

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FRENTE À NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO¹; PAULA FONSECA FINGER¹; EMILI GRIEP¹;
RAFAEL AMARAL DONASSOLO¹; PAULO AUGUSTO ESTEVES²; FABRICIO
ROCHEDO CONCEIÇÃO¹

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - morganaludtke@gmail.com;
fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

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

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é um setor econômico em permanente ascensão no agronegócio nacional, e atualmente, o Brasil está entre os três maiores produtores de frango de corte do mundo, atrás somente dos EUA e da China (OIE, 2013). Em vista desse quadro, são necessários maiores cuidados para manter a sanidade das aves e evitar doenças que podem causar prejuízos para o produtor.

Dentre as inúmeras enfermidades que podem acometer a população aviária e causar perdas econômicas, destaca-se a bronquite infecciosa das galinhas (BIG). A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), um *Coronavírus* pertencente à família *Coronaviridae*, o qual é composto por quatro proteínas estruturais: nucleoproteína (N), de membrana (M), de superfície (S) e do envelope (E) (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo (MCKINLEY *et al.*, 2008) e, geralmente, é alvo de estudos relacionados ao diagnóstico, uma vez que apresenta uma sequência conservada entre diferentes sorotipos do vírus. Além disso, trata-se de uma molécula imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (WILLIAMS *et al.*, 1992). Dessa maneira, a proteína N é uma forte candidata a ser utilizada como antígeno em métodos de diagnóstico sorológicos para detecção de anticorpos para a BIG. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais (MAbs) é de grande importância para incrementar o diagnóstico clínico. Ensaios sorológicos, como ELISA de captura, podem ser utilizados para detecção do antígeno em amostras clínicas, tornando o diagnóstico mais rápido e específico.

Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi produzir anticorpos monoclonais contra a proteína N do VBIG para serem posteriormente utilizados em ensaios imunológicos para diagnóstico da enfermidade.

2. METODOLOGIA

2.1 Clonagem da proteína N e preparação do antígeno

A partir da suspensão do líquido cório-alantóide infectado pelo vírus (LCA), foi extraído o RNA viral da estirpe M41 do IBV (Massachusetts), obtendo-se o cDNA por transcrição reversa (RT). Em seguida, o gene que codifica para a proteína N foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Com base na sequência do gene que codifica para a proteína N do IBV (GenBank nº de acesso - M28566) foram desenhados os *primers forward* e *reverse* para que ocorresse a devida amplificação do gene de interesse. Sítios de clivagem para as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI* foram introduzidos no *primer forward* (5'-CCGCTCGAGATGGCAAGCGGTAAGGCAA – 3') e *reverse* (5' – GGGGTACCTCAAAGTTCATTCTCTCCTA – 3'), respectivamente.

O produto de amplificação foi purificado através do GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, o produto da PCR e o vetor de expressão em *Escherichia coli*, pAE, foram digeridos com enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*, e em seguida, ligados com T4 DNA – ligase (Thermo Scientific). O produto resultante de reação de 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 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich).

O plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse foi propagado em *E. coli* BL21 Star e cultivado em meio Luria Bertani contendo 100 µg/mL ampicilina. O cultivo, depois da adição do agente de indução IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), foi incubado por 3 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. O *pellet* celular obtido da expressão foi ressuspensionado em tampão de lavagem Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) adicionado de lisozima (Sigma Aldrich), submetido à sonicação por sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e o sobrenadante coletado para posterior análise da expressão.

2.2 Produção de anticorpo monoclonal para proteína N recombinante de VBI

Para realizar a produção dos MAbs, utilizou-se camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com seis semanas de idade, que foram inoculadas intraperitonealmente (i.p) com 100 µg de proteína recombinante (rN) homogeneizada (1:1) com adjuvante completo de Freund (ACF, Sigma Aldrich). Passadas duas semanas, realizou-se uma segunda inoculação da rN acrescida de adjuvante incompleto de Freund (AIF, Sigma Aldrich) e seguiu-se a administração via i.p semanalmente, por mais 8 semanas. Nos três dias antes que antecederam a última inoculação, o camundongo que demonstrou um maior título de anticorpos em ELISA indireto realizado com a proteína rN, recebeu um “booster” de imunizações com a proteína recombinante via i.p. e intravenosa.

No dia da fusão, o animal inoculado sofreu eutanásia e o baço foi removido em ambiente estéril. O baço foi macerado em meio de cultivo incompleto (MI), centrifugado a 1000 x g por 8 min e as células suspendidas em MI, e repetiu-se a centrifugação. Ao final de três centrifugações para a remoção dos debris, as células foram suspendidas em 10 mL de MI. Após as lavagens, os esplenócitos foram fusionados com células de mieloma Sp2/O-Ag14 na presença de 50% (w/v) de polietilenoglicol (PEG) 1450 (Sigma), adicionado durante 1 minuto e, em seguida, um volume de 9 mL de MI foi acrescentado durante 5 minutos. As células foram centrifugadas a 1000 x g por 10 min, e, em seguida, foram ressuspensionadas em 50 mL de meio DMEM contendo hipoxantina (1x10⁻⁶M), aminopterina (4x10⁻⁹M), timidina (1,6x10⁻⁷M) (HAT; Sigma) e 20% de soro fetal bovino, sendo então distribuídas em 5 placas de cultivo celular (0,1 mL/cavidade). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂.

2.3 Caracterização dos anticorpos monoclonais

Os MAbs que reagiram positivamente com o antígeno da proteína N recombinante no ELISA indireto foram selecionados. Esses clones de hibridomas reagentes no ELISA foram inoculados nos camundongos previamente sensibilizados com Pristane (Sigma Aldrich) para produção de fluido ascítico. Os MAbs foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A- Sefarose (GE Healthcare), e a classe de cada MAb foi determinada

por ELISA utilizando o Kit de Isotipagem (Sigma). Após purificação, os MAbs foram titulados através de ELISA indireto com a proteína rN e quantificados por Qubit™ (Thermo Fisher Scientific).

Para a caracterização dos MAbs produzidos, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posterior análise por *Western blotting*, no qual a proteína rN, a amostra do vírus VBIG, e uma amostra do vírus da Boubá aviária foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL) e os MAbs testados. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em PBS-T por 1 h. Após três lavagens com tampão PBS-T, as membranas foram incubadas com dois diferentes MAbs anti-rN (B7 e E2) por 1 h. Posterior às lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-mouse IgG total conjugado com peroxidase diluído 1:4000 (Sigma) por 1 h, seguido pela reação de revelação de cor por DAB (3,3 diaminobenzidina, Sigma).

Além disso, também foi realizado um ELISA utilizando diferentes antígenos aviários, como o VBIG, a fim de detectar alguma possível reação inespecífica dos MAbs. Para isso, microplaca de 96 cavidades (Nunc MaxiSorp®) foi sensibilizada com uma dose da vacina contra Gumboro, uma dose da vacina contra Newcastle, uma dose da vacina contra BIG e 100 ng de rN. Após a sensibilização *overnight* a 4 °C, a placa foi lavada com solução de PBS-T por 3 vezes e bloqueada com solução de BSA 0,1% (Albumina bovina sérica em PBS-T), incubada por 1 hora a 37 °C. Os MAbs foram adicionados na diluição 1:500, incubando-se a placa por 1 hora a 37 °C. A placa foi novamente lavada e o conjugado anti-mouse IgG total foi adicionado na diluição de 1:4000, incubando por mais 1 hora a 37 °C. No último passo foram realizadas cinco lavagens e a reação foi revelada por adição de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride). A reação foi interrompida com a solução de H₂SO₄ 2 N e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento correspondente a 1200 pb do gene que codifica para a proteína N foi amplificado por RT-PCR (dados não mostrados). A rN foi expressa em *E. coli* cepa BL21 Star, extraída e purificada de forma solúvel, reagindo frente a soro monoclonal Anti-Histidina (Sigma-Aldrich) no *Western Blot* (Figura 1).

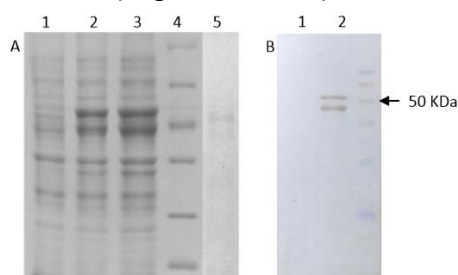


Figura 1. Análise da expressão da proteína rN. A- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% 1- cepa *E. coli* BL21 star, 2- Cultivo de rN não induzido, 3- Cultivo de rN induzido, 4- Marcador, 5- rN purificada B- *Western blot* frente à anti6xhis 1- Controle negativo, 2-Proteína rN, 2- Marcador

Após a última imunização com a proteína rN, os soros dos camundongos foram titulados por ELISA indireto, o animal que apresentou título mais alto (1:25.600), foi escolhido para realizar a fusão. Foram adquiridos cinco MAbs (B7, E2, D3, F5, F4), imortalizados produtores de anticorpos contra a proteína rN. Na análise de isotipagem verificou-se que todos os MAbs são do subtipo IgM. Porém, apenas 3 hibridomas (B7, D3 e E2), que foram obtidos de clonagens diferentes e continuaram reagindo positivamente no ELISA indireto contra rN, foram utilizados em caracterizações posteriores. Os hibridomas selecionados foram expandidos em tumores ascíticos em camundongos para a obtenção de maior quantidade de

MAbs. Em seguida, os MAbs foram purificados através de cromatografia de afinidade em colunas de proteína A. Na análise de SDS-PAGE foram utilizados 3 MAbs e para o *Western Blot* utilizou-se 2 MAbs para verificar reação dos mesmos frente ao VBIG, rN e vírus da Bouda, os quais demonstraram um padrão de bandas característico de anticorpo da classe IgM (Figura 2), já que é possível observar duas bandas do mesmo padrão do isotipo IgM, o qual foi utilizado como controle no gel.

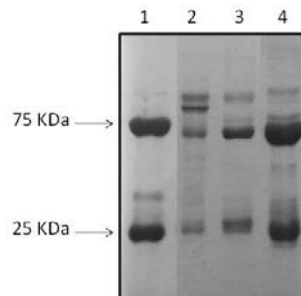


Figura 2. Análise dos MAbs por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. 1- Anticorpo IgM (controle), 2- MAb BIG-rN D3, 3- Mab BIG-rN b7, 4- MAb BIG-rN E2

Para verificar a especificidade dos anticorpos produzidos, foram utilizados os MAbs B7, E2 e D3, demonstrando em todos uma maior reação frente à rN e VBIG, ao contrário dos vírus de Newcastle e Gumboro que obtiveram baixa reação (dados não mostrados).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que os anticorpos monoclonais produzidos neste estudo foram específicos para a proteína N recombinante de VBIG, sendo possível sua utilização em teste de diagnóstico, facilitando a detecção da enfermidade na população aviária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOZO, R.M., MARTINS, N.R.S., RESENDE, J.S., RESENDE, M., TEIXEIRA, A.A.P., JORGE, M.A., SOUZA, M.B., EPIPHANIO, E.O.B. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec**, v. 53. P.290-298, 2010

DI FABIO J and ROSSINI LI. Bronquite infecciosa das galinhas. **Doenças das aves**, Campinas: Facta, 2000

HAN, Z., ZHAO, F., SHAO, Y., LIU, X., KONG, X., SONG, Y., LIU, S. Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. **Virus Research**. v. 171, p. 54-64, 2013

MCKINLEY, E.T.; HILT, D. A.; JACKWOOD M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v.26, p.1274-1284, 2008

OIE. **Avian InfectiousBronchitis**. 2013. Acessado em: 10 ago 2016. Online. Disponível em: <http://www.oie.int>

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