v. 25, p. 721-736, 1996.

IGNJATOVIC e GALLI , Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus . *Avian Pathology* 24, 313-332.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C. R.; NAQI, S. A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Virology*, New York, v. 140, n.2, p. 259-271, 1995.

JOHNSON, M. A. et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine.*, London, v. 20, p. 311(1): 16-27, 2003.

KANG, C. Y., *Ad Virus Res* 35, 177-192, 1988.

KING, D. J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. *Avian Dis.*, Kennet Square, v. 32, p. 362-364, 1988.

KLEPFER, S.R. et al. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Arch. Virol.*, Vienna, v. 128, p.269-286,1993.

KUSTERS, J.G., et.al., Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine*, London, v.8, p.605-608,1990.

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

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

LAY, M.M.M. and CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 4, 81-100, 1997.

LEE, C. W., JACKWOOD, M.W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch. Virol.*, Vienna, v.145, p. 2135-2148, 2000.

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

MCMANHON, B.; WAINWRIGHT, R. Protective efficacy of hepatitis B vaccines in infant's children and adults. In: Ellis, R. (Ed). *Hepatitis B vaccine in clinical practice*. New York: Dekker, 1993 p. 243-261.

MOSCOSO, H., RAYBON, E.O., THAYER, G.S., HOFACRE, C., L., Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper, *Avian Disease*, 49:24-29,2005

NDIFUNA, A. et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially a inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J.Virol.Methods*, Amsterdam, v. 70, p. 37-44, 1998.

NIESTERS, H.G.M., et.al. The peplomer protein sequence of the m41 strain of coronavirus IBV and its comparison with beaudette strains. *Virus Res. Amsterdam*, v.5, p 253-263, 1986.

REED, L.J., MUENCH, A, A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg., Baltimore*, v.27, p 7-193,1938.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.

SCHALK, A.F. and HAWN, M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78, pp. 413–422, 1931.

SEO, H.S., et al. The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of infectious bronchitis virus, nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. *J. Virol.*, Washington, v.75 p.7889-7894, 1997.

SNEED, L. et al. Comparisons of the structural proteins of avian bronchitis virus as determined by Western-Blotting analysis. *Viral Immunol.*, New York, v.2, p. 221-227, 1989

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

SONG, C., S. Et.al. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. *J.Gen. virol.*, Reading, v.79, p.719-723, 1998.

TOMLEY, F. M. et al. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. *J. Gen. Virol.*, Reading, p. 2291-2298, 1987.

TOWBIN, H.T., STAELHETIN.A., GORDON, J. Electroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce abd some applications. *Proc. Nati. Acad. Sci., U.S.A.*, washington, v 76, p. 4350-4354, 1979

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. e GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 22, 4673-4680, 1994.

WALSH, G., *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*. London: Wiley, 1998, p.94-95.

WANG, L. et al. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of IBV. *Virus Res.* 34, 327-38, 1994.

WANG C.H.,HONG C.C., SEAK J.C.H. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using a S1 spike polypeptide. *Veterinary Microbiology* 333-342, 2002.

WILLIAMS, et al. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronavirus. *Virus Res.*, Oxford, v 25, p 213-222,1992.

WEICKERT, M.J., et.al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* Curr. Opin. Biotechnol., London, v.7, p 494-499, 1996.

ZHOU, J.-Y., WU, J.X., CHENG, L.Q., ZHENG, X.J., GONG, H., SHANG, S.B., ZHOU, E.M. Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. J. Virol., 77:9090-9093, 2003.