

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite
infecciosa das galinhas em sistemas procarioto e eucarioto para
utilização em imunodiagnóstico**

Paula Fonseca Finger

Pelotas, 2011

PAULA FONSECA FINGER

**Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das
galinhas em sistemas procarioto e eucarioto para utilização em
imunodiagnóstico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientadora: Silvia de Oliveira Hübner

Co-Orientadores: Fábio Pereira Leivas Leite

Fabricao Rochedo Conceição

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Paulo Augusto Esteves, Embrapa Suínos e Aves

Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner, Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus pais, Nórís e Francisco, pelo amor, preocupação, incentivo e, acima de tudo, por abrirem as portas do meu futuro com o estudo que me proporcionaram e fizeram de mim não apenas uma profissional, mas um verdadeiro ser humano. Amo vocês.

À minha irmã, Alice, pelo apoio, amizade, incentivo, carinho e amor. Obrigada por estar ao meu lado, me confortar e me ajudar sempre que eu precisei.

Ao meu namorado, Henrique, pelo apoio, compreensão, confiança, paciência, carinho e amor que foram fundamentais para eu superar todas as dificuldades encontradas neste período e conquistar esta etapa. Obrigada por me entender e me ajudar nos momentos em que precisei.

À professora Silvia, pela orientação de tantos anos, desde o período da graduação e que, com certeza, fez a diferença para que eu seguisse a linha da pesquisa.

Ao Dr. Paulo Esteves, pela oportunidade que me foi dada desde o estágio curricular até hoje, pela confiança e atenção, sempre me dando o auxílio na área do projeto e sempre acreditando no meu potencial. Esse apoio, juntamente com a equipe da área de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves, foram muito importantes para a minha formação.

Aos meus co-orientadores, Fabricio e Fábio, pela paciência, por acreditarem e confiarem em mim e, principalmente, por me acolherem no laboratório, sem a ajuda de vocês eu não teria vencido mais essa etapa. Muito obrigada de coração.

Aos professores e funcionários do Labvir, Telmo Vidor, Geferson Fischer, Gilberto D'Avila Vargas, Paulo Centeno, José Carlos Sandrini, Eliete Sandrini, e Márcia Rodrigues, pelo convívio, atenção e amizade.

Aos colegas e amigos do Labvir, Clarissa, Débora, Fábio, Patrícia, Gustavo, Daiana, Maureen e Rayra pelo auxílio nas horas de dificuldade, pelos incentivos e otimismo e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia - CDTec, Bilica, Liana, Paula, Renan, Matheus, Alceu e Itauá pela ajuda, disposição e acolhida. Em especial por uma grande amiga e companheira, Michele Pepe, que foi fundamental para minha vitória,

sempre me incentivando e ajudando nos trabalhos diários, incluindo os finais de semana e feriados. Sem tua ajuda esse resultado não teria o mesmo significado.

À doutoranda Luana Dummer, pela disposição, ensinamento em todos os momentos, mesmo quando estava longe.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada – CDTEC pela compreensão e disposição em sempre me auxiliar.

Aos meus amigos, Giseli, Lívia, Adriana, Guilherme, Raissa, Negrinho, Júlio, Joana e Tina que, mesmo sem o convívio diário, sempre estiveram ao meu lado nessa etapa, dando apoio e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!

"O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre."

Waldemar Valle Martins

RESUMO

FINGER, Paula Fonseca. **Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em sistemas procarioto e eucarioto para utilização em imunodiagnóstico.** 2011. 51f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A bronquite infecciosa das galinhas (IB) é uma enfermidade viral altamente contagiosa que causa predominantemente lesões respiratórias que se manifestam clinicamente e invariavelmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares, podendo levar a sinais mais severos, com diminuição na fertilidade e redução da produção de ovos. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) codifica quatro proteínas estruturais importantes: N (proteína do nucleocapsídeo), S (proteína de superfície), E (proteína do envelope) e M (proteína da membrana), sendo a proteína S subdividida em S1 e S2. A subunidade 1 (S1) encontra-se exposta no envelope viral, o que torna-a um importante, ou principal, indutor da produção de anticorpos neutralizantes frente ao IBV, sendo o principal alvo para o sistema imune do hospedeiro. As variações em duas regiões da subunidade S1 do envelope, chamadas regiões hipervariáveis, podem dar origem a novos sorotipos. A capacidade de mutação e recombinação de IBV e a pressão de seleção exercida pelo uso prolongado de vacinas vivas contribuem para o aparecimento de uma grande variedade de sorotipos e subtipos de IBV. O objetivo deste trabalho foi expressar em *Pichia pastoris* o gene que codifica a proteína de superfície S1 da estirpe M41 do IBV e, em *Escherichia coli*, expressar a S1 de um gene sintético elaborado a partir de sequências consenso de amostras de campo nacionais e internacionais, como uma alternativa interessante para a produção de antígeno que possa ser utilizado para monitoramento vacinal das aves e também um antígeno que seja adequado para utilização em diagnóstico sorológico. A clonagem e a expressão da glicoproteína S1 em ambos os sistemas heterólogos de expressão foi realizada com sucesso. O processo de expressão usando *E. coli* foi rápido e simples quando comparado ao uso da *P. pastoris*. A *P. pastoris* foi capaz de expressar a S1 inteira, porém, apresentou dificuldade em secretar a glicoproteína. Os resultados obtidos deverão ser avaliados para uso em *Kit* de imunodiagnóstico para monitoramento da enfermidade na avicultura, sendo de custo mais acessível do que os existentes no mercado.

Palavras chave: Bronquite Infecciosa das galinhas. Glicoproteína S1. Proteína recombinante. *Pichia pastoris*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

FINGER, Paula Fonseca. **Expression of the S1 glycoprotein of chickens' infectious bronchitis virus in prokaryote and eukaryote systems for use in immunodiagnostic.** 2011. 51f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The chickens' infectious bronchitis (IB) is a highly contagious viral disease which causes predominantly respiratory lesions manifested clinically and invariably by sneezing and tracheo-bronchial rales, which may lead to more severe signs, with a decrease in fertility and reduction of eggs production. The infectious bronchitis virus (IBV) encodes four major structural proteins: N (nucleocapsid protein), S (spike protein), E (envelope protein) and M (membrane protein) – being the S protein is cleaved into S1 and S2. The 1 subunit (S1) is found exposed in the viral envelope, which makes it an important or main inducer of neutralizing antibodies against the IBV, the main target for the host's immune system. The variations in two regions of the envelope's S1 subunit, called hypervariables regions, may originate to new serotypes. The IBV's mutation and recombination capacity and the selection pressure exerted by the prolonged use of live vaccines contribute to the appearance of a wide variety of serotypes and subtypes of IBV. The objective of this study was to express, in *Pichia pastoris*, the gene that encodes the surface protein S1 of IBV strain M41 and, in *Escherichia coli*, to express the S1 of the synthetic gene designed from consensus sequences of national and international field samples, as an interesting alternative for the production of antigen that can be used for monitoring vaccination of birds and also an antigen that is suitable for the use in serological diagnostic. The cloning and expression of glycoprotein S1 in both heterologous expression systems was successfully performed. The process of expression using *E. coli* was simple and quick when compared to the use of *P. pastoris*. The *P. pastoris* was able to express the entire S1; however, it showed difficulty in secreting the glycoprotein. The results will be evaluated for use in immunodiagnostic *kit* for monitoring the disease in poultry, being more affordable than the ones existing currently.

Key-words: Infectious bronchitis of chickens. S1 glycoprotein. Recombinant protein. *Pichia pastoris*. *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amplificação do fragmento de 1540 pb correspondente à glicoproteína S1. Esquema representativo do genoma completo do IBV	39
Figura 2	Dot Blotting da indução em meio líquido BMMY do clone de S1 com diferentes dias de indução.	39
Figura 3	Dot blotting da lise celular do cultivo em biorreator.	40
Figura 4	Dot blotting para caracterização da glicoproteína S1 recombinante frente a diluições (1:50 e 1:100) de soros de aves imunizadas com a cepa M41 de IBV.	40
Figura 5	Clones recombinantes de <i>E. coli</i> em vetor pAE.....	41
Figura 6	Western Blotting da indução de expressão dos clones de <i>E. coli</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOX - Álcool Oxidase

BMGY - Meio para crescimento de levedura com glicerol

BMMY - Meio para indução da levedura com metanol

cDNA - DNA complementar

Dntp - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FAO - Organização para a Agricultura e Alimentação

IB - Bronquite infecciosa

IBV - Vírus da bronquite infecciosa

Kb – Kilobases

KDa – Kilodaltons

LCA - Líquido córioalantoide

LT - Laringotraqueíte infecciosa

Mut^s - Utilização lenta do metanol

Mut⁺ - Utilização rápida do metanol

M41 - cepa Massachussets

OIE - Organização mundial da saúde animal

OMS - Organização mundial da saúde

PBS-T - Solução salina tamponada com fosfatos contendo 0,05% de Tween
20

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pmol – picomoles

RT - Transcriptase reversa

SARS - Síndrome respiratória severa aguda

YPD - *Yeast Extract Peptone Dextrose*

SPF - *Specific Pathogen Free*

SUMÁRIO

1. Introdução geral	12
1.1 A avicultura no Brasil	12
1.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas	13
1.3 Sistemas de expressão de proteínas heterólogas	18
1.3.1 Pichia pastoris	18
1.3.2 Escherichia coli.....	20
1.4 Expressão de proteínas em P. Pastoris e E.Coli	21
2. Artigo	23
1. Resumo	25
2. Introdução.....	25
3. Materiais e Métodos	28
3.1 Pichia pastoris	28
3.1.1 Propagação viral e preparação do RNA	28
3.1.2 Amplificação do gene S1 por RT-PCR	28
3.1.3 Clonagem do gene da glicoproteína S1	29
3.1.4 Sequenciamento do DNA	29
3.1.5 Transformação de Pichia pastoris	30
3.1.6 Colony blotting.....	30
3.1.7 Expressão da S1 em Pichia pastoris	31
3.1.8 Dot blotting	32
3.2 Escherichia coli.....	32
3.2.1 Construção do gene da glicoproteína S1.....	32
3.2.2 Clonagem do gene sintético da glicoproteína S1.....	32
3.2.3 Expressão em E. coli.....	33

3.2.4 Purificação da S1 recombinante	33
4. Resultados.....	34
4.1 Pichia pastoris	34
4.1.1 Construção do vetor de expressão e transformação de P. pastoris	34
4.1.2 Expressão da S1 em agitador orbital e biorreator.....	35
4.1.3 Caracterização da glicoproteína S1	35
4.2 Escherichia coli.....	35
4.2.1 Construção do vetor de expressão e transformação de E. coli	35
4.2.2 Expressão da S1 em Escherichia coli.....	36
5. Discussão	36
7. Referências	42
3. Conclusão.....	45
4. Referências Gerais	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A avicultura no Brasil

Até a década de 1960, a avicultura brasileira não tinha grande importância econômica, sendo a produção de carne de frango realizada de forma artesanal. Em meados dos anos 60 houve a grande ruptura desse quadro onde, no Estado de São Paulo, foi dado o primeiro passo para uma avicultura nacional moderna, com a implantação de um modelo de produção baseado em grandes produtores independentes e autônomos em relação à indústria e com o uso de mão-de-obra assalariada. Mais tarde, nos anos 70, a partir da instalação do modelo de integração no sudoeste catarinense, a avicultura brasileira deu seu grande salto, expandindo o setor através da introdução de um pacote tecnológico que envolveu o controle pela indústria do ciclo produtivo das aves, gerando crescimentos sucessivos da produtividade (TAVARES, L. P. e RIBEIRO, K. C. de S.; 2007).

O controle de todo o processo produtivo (criação das matrizes, a incubação dos ovos, a produção da ração, até o abate e a comercialização) passou a ser comandado por grandes empresas, mantendo-se apenas a fase de engorda do frango sob atribuição de pequenos e médios produtores, ainda que submetidos à indústria por meio de contratos, formais ou não, e sob suas recomendações técnicas e organizacionais (TAKAGI *et al.*, 2002). Esse sistema de integração estendeu-se, com o passar do tempo, para os Estados do Rio Grande do Sul e Paraná e, posteriormente, para São Paulo e Minas Gerais.

A avicultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e também o que mais cresceu nos últimos anos. O Brasil tem conquistado um espaço significativo na produção mundial, aumentou cerca de 1000% entre os anos de 1961 a 2003, passando de 1,4% para 10,5% da produção mundial de carne de frango. Coube ao país o aumento de mais de 66,8 milhões de toneladas na produção mundial dentro desse período, 7,8 milhões de toneladas, ou seja, 11,7% do acréscimo mundial na produção (GIROTTO, 2004).

Atualmente o Brasil é o 3º maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos EUA e da China. Em 2010, o Brasil produziu 12,3 milhões de toneladas e a expectativa para 2011 é de uma produção de aproximadamente 13 milhões de toneladas, ou seja, obtendo um incremento de 5% na comparação com o último ano. No ano de 1996, a produção brasileira era de 4 milhões de toneladas, enquanto que a produção dos EUA, hoje em 16,5 milhões de toneladas, àquela época já se aproximava de 12 milhões de toneladas. As exportações brasileiras de ovos somaram 27.721 toneladas em 2010, correspondente a uma receita cambial de US\$ 41 milhões (UBABEF). Esses dados caracterizam a grande evolução da avicultura brasileira, com um crescimento em termos de volume de aproximadamente 225% nestes últimos 15 anos, enquanto que os estadunidenses viram sua produção crescer apenas 37%.

Por se tratar de um amplo mercado em expansão, a avicultura vem crescendo também em âmbito de tecnologias, com o surgimento de novos fármacos e vacinas desenvolvidos com o objetivo de evitar a disseminação de enfermidades entre os animais alojados. Dentre as doenças que acometem as aves e causam grandes prejuízos econômicos aos produtores, está a bronquite infecciosa das galinhas, uma doença de curso agudo, altamente contagiosa que leva a maior susceptibilidade a infecções secundárias, e resulta, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou aves reprodutoras.

1.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas

A bronquite infecciosa das galinhas (IB) é causada por um vírus que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, podendo ser definida como uma enfermidade viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete as galinhas causando predominantemente lesões respiratórias manifestadas clinicamente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares e, às vezes, na dependência da estirpe ou patotipo viral, podem ser induzidas conjuntivite, sinusite, nefrite, nefrose, epididimite e endometrite, com sinais clínicos como “cabeça inchada”, uremia e redução da fertilidade e da produção de ovos (CAVANAGH, 2007).

Galinhas infectadas com o vírus da bronquite infecciosa (IBV) desenvolvem doenças respiratórias, nefrite e doenças reprodutivas, resultando na redução da produção e qualidade dos ovos (ARIYOSHI *et al.*, 2010).

A doença foi descrita pela primeira vez nos EUA, em 1931, por Schalk & Hawn e, dois anos após, Bushnell & Brandly notificaram uma doença idêntica, mas diagnosticaram-na como laringotraqueíte infecciosa (LT). Em 1936, Beach & Schalm provaram, por meio de estudos de imunidade cruzada, que o agente da IB era um vírus diferente do vírus da LT e denominaram-no de vírus da bronquite infecciosa (IBV). No início da década de 1960, a IB já havia sido notificada em quase todo o mundo (MUNEER *et al.*, 1988).

A bronquite infecciosa das galinhas está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) e OMS (Organização Mundial de Saúde) como doença transmissível de notificação anual, devido à importância socioeconômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão a qualquer momento no comércio internacional de produtos e animais.

Trata-se de um vírus primariamente epiteliotrópico, replicando-se nas células epiteliais, nas células secretoras de muco e nas células dos pulmões e dos sacos aéreos. Durante a replicação, o vírus causa estase dos cílios traqueais, tanto “*in vivo*”, quanto “*in vitro*”, e esse parâmetro tem sido utilizado para inferir sobre a severidade da infecção no trato respiratório (MENDONÇA *et al.*, 2009). A replicação do vírus nos tecidos do trato respiratório causa sinais característicos (mas não patognomônicos) da infecção, como: dificuldades para respirar, tosse e descarga nasal. Aves infectadas apresentam diminuição do desempenho e, conseqüentemente, perda de peso e refugagem. Infecções bacterianas secundárias a infecção viral causam grandes perdas econômicas por condenação de carcaças devido à aerossaculite (CAVANAGH, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2009).

O gênero *Coronaviridae* é dividido em três grupos de acordo com suas características genéticas e antigênicas, sendo o vírus da Bronquite infecciosa pertencente ao grupo 3 (MCKINLEY *et al.*, 2008). O genoma deste vírus é composto por RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento (BOURSNELL *et al.*, 1987). O genoma viral é organizado em seis

regiões, cada qual contendo uma ou mais regiões abertas de leitura (ORF), sendo separadas por sequências intergênicas (IG) que contém a sinalização para transcrição de mRNA subgenômicos (BOURSNELL *et al.*, 1987; JACKWOOD *et al.*, 2001). O genoma codifica quatro proteínas estruturais importantes. A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, já as demais proteínas, de superfície (S), proteína de membrana (M) e a do envelope (E), estão inseridas no envelope que circunda o nucleocapsídeo (MCKINLEY *et al.*, 2008). A proteína de superfície (S) se divide em duas subunidades, S1 e S2. A S1 é responsável pela infectividade viral e possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Essa proteína possui um papel crucial em dois processos muito relevantes para a indústria avícola. Primeiramente, tal proteína é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo IBV, sendo por isto de fundamental importância na imunoprofilaxia. Em segundo lugar, ela é a base dos testes de diagnósticos que têm sido utilizados para identificar e caracterizar diferenças entre cepas virais (KEELER *et al.*, 1998; COOK *et al.*, 1997). Variações antigênicas descritas entre diferentes isolados do IBV são devidas a mutações no gene da proteína S1, o que pode resultar na existência de diversos sorotipos, com pouca proteção cruzada entre eles (CAVANAGH, 2007).

A proteína S possui uma massa molecular de aproximadamente 180 KDa (CAVANAGH, 1983a) e, provavelmente, trata-se de um trímero (WU *et al.*, 2009) que apresenta duas funções conhecidas: possibilitar que o IBV ligue-se aos receptores celulares das células-alvo e viabilizar a fusão entre as membranas viral e celular visando a liberação do material genético viral no citoplasma celular (CAVANAGH, 1983b; 2007). Assim como em outros coronavírus, a proteína S do IBV sofre clivagem proteolítica translacional ocorrendo, dessa forma, uma modificação estrutural originando duas subunidades, uma amino (S1) e outra carboxi-terminal (S2), com 92 e 84 KDa respectivamente (CAVANAGH *et al.*, 1983a). A subunidade 2 (S2) compreende cerca de 600 aminoácidos, possuindo importante atividade no ancoramento da proteína S no envelope viral e também atuando na etapa de fusão entre as membranas viral e celular. Assim, após ligar-se ao receptor celular, estima-se que essa subunidade, através de um movimento de rotação de suas três cadeias em forma de espiral (resultante de uma modificação em sua estrutura devido a uma mudança de pH), acabe

sendo a causa da ruptura e conseqüente fusão entre tais membranas (BOSCH *et al.*, 2003).

Com relação à subunidade 1, formada por cerca de 500 aminoácidos, sugere-se que tenha uma conformação em forma de bulbo, atue diretamente no reconhecimento dos receptores celulares (através de regiões denominadas *Receptor Binding Dominium – RDB* e *Receptor Binding Motif – RBM*) e, como encontra-se exposta no envelope viral, seja um importante, ou mesmo o principal indutor da produção de anticorpos neutralizantes frente ao IBV, sendo, conseqüentemente, o principal alvo para o sistema imune do hospedeiro (CAVANAGH, 1983; 2007). Acredita-se que a S1 seja importante na definição da patogenia causada pelo vírus. Importante salientar, também, que a S1 contém três regiões hipervariáveis (HVR) apresentando importantes epítomos antigênicos principalmente dentro de tais regiões que podem definir as cepas virais dentro de específicos sorotipos de IBV (WANG e HUANG, 2000).

A proteína N é formada por 409 aminoácidos com uma massa molecular predita de cerca de 50 KDa (MACNAUGHTON *et al.*, 1977; BOURSNEILL *et al.*, 1985). Usualmente, tal proteína apresenta alta homologia entre as diferentes cepas de IBV ($91\pm 96,5\%$), sendo uma proteína bastante imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (WILLIAMS *et al.*, 1992).

Técnicas moleculares têm sido extensivamente aplicadas no estudo de amostras brasileiras do IBV. Em estudo realizado por Miyaji (1996), é relatado que até 1989 o IBV circulante no país era essencialmente a cepa Massachussets (M41) em um universo de mais de 20 diferentes sorotipos reconhecidos, definidos de acordo com os epítomos presentes na porção externa da glicoproteína S do envelope. No entanto, como apontam estudos realizados envolvendo principalmente o sequenciamento dos genes S1 e S2, há grande diversidade de IBVs no Brasil desde que as primeiras cepas foram isoladas, e antes mesmo da vacina ser introduzida (CUBILLOS *et al.*, 1991).

A maioria dos pesquisadores concorda que a incidência de cepas de IBV diferentes da M41 tem aumentado, incluindo os genótipos brasileiros, diferentes dos descritos em outros países (ABREU *et al.*, 2006-2008; CHACÓN *et al.*, 2007, 2008; D'ARCE *et al.*, 2008; DI FABIO *et al.*, 2000; MONTASSIER *et al.*, 2006; VILLARREAL *et al.*, 2006-2007). Um estudo recente feito por Sandri *et al.* (2008),

mostrou que o sorotipo M41 está presente em apenas 8% das 75 amostras de IBV estudadas no Brasil.

O controle da IB é realizado através da imunização das aves, vacinação que já vem sendo praticada há mais de meio século. A prevenção é feita tanto com vacinas inativadas quanto vivas, ambas elaboradas a partir da cepa Massachussets. As vacinas vivas são atenuadas através de passagem em ovos embrionados e, geralmente, são aplicadas em frangos de corte com um dia de idade, no incubatório. Já as vacinas inativadas, que foram produzidas na intenção de prevenir a queda de postura das aves, são utilizadas após as vacinas vivas, sendo aplicadas até que as aves comecem a postura (CAVANAGH, 2007).

A principal preocupação das pessoas que trabalham no campo com IB no Brasil é de que vacinas vivas e inativadas da cepa M41, independente do programa de vacinação ou da combinação de vacinas utilizadas, não estejam conferindo a proteção necessária devido à ocorrência de cepas variantes.

Surtos de bronquite infecciosa das galinhas em plantéis avícolas brasileiros, até pouco tempo atrás, eram ditos como causa de infecção pelo sorotipo 4/91, sintomas nos quais eram caracterizados por sinais renais e respiratórios severos e, em alguns casos, associados a alterações na musculatura peitoral superficial e profunda (SILVA, 2010). Porém, em estudo realizado por Brentano *et al.* (2006), no qual foram analisadas três amostras isoladas de aves com sintomatologia de apatia, problemas respiratórios e renais, aumento de mortalidade, queda na produção e lesões na musculatura do peito, demonstraram, após análise filogenética, que nenhuma das amostras se agrupava com a amostra 4/91. Inclusive, duas das amostras analisadas estavam relacionadas com amostras nefropatogênicas.

Estudo realizado por Trevisol *et al.* (2010) analisou duas amostras de campo classificadas como variantes da cepa Massachussets, para as quais a vacina comercial foi capaz de induzir proteção. Esses dados demonstram a importância da classificação de novas amostras em imunotipos (protectotipos) para uma melhor estratégia de controle dessa enfermidade.

Há evidências de que a IB ocorra em todo o país, e os últimos surtos registrados foram no ano de 2007. Quatro deles ocorreram no Estado da Bahia, um no Estado de Pernambuco e um no Estado de Santa Catarina (OIE). O IBV também já foi

isolado em São Paulo, no Paraná, no Rio de Janeiro, em Rondônia (DI FABIO *et al.*, 2000), em Minas Gerais (ABREU *et al.*, 2006) e no Distrito Federal (OIE). Isto é um indicativo de que os sorotipos vacinais autorizados atualmente não conferem proteção cruzada contra os vírus circulantes no Brasil (GELB *et al.*, 2005).

Com relação ao diagnóstico laboratorial verifica-se que o mesmo depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e a identificação genômica ou fenotípica (sorotipos, protectotipos e patotipos) do vírus, e/ou de métodos indiretos, destinados à detecção de anticorpos específicos. Normalmente os métodos indiretos são realizados a partir de Kits comerciais de ELISA, os quais são importados e apresentam um custo muito elevado para a sua utilização com frequência. Ademais, deve ser considerado que o diagnóstico rápido e a determinação do estado de imunidade de um plantel de aves são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da IB. Para tanto, foi comprovado que os ensaios imunoenzimáticos quando realizados com padrões apropriados, indicam com elevada acurácia as concentrações de anticorpos específicos contra IBV e podem facilitar o monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (SNYDER *et al.*, 1983).

Em vista disso, sabe-se da necessidade de um bom antígeno para utilização em ELISA com o qual seja possível realizar um monitoramento vacinal das aves. Para isso, é de grande valia a produção de S1 da cepa Massachussetts, uma vez que é a única cepa liberada para vacinação no Brasil. Por outro lado, também há necessidade de um antígeno que englobe as diversas variações da glicoproteína S1, abordando tanto cepas de campo como a cepa vacinal para que se consiga um diagnóstico sorológico eficaz das aves acometidas ou não com a doença.

1.3 Sistemas de expressão de proteínas heterólogas

1.3.1 *Pichia pastoris*

O uso da levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, como hospedeiro celular para expressão de proteínas recombinantes tem se tornado cada vez mais popular nos últimos anos. *P. pastoris* é mais fácil de ser cultivada e manipulada geneticamente do

que células de mamíferos e pode ser cultivada para obter altas densidades celulares. Sistemas de expressão baseados em leveduras são eficientes e econômicos comparados com fontes bacterianas ou mamíferas.

Essa levedura é capaz de processar a maioria das modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e glicosilação, conservando características antigênicas das proteínas originais, o que facilita sua aplicação em ensaios diagnósticos e em vacinas de subunidade. (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A *P. pastoris* tem a grande característica de crescer através do cultivo com a utilização do metanol, utilizando-o como fonte única de carbono, podendo essa rota ser totalmente reprimida pela adição de glicerol. Essa rota metabólica da utilização específica do metanol envolve várias enzimas. A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua oxidação pela AOX, resultando na formação de formaldeído e peróxido de hidrogênio, o qual é enviado para os peroxissomos para evitar a toxicidade. Por ter pouca afinidade com O₂, a AOX é gerada em grandes quantidades pela célula, como forma de compensação (CREGG *et al.*, 1985).

Existem dois genes que codificam para a enzima álcool oxidase na *P. pastoris*: AOX1 e AOX2, sendo o AOX1 responsável pela maioria da atividade da enzima na célula. A presença do metanol é essencial para a indução de altos níveis celulares (TSCHOPP *et. al*, 1987).

Existem três fenótipos de cepas de *P. pastoris* com relação à utilização de metanol: Mut⁺, Mut^s e Mut⁻ (CEREGHINO e CREGG, 2000). O Mut⁺, ou fenótipo de maior utilização de metanol, são cepas do tipo selvagens e crescem com altas taxas de metanol em grandes escalas de fermentação. O Mut^s, ou fenótipo de utilização lenta do metanol, tem uma ruptura no gene AOX1, devendo as células então contar com o gene mais fraco, AOX2, para o metabolismo do metanol, um crescimento mais lento e uma menor utilização do metanol. O fenótipo Mut⁻, ou de utilização mínima de metanol, é incapaz de crescer na presença do metanol, uma vez que essas cepas têm os dois genes AOX excluídos. Cepas como a KM71H, devido à utilização lenta de metanol, são melhores produtoras de algumas proteínas recombinantes que aquelas com fenótipo selvagem, além de não necessitarem de grandes quantidades de metanol em produções de larga escala (CREGG *et al.*, 1985; CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

Comercialmente, existem vários vetores para expressão em *P. pastoris* que podem ser utilizados para inúmeras proteínas, eles possuem as características de exercer forte repressão sobre os genes AOX e ter facilidade de induzi-los, obtendo-se, assim, altas densidades celulares sem que a proteína heteróloga, a qual pode ser tóxica, seja expressa (GELLISSEN, 2000). Dentro do vetor de expressão o direcionamento do DNA exógeno é feito normalmente aos genes *AOX1* e/ou *HIS4* - Histidinol Dehidrogenase, que participa da biossíntese de histidina (CREGG *et al.*, 1985). A presença, no vetor, de uma seqüência compartilhada com o genoma estimula os eventos de recombinação homóloga. Em vetores comercializados pela Invitrogen (INVITROGEN, 2005) como o pPICZ α B, há uma sequência 5' do promotor *AOX1* e uma seqüência 3' necessária para conduzir o término da transcrição, incluindo, entre as seqüências promotoras e terminadoras, um sítio de múltipla clonagem para a inserção do gene heterólogo.

Para que as proteínas sejam secretadas no meio, o vetor pPICZ α B possui a seqüência sinal do -Mating Factor (-MF) de *Saccharomyces cerevisiae* fusionada e para a manutenção e replicação do plasmídio em *E. coli*, há uma origem de replicação de procaríotos, onde a seleção é realizada através do gene de resistência ao antibiótico Zeocina. A detecção da proteína recombinante bem como a purificação mediante cromatografia de afinidade pode ser realizada pela adição de uma cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A grande vantagem de utilizar a *P. pastoris* como sistema de expressão é a realização de modificações pós-traducionais de proteínas. Além do processamento do peptídeo sinal, a formação de pontes dissulfídicas e a adição de certos lipídios, realizam tanto a N- quanto a O- glicosilação de proteínas (DALY; HEARN, 2005). Ademais, uma outra grande vantagem é que esses microrganismos não produzem endotoxinas (lipopolissacárides - LPS), sendo, portanto reconhecidos como microrganismos seguros para a produção de alimentos, medicamentos ou imunobiológicos.

1.3.2 *Escherichia coli*

As bactérias, principalmente a *Escherichia coli*, são hospedeiras mais comumente utilizadas para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto processamento de proteínas a serem expressas (SUDBERY, 1996; CREGG, 1999).

A *E. coli* é o micro-organismo mais bem estudado e explorado na atualidade. O profundo conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética.

Diversas proteínas de interesse terapêutico, como a insulina, hormônio do crescimento humano, entre outros, são produzidas em *E. coli*, obtendo-se altos níveis de expressão (WALSH, 1998). Isto se deve ao fato de essas bactérias serem de fácil manipulação, crescerem rapidamente e exigirem meios relativamente simples, assim como os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos. Apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *E. coli* têm apresentado grande êxito ao serem utilizadas em testes sorológicos (GONÇALVES *et al.*, 2010).

1.4 Expressão de proteínas em *P. Pastoris* e *E.Coli*

Muitas são as proteínas que já foram expressas tanto em sistema procarioto como em sistema eucarioto. Com o que diz respeito à Bronquite Infecciosa, podemos relatar a expressão bem sucedida da proteína N em *E. coli* e uma expressão não muito satisfatória na levedura *Pichia pastoris* (GIBERTONI *et al.*, 2010). Trabalhos vêm sendo desenvolvidos com expressão da proteína S1 em *P. pastoris* (GONÇALVES *et al.*, 2010; ASADPOUR *et al.*, 2010), porém ainda não obteve-se uma proteína satisfatória para ser utilizada como antígeno em diagnóstico de IBV.

Se, por um lado, os sistemas procariotos são detentores de inúmeras vantagens, com destaque para a uma maior simplicidade e grande capacidade de produção de proteínas heterólogas, tais sistemas podem não funcionar apropriadamente, especialmente quando a proteína requer modificações pós-traducionais. Nessas circunstâncias, os sistemas eucariotos de expressão passam a ser mais vantajosos por possuírem mecanismos intracelulares e vias biossintéticas

para efetuar as modificações pós-traducionais, que existem em sistemas de expressão em eucariotos, tais como: glicosilação, formação de pontes dissulfeto e possíveis processamentos proteolíticos pós-traducionais, os quais podem ser realizados em leveduras (TRIMBLE *et al.*, 1991).

Porém, em muitos casos, as proteínas produzidas em *E. coli* são mais facilmente recuperadas, uma vez que os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos e apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *E. coli* tem apresentado grande êxito ao serem utilizadas em testes sorológicos (NDIFUNA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2003; WOO, *et al.*, 2005, LUGOVSKAYA *et al.*, 2006).

A ausência de *Kits* nacionais de ELISA e a existência de surtos de Bronquite Infecciosa nas aves no Brasil, provavelmente decorrentes de variações no gene da glicoproteína S1, como já foi discutido anteriormente, faz com que seja viável a procura por antígenos que possam ser utilizados para monitoramento vacinal e diagnóstico sorológico. A escolha por sistemas procaríoto e eucarioto de expressão deve-se à possibilidade de fazer uma comparação do melhor antígeno produzido, podendo-se relacionar com o custo benefício da sua produção.

Até o presente momento não existem *Kits* comerciais nacionais de ELISA para a detecção de anticorpos contra o IBV, mesmo que já tenha sido realizada a expressão de proteínas do vírus, como descrito por Gibertoni *et al.* (2010). Portanto se torna necessário averiguar se a glicoproteína S1 expressa em sistemas heterólogos possuirá epítomos antigênicos reconhecidos pelos soros de animais vacinados, visando à utilização desta como um antígeno disponível para testes de imunodiagnóstico.

Desta forma, foram definidos alguns objetivos para o presente trabalho: clonagem do gene da S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em vetor de expressão em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* e expressão do gene em *P. pastoris* cepa KM71H e em *E. coli* cepa pLYSS.

Os resultados e discussão dos dados obtidos durante a execução do estudo, bem como a metodologia empregada, são apresentados na forma de Artigo Científico, o qual será submetido ao periódico ***Journal of Biosciences***.

2. Artigo

**Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das
galinhas em sistema procarioto e eucarioto**

(Artigo Científico a ser submetido para o periódico *Journal of Biosciences*)

Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em sistemas procarioto e eucarioto

Paula F Finger¹, Luana Dummer², Michele P Cerqueira², Giseli Ritterbusch¹,
Lívia S Munhoz¹, Fabio P L Leite², Geferson Fischer¹, Gilberto D Vargas¹, Paulo A
Esteves³, Fabricio R Conceição², Silvia de O Hübner¹

¹ *Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, RS, Brasil;*

² *Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Núcleo Biotecnologia - Laboratório de Bacteriologia – UFPel, Pelotas, RS, Brasil.*

³ *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPSA, Concórdia, SC, Brasil*

*Autor para correspondência. Tel 53 32757498; FAX 32757498

E-mail: paulaafinger@hotmail.com CP 354 – 96010-900

1. RESUMO

O gene da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) foi amplificado (1.540 pb) pela técnica de RT-PCR, com posterior clonagem e expressão em levedura *Pichia pastoris* utilizando o vetor de expressão pPICZαB. Um outro gene que codifica a proteína S1 foi elaborado a partir de sequências de amostras de campo nacionais da Embrapa Suínos e Aves e em sequências internacionais depositadas no GenBank e foi clonado e expresso em sistema procarioto de expressão, utilizando o vetor pAE de *Escherichia coli*. Os clones recombinantes da linhagem KM71H de *P. pastoris* e pLYSS de *E. coli* foram submetidos aos protocolos apropriados de indução. A clonagem e a expressão da glicoproteína S1 em ambos os sistemas heterólogos de expressão foi realizada com sucesso. O processo de expressão usando *E. coli* foi rápido e simples quando comparado ao uso da *P. pastoris*. A *P. pastoris* foi capaz de expressar a S1 inteira, porém, apresentou dificuldade em secretar a glicoproteína. Os resultados obtidos deverão ser avaliados para uso em *Kit* de imunodiagnóstico para monitoramento da enfermidade na avicultura, sendo de custo mais acessível do que os existentes no mercado.

Palavras-chave: Bronquite Infecciosa das galinhas; glicoproteína S1; proteína recombinante; *Pichia pastoris*; *Escherichia coli*.

2. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (IB) é uma enfermidade altamente contagiosa e de curto período de incubação, causada por um vírus que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus* (Cavanagh *et al.* 1997). O vírus da bronquite infecciosa (IBV) causa predominantemente lesões respiratórias que se manifestam clinicamente e invariavelmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares,

podendo levar a sinais mais severos (Muneer *et al.* 1988; Dhinakar and Jones 1997). Aves infectadas apresentam diminuição do desempenho e, conseqüentemente, perda de peso e refugagem. Além disso, infecções bacterianas secundárias a infecção viral causam grandes perdas econômicas por condenação de carcaças devido à aerossaculite (Cavanagh 2007; Mendonça *et al.* 2009).

O IBV possui genoma RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento que codifica quatro proteínas estruturais importantes: N (proteína do nucleocapsídeo), S (proteína de superfície), E (proteína do envelope) e M (proteína da membrana). É relevante destacar duas dessas proteínas, consideradas de grande importância para a imunidade das aves. Uma é a nucleoproteína (N) que está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, formada por 409 aminoácidos com uma massa molecular de cerca de 50 KDa (Macnaughton *et al.* 1977; Bournsnel *et al.* 1985). Usualmente, tal proteína apresenta alta identidade entre as diferentes cepas de IBV ($91\pm 96.5\%$), sendo uma proteína bastante imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (Williams *et al.* 1992). A glicoproteína S possui uma massa molecular de aproximadamente 180 KDa (Cavanagh 1983) e apresenta duas funções conhecidas: possibilitar que o IBV ligue-se aos receptores celulares das células-alvo e viabilizar a fusão entre as membranas viral e celular.

A glicoproteína S é dividida em duas porções, S1 e S2. A subunidade 2 (S2) compreende cerca de 600 aminoácidos, possuindo importante atividade no ancoramento da proteína S no envelope viral e também atuando na etapa de fusão entre as membranas viral e celular. A S1 é formada por cerca de 500 aminoácidos e encontra-se exposta no envelope viral, o que a torna um importante, ou principal, indutor da produção de anticorpos neutralizantes frente ao IBV, sendo, conseqüentemente, o principal alvo para o sistema imune do hospedeiro (Cavanagh 1983; 2007).

As variações em duas regiões da subunidade S1 do envelope, chamadas regiões hipervariáveis podem dar origem a novos sorotipos. A capacidade de mutação e recombinação de IBV contribuem para o aparecimento de uma grande variedade de sorotipos e subtipos de IBV, sendo os sorotipos Massachussets, Beaudette (cepa

mutante derivada da cepa Massachussets), Connecticut e Arkansas os mais conhecidos (Di Fabio and Rossini 2000).

Com relação ao diagnóstico laboratorial, sabe-se que o mesmo depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e a identificação genômica ou fenotípica do vírus, e/ou de métodos indiretos destinados à detecção de anticorpos específicos. As técnicas sorológicas objetivam, além do sorodiagnóstico, fazer também a avaliação da resposta imunológica vacinal. Normalmente os métodos indiretos são realizados a partir de *Kits* comerciais de ELISA, os quais são importados e apresentam um custo elevado para a sua utilização com frequência.

Além disso, embora sejam bastante utilizados, os métodos de ELISA atualmente existentes detectam anticorpos que reagem com todos os antígenos protéicos do IBV 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. Nesse sentido, é de grande interesse a utilização da glicoproteína S1 como principal antígeno quando se trata de diagnóstico e avaliação de resposta vacinal, uma vez que é a principal indutora de resposta imune nas aves infectadas (Ignjatovic *et al.* 1994).

A produção de proteínas recombinantes é uma alternativa que tem chamado atenção de vários pesquisadores. Sistemas de expressão em eucariotos e procariotos já são conhecidos e têm sido bastante utilizados para a expressão de proteínas.

As leveduras, tanto *Pichia pastoris* como *Saccharomyces*, são sistemas que apresentam grandes vantagens para expressão de proteínas heterólogas. Apresentam um elevado crescimento, de simples manipulação, e também capazes de produzirem proteínas heterólogas de forma segura e mais barata que sistemas bacterianos ou mamíferos. A *P. pastoris* é capaz de processar a maioria das modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e glicosilação, conservando características antigênicas das proteínas originais, o que facilita sua aplicação em ensaios diagnósticos e em vacinas de subunidade (Cereghino and Cregg 2000).

Entretanto, tal metodologia foi empregada para um número bem menor de patógenos virais se comparada com aquela que utiliza os sistemas de hospedeiros procariotos como *Escherichia coli*, ou por meio de células de vertebrados ou invertebrados. As bactérias, principalmente a *E. coli*, são hospedeiras mais comumente

utilizadas para expressão de proteínas recombinantes. A *E. coli* é o microorganismo mais bem estudado e explorado na atualidade (Lugovskaya *et al.* 2006). O profundo conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética (Ndifuna *et al.* 1998). No entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto processamento de proteínas heterólogas (Cregg 1999).

Em vista da importância do IBV na avicultura e da carência de diagnóstico laboratorial e monitoramento imunológico, propôs-se a expressão da proteína S1 em *P. pastoris* e *E. coli*, como uma alternativa interessante para a produção de antígeno que possa ser utilizado para monitoramento vacinal das aves e também um antígeno que seja adequado para utilização em diagnóstico sorológico. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o gene que codifica a proteína de superfície S1 da estirpe M41 do IBV em *P. pastoris* e *E. coli* visando o emprego destes antígenos no imunodiagnóstico da bronquite infecciosa das galinhas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pichia pastoris

3.1.1 Propagação viral e preparação do RNA

Uma amostra brasileira com o mesmo perfil da cepa Massachussets 41 (M41-CNPSA – EMBRAPA – Concórdia, SC) do IBV foi propagada em ovos embrionados SPF com 9 dias de incubação, na cavidade córioalantoide (CA), sendo o líquido colhido e estocado a -70° C, até o momento do uso. O ácido nucléico das amostras obtido de suspensões oriundas do líquido córioalantoide (LCA) foi extraído com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.1.2 Amplificação do gene S1 por RT-PCR

A partir do RNA viral extraído da suspensão de LCA infectado com a amostra do mesmo perfil da estirpe M41 do IBV, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT),

usando oligonucleotídeo randômico para, em seguida, ser amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) toda a *orf* do gene da glicoproteína S1. Com base na sequência do gene da proteína S1 da estirpe M41 do IBV (“GenBank” n° de acesso - M21883) foram desenhados os *primers forward* e *reverse* para a completa amplificação do gene que codifica para a proteína desejada. Sítios de clivagem para *EcoRI* e *KpnI* foram introduzidos no *primer forward* (5'- CGGAATTCCTGCTTTGTATGACAGT – 3') e *reverse* (5' – CCGGTACCTTAATGTAAACTGG – 3'), respectivamente.

A PCR foi realizada em uma solução com volume final de 50 µl, contendo 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq DNA Polimerase, MgCl₂ a 3,5 mM, Buffer 1X, 5 M de Betaine e 0,2 pmol de cada primer. A essa solução foi adicionado 3 µl de cDNA, submetendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 7 minutos, 70°C por 1 minuto, 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

3.1.3 Clonagem do gene da glicoproteína S1

O produto amplificado foi purificado através do GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O produto da PCR e o vetor de expressão em *P. pastoris*, pPICZαB, foram digeridos com enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*, e então ligados com T4 DNA - ligase. O produto da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani (1% de triptona, 0.5% de extrato de levedura, 0.5% de NaCl e 2% de Agar) contendo 25 µg mL⁻¹ de zeocina.

3.1.4 Sequenciamento do DNA

Um clone recombinante foi submetido ao sequenciamento para confirmar o inserto. O sequenciamento foi realizado em MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare) pelo uso de DYEnamic™ ET 4 Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare). Os *primers* utilizados na amplificação do gene foram utilizados também no sequenciamento, assim como os *primers* para a sequência AOX 3', EasySelect Pichia Expression (Invitrogen).

3.1.5 Transformação de *Pichia pastoris*

O plasmídeo recombinante pPICZ α B/S1 foi propagado em *E. coli*, purificado e posteriormente linearizado com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs). A precipitação do DNA foi realizada de acordo com o manual *Invitrogen EasySelect Pichia Expression Kit*. A cepa KM71H de *P. pastoris* com fenótipo Mut^S, foi cultivada em meio YPD (extrato de levedura 1% , peptona 2% e D-glucose 2%) por 18 horas em agitador orbital a 28°C até a densidade óptica de aproximadamente 1,3 a 600 nm. As células competentes foram preparadas, transformadas por eletroporação (25 F, 200, 2 kV) com 10 μ g de pPICZ α B/S1 linearizado e ressuspendidas em Sorbitol 1 M. Após 1 h de incubação em agitador orbital (28°C e 200 rpm), 100 e 200 μ l do volume de células foram espalhados em placa de meio YPDS contendo 500 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen) e, por fim, incubados a 28°C durante 4 dias.

3.1.6 Colony blotting

As colônias foram repicadas em meio BMMY e incubadas a 28°C por 6 dias, sendo adicionado 0,5% de metanol absoluto a cada 24 h no topo das placas para a indução da expressão. No final da indução, as colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por 3 h a 28°C e as mesmas foram bloqueadas com leite em pó 0,5% diluído em PBS-T e incubadas sob agitação leve. Após, foram feitas quatro lavagens com PBS-T e adicionou-se o anticorpo anti-histidina (Anti-6xHIS - Invitrogen), deixando as membranas em agitação leve por 1 hora. Passado o período, novas lavagens foram feitas e adicionado o conjugado anti-camundongo, que foi deixado também em agitação por 1 h. As colônias recombinantes foram detectadas por revelação com SIGMA FASTTM DAB (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante.

3.1.7 Expressão da S1 em *Pichia pastoris*

Um clone recombinante que demonstrou uma maior expressão no *colony blot* foi selecionado para indução da expressão em meio líquido, a fim de testar a indução da expressão em pequena escala no agitador orbital. Uma colônia do clone recombinante escolhido foi inoculada em balão aletado com meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% de YNB (*Yeast Nitrogen Base*), 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol e 100 mM Tampão Fosfato de Potássio, pH 6,0) e deixado em agitação orbital de 250 rpm a uma temperatura de 28°C por 24 h. Após atingir uma densidade óptica de 20-30 em 600 nm, o cultivo foi centrifugado e as células ressuspensas no mesmo meio substituindo o glicerol pelo metanol (BMMY), reduzindo o volume em cinco vezes. A indução da expressão foi realizada a 28°C com agitação de 250 rpm por 6 dias, objetivando-se observar o melhor dia de expressão da proteína. A cada 24 h, 0,5% de metanol foi adicionado e o sobrenadante coletado para detecção da proteína S1 por *Dot blotting*.

Para a tentativa de obter melhor expressão da proteína S1, a mesma foi realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, NBS), em cuba com capacidade de 12 L, sendo o volume utilizado de 7 L. O inóculo foi preparado para atingir um volume de 10% do volume de fermentação, em meio BMGY, sendo realizado em agitador orbital a 28°C, 100 rpm por 24 h. O meio de cultura utilizado na fermentação foi o Meio basal de sais (Fermentation Basal Salts Medium – Invitrogen), com adição de anti-espumante (204 Sigma) em quantidades necessárias. O pH foi mantido em 5,0 por todo o período de fermentação com adição de hidróxido de amônia. A fase de crescimento celular foi realizada a 500 rpm, 1 vvm a 28°C, até o esgotamento de todo o glicerol do meio. A fase de indução da expressão da proteína com a utilização de 0,5% de metanol iniciou logo após a exaustão total do glicerol no meio de cultivo. O processo de indução foi realizado a 28°C, 1 vvm e 30% de oxigênio dissolvido, sendo a agitação controlada pelo oxigênio dissolvido, tendo limite máximo de 1000 rpm e mínimo de 200 rpm. A indução foi mantida por 5 dias e após, o sobrenadante do cultivo foi centrifugado por 15min a 10.000 rpm. O pellet celular foi lavado com água estéril e submetido à lise para a extração da proteína celular total. Para tal, as células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de lise (50 mM fosfato de sódio monobásico, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila -PMSF) e foi adicionado igual volume de

“*glass beads acid-washed 425-600 μM*” (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). A suspensão foi agitada em *vortex* por 30 minutos, alternando-se 30 segundos em *vortex* e 30 segundos no gelo. A lise foi sucedida de centrifugação a 12.000 g, 4° C, 10 minutos. O sobrenadante colhido foi submetido a *dot blotting*.

3.1.8 *Dot blotting*

Ao final da indução os sobrenadantes coletados dos cultivos em agitador orbital foram centrifugados e 6 μl do mesmo foi testado em membrana de nitrocelulose como descrito no *colony blotting*. Para o cultivo em biorreator, o sobrenadante resultante da lise celular também foi submetido ao teste.

3.2 *Escherichia coli*

3.2.1 *Construção do gene da glicoproteína S1*

Para a expressão em sistema procarioto, foi construído um gene sintético baseado em sequências de amostras de campo nacionais da Embrapa Suínos e Aves e em sequências internacionais depositadas no GenBank. Para tal, utilizou-se o programa Vector NTI (Invitrogen®) para alinhar as sequências e construir o gene. Ao gene consenso foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *KpnI*, visando a clonagem direcional no vetor de expressão em *E. coli* pAE. O gene foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA).

3.2.2 *Clonagem do gene sintético da glicoproteína S1*

Após liberação do gene sintético que estava clonado no vetor pUC19, mediante digestão com *XhoI* e *KpnI*, o mesmo foi purificado do gel de agarose com GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit. A clonagem no vetor pAE, previamente digerido com *XhoI* e *KpnI*, foi realizada ligação com T4 DNA – ligase (Invitrogen). O produto resultante da ligação foi utilizado para transformar, mediante choque térmico, a cepa

TOP10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 2% Agar) suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina.

3.2.3 Expressão em *E. coli*

Clones recombinantes foram usados para transformar por choque térmico as cepas de expressão *E. coli* pLYSS e Star. O produto da transformação foi repicado para meio LB contendo ampicilina com $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e cloranfenicol com $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$, sendo deixado sob agitação de 200 rpm, a 37°C por 16 h. Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para um novo meio LB com $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de ampicilina. O cultivo de pLYSS também foi suplementado com $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de cloranfenicol. Quando a densidade óptica dessas culturas atingiu aproximadamente 0,8 em um comprimento de onda de 600 nm, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,3 mM. As culturas, depois da adição do agente de indução, foram incubadas por mais 3 h a 37°C e sob agitação de 200 rpm, sendo, ao final, submetidas ao processo de centrifugação para obtenção das células contendo a proteína.

Após a identificação do melhor clone pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western Blot*, partiu-se para uma indução em larga escala. A transformação foi novamente por choque térmico com a cepa pLYSS, uma vez que os clones de Star não expressaram. Um cultivo em 25 mL de LB com ampicilina e cloranfenicol nas mesmas proporções já citadas foi realizado por 16 h a 37°C . Passado este período, o cultivo foi transferido para um volume de 500 mL de LB com os antibióticos necessários e a indução foi feita no momento em que foi atingida a D.O de aproximadamente 0,8 em 600 nm.

3.2.4 Purificação da S1 recombinante

Após a indução da expressão da proteína em larga escala, foi realizado o processo de purificação da mesma. Para tal, o cultivo de 500 mL foi centrifugado a 10000 rpm, por 10 minutos a 4°C e o pellet ressuscitado em tampão Akta Wash (0,234% de NaH_2PO_4 , 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole), submetido à sonicação em sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e então centrifugado novamente. O

sobrenadante foi armazenado e o *pellet* lavado com solução de PBS por três vezes, sofrendo centrifugação em cada intervalo das lavagens. Ressuspendeu-se o pellet final em solução de Akta Wash com N-LauroylSarcosine (0,234% de NaH_2PO_4 , 2,92% de NaCl, 0,068% de Imidazole e 0,2% de Lauroyl) e deixou-se sob agitação na câmara fria por um período de 48 h. Passado esse tempo, o material foi novamente centrifugado sendo o sobrenadante armazenado, e o *pellet* ressuspendido em tampão Akta Wash com uréia (0,234% de NaH_2PO_4 , 2,92% de NaCl, 0,068% de Imidazole e 0,36% de Uréia), na qual permaneceu por dois dias em agitação na câmara fria. O material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado, obtendo-se, ao final do processo de purificação, três sobrenadantes (akta wash, akta wash N-LauroylSarcosine e akta wash uréia), os quais foram analisados por SDS-PAGE para verificar em qual deles estava a proteína S1 recombinante.

4. RESULTADOS

4.1 *Pichia pastoris*

4.1.1 Construção do vetor de expressão e transformação de *P. pastoris*

O fragmento esperado de 1.540 pb (Fig 1) foi amplificado na reação de PCR utilizando os *primers* desenhados para obtenção do gene correspondente à região codificadora da S1. O vetor pPICZ α B/S1 foi utilizado para transformar TOP10F de *E. coli*, resultando em muitas colônias, sendo que sete foram confirmadas como recombinantes resistentes. Então, a cepa KM71H de *P. pastoris* foi transformada com o pPICZ α B/S1 linearizado, por eletroporação e, após três dias obteve-se muitas colônias em placas de YPDS com 100 μg e posteriormente com 500 μg de Zeocina e com adição de sorbitol após 1 hora da transformação.

Após a transformação da *P. pastoris* nove colônias foram selecionadas, sendo sete confirmadas como recombinantes no PCR. Destas, uma foi escolhida para expressão em meio líquido.

4.1.2 Expressão da S1 em agitador orbital e biorreator

As sete colônias que se destacaram no *colony blot* e confirmadas também por PCR foram estocadas em glicerol 20% no freezer -70°C. O clone escolhido foi testado para indução em pequena escala em agitador orbital para verificar tempo de expressão da proteína após a indução. A proteína secretada foi detectada por *dot blotting*, no qual o melhor resultado foi obtido com 96 h de indução (Fig 2). Um controle negativo, KM71H não transformada, também foi cultivada em BMGY e induzida com 0,5% de metanol em BMMY.

A mesma colônia induzida em agitador orbital foi cultivada em biorreator, no qual foram feitas as coletas de cultivo induzido a cada 24 h. O *dot blotting* demonstrou ótima expressão da S1 dentro da célula, quando comparada à lise celular do controle negativo (Fig 3).

4.1.3 Caracterização da glicoproteína S1

A técnica de *dot blotting* utilizando-se anticorpos de aves imunizadas com o IBV demonstrou forte reatividade da glicoproteína expressa, sugerindo potencial para ser utilizada como antígeno. A reação foi comparada com antígeno da cepa KM71H não transformada, utilizada como controle negativo (Fig 4).

4.2 *Escherichia coli*

4.2.1 Construção do vetor de expressão e transformação de *E. coli*

O gene sintético foi retirado do vetor pUC19 e ligado no vetor pAE com êxito, obtendo-se, a partir da transformação em *E. coli* TOP10F, muitas colônias transformantes (Fig 5). Dessas, quatro foram selecionadas para transformação e indução da expressão, as quais foram transformadas por choque térmico em cepa pLYSS e foram analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot* para verificar a expressão da S1 (Fig 6).

4.2.2 Expressão da S1 em *Escherichia coli*

Após a escolha do clone que melhor expressou em pequena escala, foi feita a indução da expressão em larga escala obtendo-se um pellet a partir do cultivo de 500 mL de LB. Verificou-se a expressão de uma proteína de 57 KDa por SDS-PAGE, e pode-se constatar que a proteína formou corpos de inclusão que foram eficientemente solubilizados com 6 M de uréia.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, imunoenaios de ELISA (indirect enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando o vírus inteiro da IB são realizados mundialmente para medir os níveis de anticorpos específicos contra IBV. No entanto, a produção de IBV em ovos de embriões de galinhas SPF ou culturas de tecidos, assim como a inativação de suspensão viral, a concentração e a purificação do antígeno para o ELISA são procedimentos muito caros e trabalhosos. Em contraste, o uso de proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli* ou leveduras como antígenos para teste de diagnóstico de IBV, como o ELISA, torna-se um processo muito mais barato e mais conveniente (Chen *et al.* 2003; Gibertoni *et al.* 2005; Ndifuna *et al.* 1998).

A produção de antígenos virais a partir de expressão de genes clonados constitui um importante método de preparo rápido de grandes quantidades de antígenos altamente purificados que podem ser utilizados como reagentes de diagnóstico. Há possibilidade de usar vários sistemas de expressão baseados em vetores plasmidiais tanto em procariotos, como *E. coli*, quanto em eucariotos como *P. pastoris* e *Saccharomyces*, acrescentando-se, ainda, a possibilidade de serem usados vetores virais, replicados em células de mamíferos ou de insetos (Chen *et al.* 2000). Essas técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas contribuem para a diminuição dos custos na produção de imunoenaios, e minimizam as reações cruzadas, resultando em maior acurácia no diagnóstico e monitoramento.

Neste estudo foi demonstrado a possibilidade de clonagem e expressão da glicoproteína S1 em sistema procarioto e eucarioto com êxito. Com a levedura *P. pastoris*, obteve-se vários clones recombinantes com utilização do vetor pPICZαB

(Invitrogen), porém, apenas um deles se destacou na técnica de colony blotting. Com a indução da expressão em agitador orbital, foi possível verificar a presença da proteína no sobrenadante do cultivo, apresentando uma baixa eficiência de expressão ao ser comparada com outras proteínas já expressas no mesmo sistema, como a glicoproteína D do Herpesvirus Bovino tipo 5, descrito por Dummer *et al.* (2009). Porém, ao utilizar a técnica de indução em biorreator, observou-se que a proteína não estava sendo secretada, pois somente foi detectada a presença da proteína ao realizar a lise das células.

A escolha das leveduras como sistema de expressão de genes heterólogos deve-se ao fato de que se trata de microrganismos unicelulares eucarióticos capazes de fazer o processamento pós-traducional dos polipeptídeos expressos, adicionando-se o fato de que a sua manipulação genética é relativamente mais fácil (Romanos *et al.* 1992). Assim, seu ambiente intracelular é mais adequado para que ocorra o correto dobramento, ou formação da estrutura terciária das proteínas virais (Faber *et al.* 1995).

Dificuldades para a secreção da proteína S1 recombinante no sobrenadante pelo sistema *P. pastoris*, também foram relatadas na tentativa de produção da proteína S1 recombinante de outro coronavírus, o vírus da síndrome respiratória aguda severa (SARS), utilizando pPIC9K como vetor (Lu *et al.* 2006). Mais recentemente, Gonçalves *et al.* (2010) na tentativa de expressar a S1 do IBV em linhagem GS115 de *P. pastoris*, observou que a proteína não foi secretada no sobrenadante do cultivo, e estava presente no extrato celular. Ao estudar a expressão da proteína N do IBV tanto em *P. pastoris* como em *E. coli*, Gibertoni *et al.* (2010) também observaram uma baixa eficiência da expressão em levedura, ao contrário do sistema bacteriano que demonstrou vantagens consideráveis na expressão da mesma proteína.

A expressão da proteína recombinante em *E. coli*, foi rápida e houve facilidade da recuperação da proteína da célula, mostrando-se de alta eficiência. A *E. coli* já é bastante conhecida e bem estudada por muitos pesquisadores, porém a proteína que resulta da expressão nesse sistema não sofre glicosilação, acaba perdendo sua conformação original, ao contrário das proteínas produzidas em *P. pastoris* que, por sua vez, é capaz de processar a maioria das modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e glicosilação, conservando características antigênicas das proteínas originais, o que facilita sua aplicação em ensaios diagnósticos e em vacinas

de subunidade (Cereghino and Cregg 2000). Contudo, Wang *et al.* (2002) realizaram a expressão de S1 em *E. coli* e demonstraram que a proteína fusionada possui alta reação cruzada entre diferentes sorotipos de IBV e o ELISA com essa proteína demonstrou-se ser adequado, econômico e um método eficaz para detecção de anticorpos contra IBV.

A proteína S1 pode ser expressa com sucesso em sistema procarioto e eucarioto. Futuramente as proteínas S1 expressas em *P. pastoris* e *E. coli* serão caracterizadas e testadas contra soros de aves imunizadas e não imunizadas com IBV e outros vírus, e avaliadas para uso em testes do tipo ELISA.

6. FIGURAS

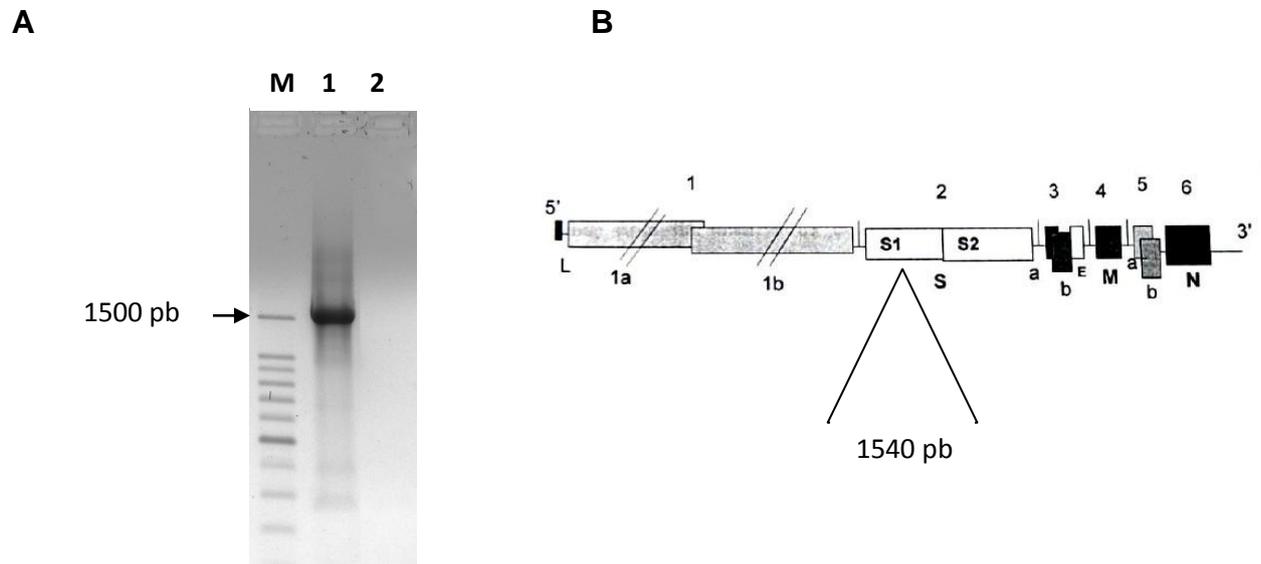


Figura 1. A) Amplificação do fragmento de 1540 pb correspondente à glicoproteína S1. M: marcador Ladder 100 pb, 1: Gene S1, 2: Controle negativo. B) Esquema representativo do genoma completo do IBV. Fonte: OLIVEIRA, A. P. (2008).

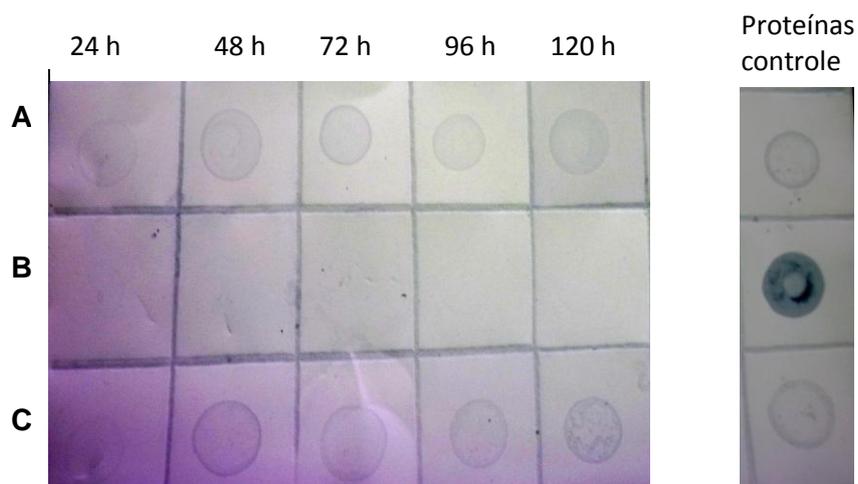


Figura 2. *Dot Blotting* da indução em meio líquido BMMY do clone de S1 com diferentes dias de indução. A: Controle positivo, B: controle negativo e C: S1

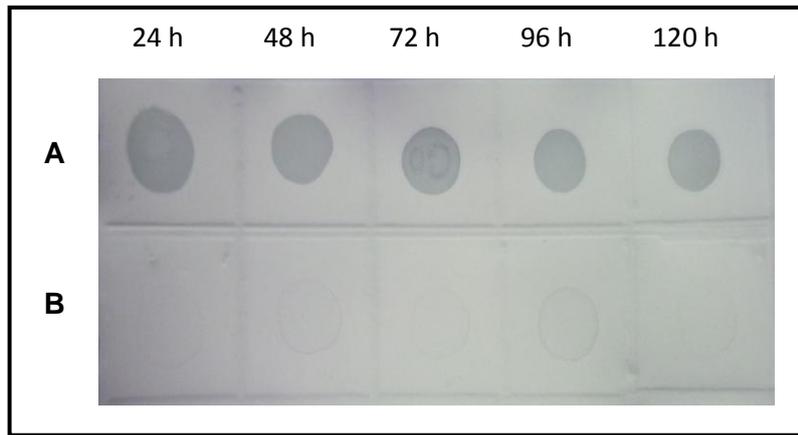


Figura 3. Dot blotting da lise celular do cultivo em biorreator. A: Indução da S1, B: Indução de KM71H não transformada (controle negativo).

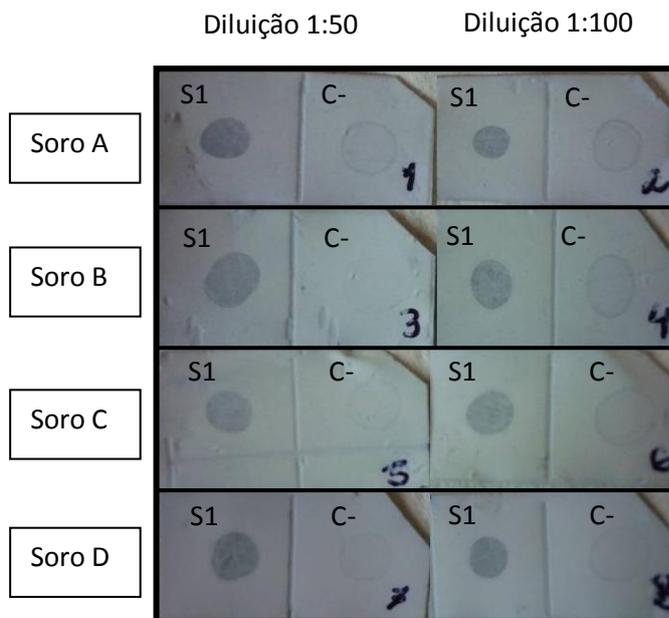


Figura 4. Dot blotting para caracterização da glicoproteína S1 recombinante frente a diluições (1:50 e 1:100) de soros de aves imunizadas com a cepa M41 de IBV.

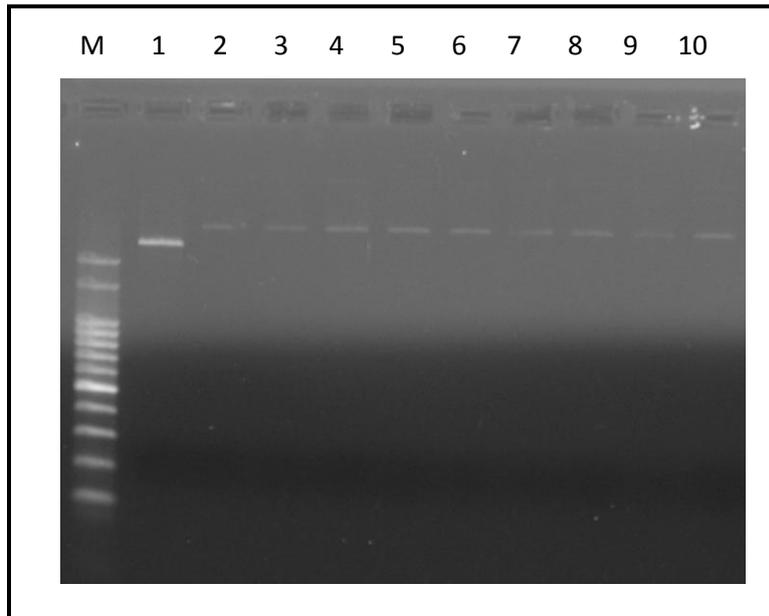


Figura 5. Clones recombinantes de *E. coli* em vetor pAE. M: marcador Ladder 100 pb, 1: vetor pAE, 2-10: clones recombinantes

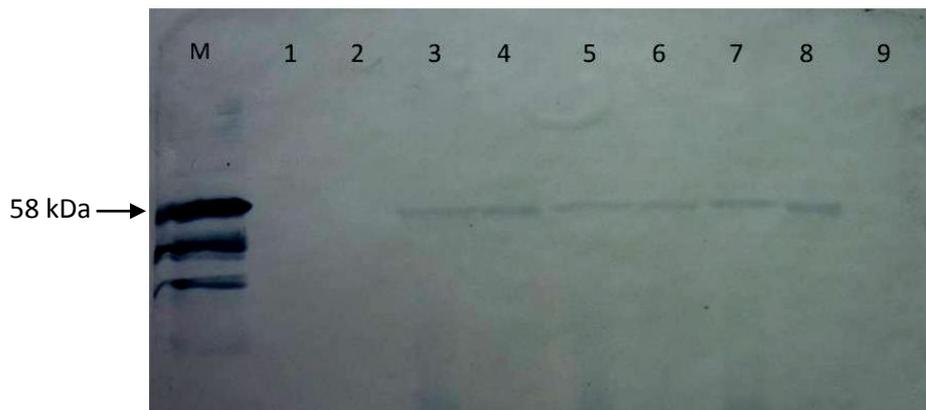


Figura 6. *Western Blotting* da indução de expressão dos clones de *E. coli*. M: Proteína M com 58 KDa, 1,3,5 e 7: clones induzidos overnight; 2,4,6 e 8: clones induzidos por 3 h e 9: Controle negativo

7. REFERÊNCIAS

BOURSNELL M, BINNS M, FOULDS I, BROWN T 1985. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* **66** 573-580.

CAVANAGH D 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *Journal of General Virology* **64** 2577-2583.

CAVANAGH D 2007 Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* **38** 281–297.

CAVANAGH D and NAQI SA 1997. Infectious bronchitis virus. In: Calnek, B.W., Barnes, H., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), *Disease of Poultry*, 9th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp 511–526.

CEREGHINO JL and CREGG JM 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 45-66.

CHEN CM, CHENG WTK, CHANG YC, CHANG TJ, CHEN HL 2000. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. *Life Sciences* **67**, 2103-2115.

CHEN H, COOTE B, HISCOX JA 2003. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **32** 519-526.

CREGG JM 1999. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression* (Fernandez, J.M. and Hofer, J.P., Eds.), pp. 157-191. Academic Press, San Diego, CA.

DHINAKAR RG and JONES RC 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology* **26** 677-706.

DI FABIO J and ROSSINI LI 2000. Bronquite infecciosa das galinhas, p.283-300. *In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: Facta, 293-300.*

DUMMER LA, CONCEIÇÃO FR, NIZOLI LQ, MORAES CM, ROCHA AR, SOUZA LL, ROOS T, VIDOR T, LEITE FPL 2009. Cloning and expression of a

truncated form of envelope glycoprotein D of *Bovine herpesvirus type 5* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of virological methods **161** 84-90.

FABER KN, HARDER W, AB G, VEENHUIS M 1995. Review: methylotrophic yeast as factories for the production of foreign proteins. Yeast, Chichester, **11** 1331-1344.

GONÇALVES M, GIBERTONI A, MONTASSIER M, FERNANDES C, MONTASSIER H 2010. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo) **77** 609-615.

GIBERTONI A, GONÇALVES M, MONTASSIER M, FERNANDES C, MONTASSIER H 2010. Clonagem, expressão e caracterização da nucleoproteína recombinante do vírus da Bronquite Infecciosa em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris* Arquivos do Instituto Biológico **77** 1-9.

GIBERTONI AM, MONTASSIER MF, SENA JA, GIVISIEZ PE, FURUYAMA CR, MONTASSIER HJ 2005. 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. **43** 1982-1984.

IGNJATOVIC J and GALLI L 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens, Arch. Virol. **138** 117–134.

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

LUGOVSKAYA N, SCHERBAKOV A, YAKOVLEVA A, TSYVANYUK M, MUDRAK N, DRYGIN V, BORISOV A 2006. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-basead enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Virological Methods **135** 292-296.

MACNAUGHTON M, MADGE M, DAVIES H, DOURMASHKN R 1977. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. Journal of Virology **24** 821-825.

MENDONÇA JFP, MARTINS NRS, CARVALHO LB, SÁ MEP, MELO CB 2009. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. *Ciência Rural* **39** 2559-2566.

MUNEER MA, NEWMAN JA, HALVORSON DA, SIVANANDAN V, NAGARAJA KV, COON CN 1988. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterologous challenge. *Research in Veterinary Science* **45** 22-27.

NDIFUNA A, WATERS A, ZHOU M, COLLISSON E 1998. Recombinant nucleocapsid protein is potentially a inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *Journal of Virological Methods*, **70**, 37-44.

OLIVEIRA, AP 2008 Expressão da proteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *saccharomyces cerevisiae* para aplicação no imunodiagnóstico, dissertação, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

ROMANOS MA, SCORER CA, CLARE JJ 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, Chichester, **8** 423-488.

WANG X, SCHNITZLEIN WM, TRIPATHY DN, GIRSHICK T, KHAN MI 2002. Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of Massachusetts 41 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, **46** 831-838.

WILLIAMS AK, WANG L, SNEED LW, COLLISSON EW 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Research* **25** 213-222.

3. CONCLUSÃO

O estudo realizado demonstrou que a glicoproteína S1 pode ser expressa tanto em levedura *P. pastoris* como em sistema bacteriano de *E. coli*. Isso confirma que a expressão de proteínas heterólogas é uma alternativa viável na obtenção de antígenos virais purificados. A expressão da glicoproteína S1 possibilitará que futuros estudos sejam realizados com esta proteína recombinante, tais como a otimização da sua expressão em *P. pastoris*, padronizando o procedimento e a avaliação imunogênica, através de experimentos de utilização da proteína como antígeno em diagnósticos sorológicos, bem como a comparação de dois sistemas diferentes, procarioto e eucarioto, a fim de verificar a melhor proteína obtida.

4. REFERÊNCIAS GERAIS

ABREU, J.; RESENDE, J.; FLATSCHART, R.; FLATSCHART, A.; MENDES A.; MARTINS, N.; SILVA, C.; FERREIRA, M.; MACHADO, A. Genotipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) pelo sequenciamento de parte de S2 e do segmento de S1. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.210, 2006.

ABREU, J.; VELOSO, C.; RESENDE, J.; FLATSCHART, R.; FLATSCHART, A.; JÚNIOR, S.; SANTORO, M.; MENDES, A.; DINIZ, L. Tipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) pelo seqüenciamento do segmento s1 e modelagem protéica. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.231, 2008.

ASADPOUR, L.; GOUDARZI, H.; KEYVANFAR, H.; SHOUSHARI, A. H.; SEYFI ABAD SHAPOURI, M. R.; ESHRAT ABADI, F. Molecular cloning of S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis virus (IBV) serotype 793/B in secretory *Pichia pastoris* vector. **African Journal of Biotechnology**, p.8722-8725, 2010.

ARIYOSHI R.; KAWAI T.; HONDA T.; TOKIYOSHI S. Classification of IBV S1 Genotypes by Direct Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Relationship between Serotypes and Genotypes of Strains Isolated between 1998 and 2008 in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, p.687-692, 2010.

BOSCH, B.; VAN DER ZEE, R.; DE HAAN, C.; ROTTIER, P. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **Journal of Virology**, v.77, n.16, p.8801-8811, 2003.

BOURSNELL, M.; BROWN, T.; FOULDS, I.; GREEN, P.; TOMLEY, F.; BINNS, M. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, v.68, n.1, p.57-77, 1987.

BOURSNELL, M.; BINNS, M.; FOULDS, I.; BROWN, T. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of General Virology**, v.66, n.3, p.573-580, 1985.

BRENTANO, L.; ESTEVES, P.; TREVISOL, I.; HAYASHI, M.; LUCIANO, R.; CASTRO, A.; KLEIN, T.; MOLINARI, M. Sequenciamento do gene S1 de vírus de

bronquite infecciosa (IBV) isolados de surtos da doença associada a lesões de miopatia peitoral. Suplemento 8. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p. 241, 2006.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p. 281-297. 2007.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. **Journal of General Virology**, v.64, p.1787-1791, 1983a.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**, v.64, p.2577-2583, 1983b.

CEREGHINO, J.; CREGG, J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology**, v.24, p.45-66, 2000.

CHACÓN, J.; PASIAN, I.; RODRIGUES, J.; FERREIRA, A. Características patológicas, moleculares e sorológicas do vírus variante da bronquite infecciosa isolados em Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.251, 2008.

CHACÓN, J.; ASSAYAG, M.; PEDROSO, A.; SAIDENBERG, A.; VILLARREAL, L.; FERREIRA, A. Situação epidemiológica da bronquite infecciosa em granjas comerciais do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.225, 2007.

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

COOK, J. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1997, São Paulo. **Anais do...** São Paulo: FACTA, 1997. p.13-27.

CREGG, J.; BARRINGER, K.; HESSLER, A.; MADDEN, K. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v.5, n.12, p.3376-3385, 1985.

CREEG, J. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene expression systems: using nature for the art of expression**. New York: Academic Press.,1999. 480p.

CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V.; COOK, J. Characterization of bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathology**, v.20, p.85-99, 1991.

DALY, R.; HEARN, M. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v.18, p.119-138, 2005.

D'ARCE, R.; FERREIRA, H.; TOLEDO, C.; MONTEIRO, M.; DI FABIO, J.; ARNS, C. Ausência de similaridade entre sequências genômicas de amostras de campo e vacinais do vírus da bronquite infecciosa no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.215, 2008.

DI FABIO, J.; ROSSINI, L.; ORBELL, S.; PAUL, G.; HUGGINS, M.; MALO, A.; SILVA, B.; COOK, J. Characterization of Infectious Bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v.44, p.582-589, 2000.

GELB JR, J.; WEISMAN, Y.; LADMAN, B.S.; MEIR, R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). **Avian Pathology**, v.34, p.194-213, 2005.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.54, p.741-750, 2000.

GIBERTONI, A.; GONÇALVES, M.; MONTASSIER, M.; FERNANDES, C.; MONTASSIER, H. Clonagem, expressão e caracterização da nucleoproteína recombinante do vírus da Bronquite Infecciosa em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris* **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.1-9, 2010.

GIROTTI, A. F.; MIELE, M. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. **Anuário Avicultura Industrial**, n. 11, p. 20-28, 2004.

GONÇALVES, M.; GIBERTONI, A.; MONTASSIER, M.; FERNANDES, C.; MONTASSIER, H. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v.77, n.4, p.609-615, 2010.

JACKWOOD, M., HILT, D.; CALLISON, S.; LEE, C.; PLAZA, H.; WADE, E. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v.45, p.366-372, 2001.

KEELER, C.; REED, K.; NIX, W.; GELB, J. Serotype identification of avian infectious bronchitis by RTPCR of the peplomer (S1) gene. **Avian Diseases**, v.42, p.275-284, 1998.

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

MACNAUGHTON, M.; MADGE, M.; DAVIES, H.; DOURMASHKN, R. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v.24, p.821-825, 1977.

MCKINLEY, E.T. et al. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v.26, p.1274- 1284, 2008.

MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS N.R.S.; CARVALHO, L.B.; SÁ, M.E.P.; MELO, C.B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, vol.39 n.8, p. 2559-2566, 2009.

MIYAJI, C. **Vírus da bronquite infecciosa das galinhas: estudo comparativo de amostras isoladas de rim de galinhas d'angola e de frangos de corte**. 1996. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONTASSIER, M.; MORGAN, V.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L.; MONTASSIER, H. Diversidade do gene da glicoproteína S1 de estirpes do vírus da bronquite infecciosa isoladas no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.221, 2006.

MUNEER, M.; NEWMAN, J.; HALVORSON, D.; SIVANANDAN, V.; NAGARAJA, K.; COON, C. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterologous challenge. **Research in Veterinary Science**, v.45, n.1, p.22-27, 1988.

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

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 27 nov. 2011.

SANDRI TL, VILLARREAL LYB, SOUZA SP, PERUZZETTO MC, RICHTZENHAIN LJ, BRANDÃO PE. Geographic and tropism patterns on the

occurrence of variant genotypes of avian infectious bronchitis virus in Brazilian poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.10:229, 2008.

SILVA, E. Infectious Bronchitis in Brazilian Chickens: Current Data and Observations of Field Service Personnel. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.12, n.3, p.197-203, 2010.

SNYDER, D.B.; MARQUARDT, W.W.; KADAVIL, S.K. Ciliary activity: a criterion for associating resistance to infectious bronchitis virus infection with ELISA antibody titer. **Avian Diseases**, v.27, p.485-490, 1983.

SUDBERY, P. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v.7, p.517-524, 1996.

TAKAGI, M.; TURPIN, M.; BALSADI, O.; JULIO, J. Reestruturação da Indústria de Carnes Avícola e Suinícola e Impactos Regionais: o Caso da Perdigoão em Rio Verde - Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 40., 2002, Passo Fundo. **Anais do...** Brasília: SOBER, 2002

TAVARES, L.; RIBEIRO, K. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v.9, n.1, p.79-88, 2007.

TREVISOL, I.M., Jaenish, F.R., Silva, V.S., Brentano, L., Klein, T.A.P., Esteves, P.A. Avaliação de proteção vacinal para amostras *variantes* de bronquite infecciosa das galinhas frente a amostra vacinal H120. **Simpósio Sobre Sanidade Avícola**, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), São Paulo-SP, 2010.

TRIMBLE, R.; ATKINSON, P.; TSCHMPP, R.; MALEY, F. Structure of oligosaccharides on saccaromyces SUC2 invertase secreted by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.34, p.22807-22817, 1991.

TSCHOPP, J., BRUS, P.; CREGG, J.; STILLMAN, C.; GINGERAS, T. Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Res**, v.15, p.3859-3876, 1987.

VILLARREAL, L. Bronquite infecciosa das galinhas: diagnóstico, tipos patogênicos e classificação no Brasil. In: CONFERENCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais do...** Santos: FACTA, 2007. p.237.

VILLARREAL, L.; BRANDÃO, P.; CHACÓN, J.; RAFFI, P.; SESTAK, L.; FERREIRA, A. Virus da bronquite infecciosa das galinhas e pneumovirus aviário associados com problemas de fertilidade em galos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.212, 2006.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology**. 1. ed. Chichester: Wiley, 1998. 431p.

WANG, C.; HUANG, Y. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v.145, p.291-300, 2000.

WILLIAMS, A.K.; LI, W.; SNEED, L.W.; COLLISSON, E.W. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Research**, v.25, p.213-222, 1992.

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

WU, K.; LIB, W.; PENG, G.; LIA, F. Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. **PNAS**, vol.106, p.19970–19974, 2009.