

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

CAROLINA GEORG MAGALHÃES¹; PAULA FONSECA FINGER¹; MICHELE SOARES PEPE¹; PAULO AUGUSTO ESTEVES²; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER³; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴

¹UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – carolmagalhaes@gmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, CNPSA - pesteves@cnpsa.embrapa.br

³UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Virologia e Imunologia – sohubner@yahoo.com.br

⁴UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – fabriciorc@pop.com.br

1. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas 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 das galinhas (IBV) é um dos principais agentes de perdas econômicas na avicultura, afetando o desempenho de aves de postura e corte. O vírus além de causar problemas no trato respiratório, pode replicar em diversos tecidos do trato digestivo, além de rins, testículos e ovidutos (PENA et al., 2005), podendo levar a sinais mais severos, com diminuição na fertilidade e redução da produção de ovos.

O IBV apresenta um genoma composto por um RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6 kb que 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) possui um papel fundamental para a indústria avícola, uma vez que é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo IBV (CAVANAGH, 2007), sendo por isto de fundamental importância na imunoprofilaxia (CAVANAGH et al., 1992).

A capacidade de mutação e recombinação do IBV, principalmente pelas variações em duas regiões da subunidade S1 do envelope, chamadas regiões hipervariáveis, 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. Por essas características a proteína S1 é a base dos testes de diagnósticos que tem sido utilizados para identificar e caracterizar diferenças entre cepas virais (KEELER et al., 1998).

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 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 (FINGER, 2011).

A produção de proteínas recombinantes é uma alternativa que tem chamado atenção de vários pesquisadores. Sistemas de expressão em procaríotos já são bem conhecidos e tem sido bastante utilizados para a expressão de proteínas. As bactérias, principalmente a *Escherichia coli*, são hospedeiras mais comumente

utilizadas para expressão de proteínas recombinantes (LUGOVSKAYA et al., 2006).

Em vista da importância do IBV na avicultura e da carência de diagnóstico laboratorial e monitoramento imunológico, objetivou-se a expressão em *E. coli* do gene que codifica a proteína de superfície S1 da estirpe M41 do IBV e a expressão da S1 de um gene sintético como uma alternativa interessante para a produção de um antígeno que possa ser utilizado para monitoramento vacinal das aves e também seja adequado para utilização em diagnóstico sorológico.

2. METODOLOGIA

2.1 Construção do gene da proteína S1

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 alinhar as sequências, gerando uma sequência consenso, e construir o gene, utilizou-se o programa Vector NTI (Invitrogen). Foram adicionados ao gene sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *KpnI*, visando a clonagem direcional no vetor de expressão em *E. coli* pAE.

2.2 Propagação viral e preparação do RNA para amplificação do gene S1 por RT-PCR

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.

A partir do RNA viral extraído, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT) para ser amplificada toda a orf do gene da proteína S1 pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Com base na sequência do gene da proteína S1 da estirpe M41 do IBV (“GenBank” nº 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* foram introduzidos no *primer forward* (5'- CGGAATTCCTGCTTTGTATGACAGT – 3') e *HindIII* no *primer reverse* (5' –CCCAAGCTTTCAAATGTAATACTGGTTC– 3').

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, MgCl_2 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.

2.3 Clonagem do gene sintético da proteína S1

Após liberação do gene sintético que estava clonado no vetor pUC19, mediante digestão com as enzimas *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 pela ligação com T4 DNA – ligase. O produto resultante foi utilizado para transformar por choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio LB suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina.

2.4 Clonagem do gene nativo da proteína S1

A reação de PCR foi purificada com GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit. O produto da PCR e o vetor de expressão em pAE foram digeridos com

enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, e então ligados com T4 DNA - ligase. O produto da ligação foi utilizado para transformar, mediante choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli* e os transformantes foram selecionados em placas com meio LB suplementado com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina.

2.5 Expressão em *E. coli*

Clones recombinantes foram usados para transformar por choque térmico a cepa de expressão *E. coli* Star. O produto da transformação foi repicado para meio LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, sendo deixado sob agitação de 200 rpm, a 37°C por 16h. Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para um novo meio LB com 100 µg/mL⁻¹ de ampicilina. Logo que crescida até a fase exponencial (densidade óptica entre 0,6 e 0,8 em um comprimento de onda de 600 nm) a expressão foi induzida por IPTG. As culturas, depois da adição do agente de indução, foram incubadas por mais 3h, a 37°C, sob agitação de 200 rpm, sendo, ao final, submetidas ao processo de centrifugação. A solubilização das proteínas foi realizada com tampão de purificação contendo 8M de ureia. As proteínas purificadas foram visualizadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e por *Western blotting* frente a MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase (1:6000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado a possibilidade de clonagem e expressão da proteína S1 em sistema procarioto com êxito. O gene sintético foi retirado do vetor pUC19 e ligado no vetor pAE. Além disso, a reação de PCR para amplificação do gene nativo resultou em uma banda esperada de aproximadamente 1500 pb (Figura 1) correspondente ao tamanho do gene da proteína S1.

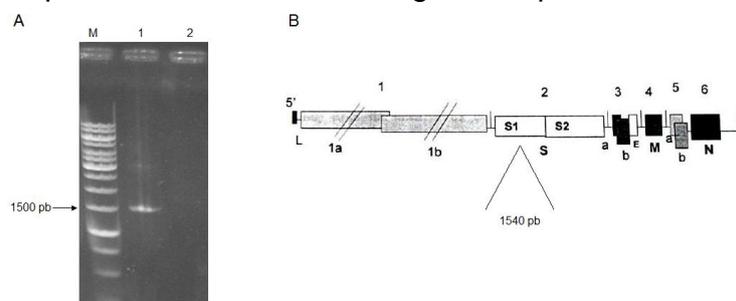


Figura 1. A) Amplificação do fragmento de 1540 pb correspondente a proteína S1. M: marcador de peso molecular de 1000 pb, 1: Gene S1, 2: Controle negativo. B) Esquema representativo do genoma completo do IBV. Fonte: OLIVEIRA, A. P. (2008).

A partir da transformação de ambos os genes em *E. coli* TOP10F, obteve-se muitas colônias transformantes. Verificou-se a expressão de uma proteína de aproximadamente 40 KDa por SDS-PAGE, e pode-se constatar que a proteína formou corpos de inclusão que foram eficientemente solubilizados com 8M de uréia. A proteína foi caracterizada por *Western blotting* frente a MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase (Figura 2).

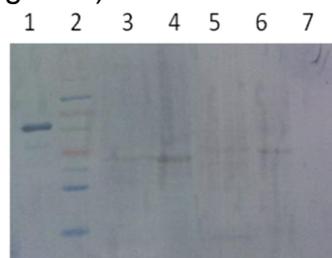


Figura 2. *Western blotting* da expressão do gene sintético e nativo da proteína S1 frente a MAb anti-his-tag. 1 - controle positivo; 2 - marcador; 3 - S1 sintético solubilizado em ureia 8M; 4 - S1 sintético induzido; 5 - S1 nativo solubilizado em ureia 8M; 6 - S1 nativo induzido; 7 - controle negativo (*E. coli* Star).

4. CONCLUSÕES

Estes resultados demonstram sucesso na expressão do antígeno recombinante S1 em *E. coli* tanto na sua forma sintética como nativa, confirmando que a expressão de proteínas recombinantes é uma alternativa viável na obtenção de antígenos virais purificados. Além disso, a proteína S1 tende a ser um antígeno de grande importância em ensaios de imunoprofilaxia e imunodiagnóstico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVANAGH, D.; D AVIS, P.J.; COOK, J.K.A. *Infectious bronchitis vírus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype*. **Avian Pathology**, v.21, p.401- 408, 1992.

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

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

FINGER, P.F., **Expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em sistemas procaríoto e eucarioto para utilização em imunodiagnóstico**. 2011. Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva).

KEELER, C.L.; REED, K.L.; NIX, W.A.; 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, p.292-296, 2006.

OLIVEIRA, A.P. **Expressão da proteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *saccharomyces cerevisiae* para aplicação no imunodiagnóstico**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

PENA, L.J.; SANTOS, B.M.; ROBERTI, R.P.; MARIN, S.Y. *Bronquite infecciosa das galinhas*. Artigo de revisão. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.397-404, 2005.