



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE  
p27 (r-p27) DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA E PRODUÇÃO DE IgY  
AVIÁRIA CONTRA A r-p27 PARA UTILIZAÇÃO EM  
IMUNODIAGNÓSTICO**

**Nadia Rossi de Almeida**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE  
p27 (r-p27) DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA E PRODUÇÃO DE IgY  
AVIÁRIA CONTRA A r-p27 PARA UTILIZAÇÃO EM  
IMUNODIAGNÓSTICO**

**NADIA ROSSI DE ALMEIDA**

*Sob orientação do professor*

**Dr. Carlos Mazur**

*e Co-orientação da professora*

**Dra. Maria das Graças Miranda Danelli**

Tese de doutorado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2013

636.8089691

A447c

T

Almeida, Nadia Rossi de, 1980-

Clonagem e expressão da proteína recombinante p27 (r-p27) do vírus da leucemia felina e produção de IgY aviária contra a r-p27 para utilização em imunodiagnóstico / Nadia Rossi de Almeida - 2013.

87 f. : il.

Orientador: Carlos Mazur.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Sanidade Animal.

Bibliografia: f. 54-70.

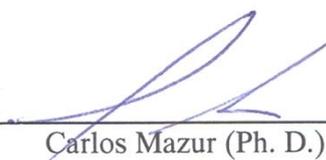
1. Gato - Doenças - Diagnóstico - Teses. 2. Gato - Imunologia - Teses. 3. Imunologia veterinária - Teses. 4. Animais domésticos - Doenças - Teses. I. Mazur, Carlos, 1960-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Sanidade Animal. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

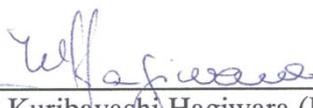
**NADIA ROSSI DE ALMEIDA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

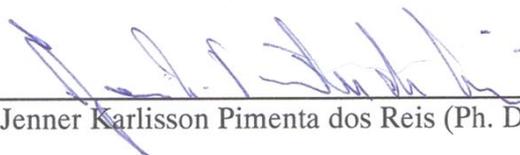
TESE APROVADA EM 20/02/2013.



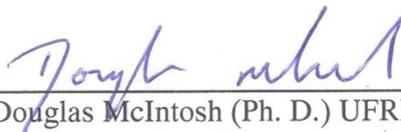
Carlos Mazur (Ph. D.) UFRRJ



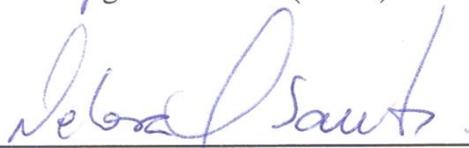
Mitika Kuribayashi Hagiwara (Ph. D.) USP



Jenner Karlisson Pimenta dos Reis (Ph. D.) UFMG



Douglas McIntosh (Ph. D.) UFRRJ



Débora Regina Lopes dos Santos (Ph. D.) UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para a realização deste projeto:

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus pais pelo incentivo em todos os aspectos da minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Carlos Mazur, e co-orientadora, Dra. Maria das Graças Miranda Danelli, por mais uma oportunidade e confiança depositadas.

Agradeço e sempre irei agradecer à professora Mitika Kuribayashi Hagiwara, pesquisadora a qual tenho profunda admiração e que foi a primeira incentivadora de todos os projetos relacionados às doenças infecciosas de felinos.

Como o convívio no ambiente de trabalho é muito importante para o sucesso de um projeto, agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Imunologia e Víruses da UFRRJ.

Agradeço às equipes dos laboratórios onde este projeto foi realizado, em especial ao Laboratório de Tecnologia Recombinante do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – LATER/BioManguinhos/Fiocruz, destacando a grande colaboração do Dr. Marco Alberto Medeiros, Dra. Ana Carolina Magalhães Andrade, Msc. Ana Paula Corrêa Argondizzo e Msc. Mateus Dalcin Luchese.

Meus agradecimentos também aos pesquisadores que colaboraram direta ou indiretamente com este projeto: Dr. Douglas McIntosh (UFRRJ), Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza (IOC- Fiocruz), Dra. Débora Regina Lopes dos Santos (UFRRJ), Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis (UFMG), Msc. Fabiana Alves (UFMG), Dr. João Pessoa de Araújo Júnior (UNESP- Botucatu), Dr. Sandro Antonio Pereira (IPEC-Fiocruz), Dr. Marcelo Alves Pinto (IOC- Fiocruz), Msc. Gentil Arthur Vasconcelos (IOC- Fiocruz), Dr. Armando Salles (UFRRJ), Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima (UFRRJ).

Aos proprietários dos gatos, que sempre foram solícitos, permitindo as coletas de sangue. É claro que agradeço também aos gatos, que mesmo contra a vontade, doaram as amostras para a realização dos experimentos.

Ao meu namorado, Luís Cláudio Jordão da Cruz, pela paciência e companheirismo durante estes anos.

Agradeço à Capes pelo suporte financeiro.

Com certeza, estou esquecendo de agradecer mais pessoas que colaboraram para a realização deste projeto, portanto, saibam que sinto-me grata por toda a ajuda.

## RESUMO

ALMEIDA, Nadia Rossi. **Clonagem e expressão da proteína recombinante p27 (r-p27) do vírus da leucemia felina e produção de IgY aviária contra a r-p27 para utilização em imunodiagnóstico.** 2013. 87p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV) é um membro da família Retroviridae, gênero *Gammaretrovirus*, que representa uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os gatos domésticos. No Brasil, o acesso ao diagnóstico da Leucemia Viral Felina ainda é restrito devido ao alto custo do teste comercial disponível, que detecta o antígeno viral p27. Para utilização em imunodiagnóstico, a IgY aviária apresenta uma série de vantagens sobre os anticorpos IgG de mamíferos, como o baixo custo da técnica e manutenção dos animais, alto rendimento dos anticorpos purificados e caráter bioético. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de uma proteína de nucleocapsídeo viral p27 recombinante, a r-p27, para eliciar anticorpos aviários, visando contribuir com o imunodiagnóstico das infecções pelo FeLV no país. Esta tecnologia poderá possibilitar o acesso ao diagnóstico e a melhor compreensão dos estudos de prevalência da infecção. Para tanto, a região codificante da p27 nativa do FeLV foi amplificada, clonada e expressa em *Escherichia coli*, e sua reatividade contra os anticorpos para p27 nativa foi verificada com o *kit* comercial de imunocromatografia. A r-p27 foi inoculada em coelhos e galinhas, para produção de IgG e IgY específicas, respectivamente. Estes anticorpos foram avaliados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) contra a p27 nativa, em esfregaços de sangue de animais positivos e negativos para o FeLV. Ambos os tipos de imunoglobulinas apresentaram reatividade para a p27 recombinante e nativa do FeLV. A produção de IgY para a r-p27 representou um método de alto rendimento e baixo custo, promissor para o desenvolvimento de imunodiagnóstico da Leucemia Viral Felina.

**Palavras-chave:** FeLV, imunodiagnóstico, IgY.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Nadia Rossi. **Cloning and expression of p27 protein (r-p27) of Feline Leukemia Virus and avian IgY production against the r-p27 to immunodiagnostic application.** 2013. 87p. Thesis (Doctoral Thesis in Veterinary Science, Animal Health). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Feline Leukemia Virus (FeLV) is a gammaretrovirus, which represents an important cause of morbidity and mortality among domestic cats. In Brazil, the access to feline leukemia diagnosis is still limited due to the high cost of available commercial test to detect the viral antigen p27. The production of avian IgY instead of mammal IgG has several advantages, like lower costs of the technique, easier animal maintenance, high yields of purified antibodies and better acceptance due to bioethical characteristics. The aim of this study was the development of a recombinant viral p27 protein, the r-p27, to elicit avian antibodies, aiming to enable immunodiagnosis of FeLV infections. This technology can provide access to diagnosis and better understanding of prevalence studies. For this purpose, the coding region of the FeLV p27 protein was cloned and expressed in *Escherichia coli* and the reactivity against anti-p27 antibody was proven before commercial immunochromatography *kit*. To obtain IgG and IgY anti-p27, r-p27 was inoculated into rabbits and chickens, respectively, and the antibodies produced were tested by indirect immunofluorescence (IFA). Both immunoglobulins showed reactivity against recombinant and native p27. The production of IgY against r-p27 represents a method of high yields of purified antibodies and low cost, promising for the development of immunodiagnosis.

**Key words:** FeLV, immunodiagnosis, IgY.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação do DNA proviral do FeLV. Adaptado de Bolin e Levy (2011). .....2
- Figura 2: Representação da IgG de mamífero e IgY aviária. A seta indica a região de dobradiça, presente somente na IgG. Adaptado de Greunke et al. (2008). ..... 12
- Figura 3: Mapa do vetor pET 101/D-TOPO apresentando a origem de replicação (ori), o repressor lac (*lacI*), o gene de resistência à ampicilina (Ampicillin) e o sítio de múltipla clonagem, contendo o promotor T7, local de expressão da cauda de histidina e extremidade coesiva para ligação do inserto e ação da topoisomerase (*Life Technologies*<sup>TM</sup>). ..... 20
- Figura 4: Produto da amplificação por PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: Amplificação do DNA genômico total de um gato infectado pelo FeLV, indicando o produto de 744 pb referente à região codificante p27; canaleta 2: Marcador de peso molecular TrackIt øx174 RF DNA digerido com HAEIII (Invitrogen). ..... 30
- Figura 5: Análise da extração de DNA plasmidial em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo para a seleção dos clones recombinantes. Canaletas 1 e 2: DNA plasmidial dos clones 12 e 13, selecionados para o sequenciamento nucleotídico; canaletas 3 a 9: DNA plasmidial recircularizados dos clones bacterianos; MW: marcador de peso molecular pET 101 recircularizado. .... 31
- Figura 6: Análise da expressão da r-p27 em gel SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: extrato celular sem indução de expressão; canaleta 2: extrato celular induzido com IPTG a 0,5 mM. MW: marcador de peso molecular Bench Marker<sup>TM</sup> Protein (Life Technologies)..... 33
- Figura 7: Purificação da rp27 em gel SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: precipitado celular; canaleta 2: lisado; canaleta 3: *void*; canaleta 4: eluição com imidazol a 5mM; canaleta 5: eluição com imidazol a 40mM 1ª lavagem; canaleta 6: eluição com imidazol a 40mM 2ª lavagem; canaleta 7: eluição com imidazol a 40mM 3ª lavagem; canaleta 8: eluição com imidazol a 80mM 1ª lavagem; canaleta 9: eluição com imidazol a 80mM 2ª lavagem.; canaleta 10: eluição com imidazol a 120mM 1ª lavagem; canaleta 11: eluição com imidazol a 120mM 2ª lavagem; canaleta 12: eluição com imidazol a 250 mM 1ª lavagem; canaleta 13: eluição com imidazol a 250mM 2ª lavagem; canaleta 14: eluição com imidazol a 1M 1ª lavagem; canaleta 15: eluição com imidazol a 1M 2ª lavagem. MW: marcador de peso molecular Bench Marker<sup>TM</sup> Protein (Life Technologies). 34
- Figura 8: Quantificação da r-p27 em SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: r-p27 quantificada pelo método de Lowry; canaleta 2: r-p27 quantificada pelo método de BCA; canaleta 3: r-p27 quantificada por nanoprop; canaleta 4: BSA a 0,1 mg/mL; canaleta 5: BSA a 0,2 mg/mL; canaleta 6: BSA a 0,4 mg/mL..... 36
- Figura 9: Gel SDS-PAGE a 12,5% para a avaliação da adsorção da r-p27 ao hidróxido de alumínio. Canaleta 1: BSA a 2,0mg/mL; canaleta 2: BSA a 1,0mg/mL; canaleta 3: BSA a 0,8mg/mL; canaleta 4: BSA a 0,4 mg/mL; canaleta 5: BSA a 0,2mg/mL; canaleta 6: BSA a 0,1 mg/mL; canaleta 7: r-p27 antes da adsorção ao hidróxido de alumínio; canaleta 8: r-p27 8h depois da adsorção ao hidróxido de alumínio. MW: marcador de peso molecular Bench Marker<sup>TM</sup> Protein (Life Technologies). ..... 39

- Figura 10: *kit* comercial de diagnóstico imunocromatográfico (SNAP *combo* FIV/FeLV® -IDEXX Laboratories). Reatividade dos anticorpos anti-p27 nativa contra a r-p27 evidenciada pelo surgimento de um círculo azul na membrana de imunocromatografia, no mesmo local correspondente a uma amostra positiva para o FeLV (seta). O círculo central representa o controle positivo da reação. ....40
- Figura 11: Caracterização da IgY obtida pelo método de extração PEG- 6000 por SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: IgY purificada, sob condição não redutora; canaleta 2: IgY padrão (Sigma), sob condição não redutora; canaleta 3: IgY padrão (Sigma), sob condição redutora; canaleta 4: IgY purificada, sob condição redutora. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad. ....41
- Figura 12A: Reatividade da IgG para a r-p27 por WB nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad. ....43
- Figura 12B: Reatividade da IgY para a r-p27 por WB nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad. ....43
- Figura 13A: Reatividade da IgG para a r-p27 por *Dot-Blot* nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2 diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. ....44
- Figura 13B: Reatividade da IgY para a r-p27 por *Dot-Blot* nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. ....44
- Figura 14: Esfregaços de sangue utilizados para a avaliação da reatividade da IgG e IgY para a p27 nativa do FeLV. 14A: Leucócitos apresentando fluorescência, revelando reatividade da IgG para a p27 nativa do FeLV na diluição 1:10; 14B: Leucócitos apresentando fluorescência, revelando reatividade da IgY para a p27 nativa do FeLV na diluição 1:100; 14C: controle do conjugado; 14D: controle positivo utilizando *kit* comercial de IFI. Aumento de 100x. ....45

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: : Estabilidade da r-p27 armazenada em condições de estocagem a 4 °C, -20 °C e -70 °C, durante 240 dias..... 38
- Gráfico 2: Concentrações de IgY total purificada da gema do ovo em 56 dias, quantificada pelo método de *Bradford*..... 42

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Ocorrência do FeLV em diversas regiões do Brasil.....	6
Quadro 2: Ocorrência do FeLV em diversas regiões do mundo .....	6
Quadro 3: Aplicação da IgY no imunodiagnóstico e/ou na imunoterapia de humanos e animais .....	13

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de lavagens com diferentes concentrações de imidazol para a eluição da r-p27.....	24
Tabela 2: Valores da concentração da r-27 de acordo com os métodos de quantificação empregados.....	35
Tabela 3: Rendimento da r-p27 purificada.....	37
Tabela 4: Valores das concentrações de r-p27 em condições de estocagem a 4 °C, -20 °C e -70°C, durante 240 dias .....	38

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius  
µg – microgramas  
µL - microlitros  
APCs – células apresentadoras de antígeno  
BCA (*Bicinchoninic acid assay*, Sigma®)  
pb – pares de base  
CFA – adjuvante completo de *Freund*  
CH1, CH2, CH3 e CH4 – domínios constantes da cadeia pesada da IgY  
CL – domínio constante da cadeia leve da IgY  
cm – centímetro  
CpG - C-fosfato-guanosina  
CpG-ODN – oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina  
DAB – diaminobenzidina  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) - Ensaio de imunoabsorção enzimática  
*env* – envelope  
FELIX – proteína co-fator  
FeLV - Vírus da Leucemia Felina  
fePit1 – proteína transportadora de fosfato 1  
fePit2 – proteína transportadora de fosfato 2  
FeTHTR1 – proteína transportadora de tiamina  
FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina  
FLVCR – proteína transportadora heme  
g – grama  
*gag (group antigen specific)*- antígeno específico do grupo  
gp70 – glicoproteína 70  
IFA – adjuvante incompleto de *Freund*  
IFI – Imunofluorescência indireta  
IFN-γ – interferon gama  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
IgY – Imunoglobulina Y  
IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) – coluna de afinidade por níquel  
IPTG – isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosídeo  
kDa – Kilo daltons  
kg - quilograma  
kV – quilovolts  
LTR - *Long Terminal Repeat*  
mg – miligrama  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
ms – milisegundo  
ng – nanograma  
nm – nanômetro  
OD – densidade ótica

p10 – proteína 10  
p12 – proteína 12  
p15 – proteína 15  
p15E - proteína 15E  
p27 - proteína 27  
PCR (*polimerase chain reaction*) - Reação em Cadeia da Polimerase  
PEG – polietilenoglicol  
pET (*plasmid for expression by T7 RNA polimerase*) – plasmídeo  
pH – potencial de Hidrogênio  
*pol* - polimerase  
RIA - radioimunoensaio  
RNA - ácido ribonucleico  
r-p27 – proteína recombinante p27  
rpm – rotações por minuto  
SU – *surface glycoprotein*  
TA – temperatura ambiente  
TLR – receptor Toll-like  
TR – transcriptase reversa  
U – unidade  
UV – ultravioleta  
V – volt  
VH – domínio variável da cadeia pesada da IgY  
VL – domínio variável da cadeia leve da IgY  
WB – western blot  
WFI (*water for injection*) – água de injeção  
 $\mu\text{F}$  – microfarads  
 $\mu\text{m}$  – micrometro  
 $\rho\text{mol}$  – picomol  
 $\chi^2$  - teste de qui-quadrado  
 $\Omega$  – Ohm

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Leucemia Viral Felina .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Vírus da Leucemia Felina (FeLV).....	2
2.1.2 Transmissão .....	3
2.1.3 Classificação da patogenia pelo FeLV .....	3
2.1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais .....	4
2.1.5 Epidemiologia.....	5
2.1.6 Diagnóstico.....	7
2.1.7 Controle e Profilaxia.....	7
<b>2.2 Tecnologia de DNA recombinante em imunodiagnóstico .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> .....	9
2.2.2 Sistema pET TOPO de expressão.....	10
<b>2.3 A tecnologia IgY .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 A descoberta da IgY .....	10
2.3.2 Estrutura molecular da IgY.....	11
2.3.3 Aplicações da IgY na Medicina Veterinária e Humana .....	12
2.3.4 Protocolos de imunização com a IgY .....	13
2.3.5 Adjuvantes empregados na imunização de galinhas .....	14
2.3.6 Métodos de purificação da IgY .....	15
2.3.7 A tecnologia IgY no imunodiagnóstico do FeLV .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. 1 Produção da p27 recombinante.....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Bioinformática .....	19
3.1.2 Clonagem molecular da região codificante da p27 .....	19
3.1.3 Expressão da rp27.....	22
3.1.4 Avaliação de solubilidade.....	23
3.1.5 Purificação da rp27 solúvel .....	23
3.1.6 Dessalinização da amostra.....	24
3.1.7 Quantificação da rp27 purificada .....	24
3.1.8 Avaliação da estabilidade protéica .....	23
3.1.9 Preparo do inóculo para as imunizações.....	24
3.1.10 Reatividade da r-p27 contra anticorpos anti-p27 nativa.....	25
<b>3.2 Produção de anticorpos para a r-p27 .....</b>	<b>25</b>

3.2.1 Animais e inoculações .....	25
3.2.2 Processamento dos ovos e método de extração da IgY aviária .....	26
3.2.3 Quantificação da IgY .....	27
3.2.4 Caracterização da IgY por eletroforese .....	27
3.2.5 Avaliação da produção e da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a r-p27 por <i>Western Blot</i> (WB) .....	27
3.2.6 Avaliação da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a p27 nativa por IFI.....	28
<b>3.3 Análise estatística .....</b>	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Produção da p27 recombinante.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Clonagem molecular da região codificante da p27 .....	30
4.1.2 Expressão da rp27.....	33
4.1.3 Purificação da rp27 solúvel .....	34
4.1.4 Quantificação da r-p27 purificada .....	35
4.1.5 Cálculo do rendimento da r-p27 purificada.....	37
4.1.6 Avaliação da estabilidade da r-p27.....	38
4.1.7 Preparo dos inóculos para as imunizações .....	39
4.1.8 Reatividade da r-p27 contra anticorpos anti-p27 nativa.....	40
<b>4.2 Produção de anticorpos anti-rp27 em animais de laboratório .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Caracterização da IgY .....	41
4.2.2 Quantificação da IgY.....	42
4.2.3 Avaliação da produção e reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a r-p27 por <i>Western Blott</i> (WB) .....	43
4.2.4 Avaliação da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a p27 nativa por IFI .....	44
<b>4.3 Análise estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Viral Felina é a maior causa de morte dentre as doenças infecciosas que acometem os felinos. É causada por um retrovírus denominado FeLV (vírus da Leucemia Felina), responsável pelo desenvolvimento de distúrbios degenerativos e/ou proliferativos (neoplásicos) nos animais infectados, que sucumbem à doença devido à imunossupressão causada por este vírus. O FeLV foi isolado pela primeira vez em 1964, por Willian Jarrett e sua equipe, enquanto pesquisavam a causa de linfomas em gatos domésticos de um abrigo na Escócia (HARDY et al., 1976a; JARRETT et al., 1973; JARRETT, 1999).

O FeLV está amplamente disseminado ao redor do mundo e a ocorrência da infecção está associada aos fatores de risco e às medidas de controle e profilaxia. No Brasil, a prevalência da infecção é alta, discordando de muitos países europeus e americanos, onde a incorporação de testes de diagnóstico na primeira consulta veterinária e a vacinação dos animais de grupos de risco vem reduzindo a incidência da infecção (ALMEIDA et al. 2012).

O diagnóstico do FeLV no Brasil ainda apresenta restrições, principalmente devido ao elevado custo do *kit* comercial imunocromatográfico para a detecção do antígeno p27, uma proteína de capsídeo viral. Além do elevado custo, há necessidade de repetição do teste, caso o mesmo apresente um resultado positivo, uma vez que é capaz de detectar uma viremia primária não associada às células, podendo ainda haver a eliminação viral pelo hospedeiro (CRAWFORD, 2011; ALMEIDA et al., 2012).

A tecnologia de produção de proteínas recombinantes vem sendo utilizada com diferentes propósitos, incluindo funcionais, bioquímicos, diagnósticos e até terapêuticos. A produção de proteínas recombinantes em bactérias apresenta a vantagem de ser rápida e de possibilitar a obtenção de proteínas em larga escala (JONASSON et al., 2002). Como a maioria das técnicas de diagnóstico para a infecção pelo FeLV é baseada na detecção da p27, esta tecnologia pode representar uma alternativa interessante para produção e purificação deste antígeno.

Uma série de aspectos indicam a IgY aviária como anticorpo de eleição para uma variedade de campos da pesquisa. A tecnologia de IgY apresenta diversas vantagens, como a facilidade de manejo das aves, facilidade de coleta de ovos, menor custo, purificação relativamente simples e o maior rendimento, sem contar com as características relacionadas ao bem-estar animal, onde não há a necessidade de fazer a sangria para obtenção dos anticorpos (SPILLNER et al., 2012).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a obtenção de um antígeno recombinante da proteína de nucleocapsídeo viral p27 do FeLV (r-p27), capaz de estimular a produção de IgY aviária específica, para contribuir com o desenvolvimento no imunodiagnóstico da Leucemia Viral Felina no Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

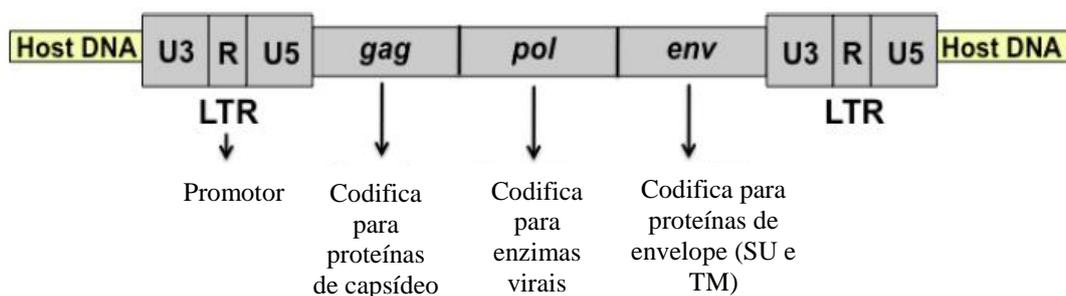
### 2.1. Leucemia Viral Felina

#### 2.1.1 Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

O FeLV é um retrovírus do gênero *Gammaretrovirus* que acomete felinos domésticos e silvestres, causando doença grave e fatal. Os gatos infectados podem desenvolver distúrbios proliferativos e/ou degenerativos (JARRETT, 1999; MIYAZAWA, 2002; ROJKO; HARDY, 1994).

O vírus possui envelope lipoprotéico derivado da membrana citoplasmática das células infectadas durante o processo de brotamento e o seu genoma é constituído por duas cópias de RNA fita simples, com polaridade positiva. Durante o processo de replicação, o RNA viral é submetido à ação da transcriptase reversa (TR), originando o DNA proviral que, por sua vez, se integrará ao genoma celular, pela ação da enzima integrase. A integração do genoma viral ao celular é responsável pela persistência da infecção, característica das retroviroses (JARRETT, 1999).

O provírus contém sequências repetitivas (*Long Terminal Repeat* - LTR) nas extremidades 5' e 3', com funções regulatórias e de controle da expressão dos genes virais. Entre as LTRs, na região intermediária do genoma viral, encontram-se os genes *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* (*group antigen specific*) codifica as proteínas do capsídeo: p15c, p12, p10 e p27, sendo esta última encontrada em maior abundância no plasma de gatos virêmicos, sendo utilizada no diagnóstico sorológico da infecção. O gene *pol* (*polimerase*) codifica as enzimas transcriptase reversa e integrase, enquanto que o gene *env* (*envelope*) codifica as proteínas de envelope gp70 e transmembrana p15E (HARTMANN, 2006; FIGUEIREDO; ARAÚJO Jr, 2011; ROJKO; HARDY, 1994) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação do DNA proviral do FeLV. Adaptado de Bolin e Levy (2011).

Dentre as glicoproteínas do envelope viral, a gp70 é a responsável pela adsorção do *virion* à célula hospedeira, permitindo a introdução do nucleocapsídeo e a replicação posterior do genoma viral (COFFIN, 1996). Ademais, a gp70 é alvo de anticorpos neutralizantes do hospedeiro. A proteína transmembrana (TM) p15E, está envolvida com a imunossupressão e a anemia induzidas pelo FeLV (AUGUST, 1992).

O FeLV apresenta 4 subgrupos virais: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T, identificados geneticamente de acordo com diferenças no gene da SU (proteína de superfície) e, funcionalmente, pela utilização de diferentes receptores para entrada na célula hospedeira (OVERBAUGH; BANGHAM, 2001).

O FeLV-A é a forma transmissível e se apresenta como o menos patogênico para os gatos infectados, e tem se mostrado altamente conservado geneticamente durante décadas e em diferentes regiões geográficas (DONAHUE et al., 1988). O FeLV-A tem como receptor FeTHTR1 (uma proteína transportadora de tiamina) para adsorção na célula hospedeira (MENDONZA et al., 2006).

O FeLV-B está geralmente associado ao desenvolvimento de linfomas e surge a partir de uma recombinação do provírus do FeLV-A integrado ao genoma celular com sequências retrovirais endógenas incompletas, presentes em todos os felinos (enFeLV) (BOLIN; LEVY, 2011; ANAI et al., 2012). O FeLV-B utiliza duas proteínas transportadoras de fosfato, a fePit1 e a fePit2, para sua entrada na célula hospedeira. Aproximadamente 30% dos gatos infectados apresentam este subgrupo, juntamente com o FeLV-A (BOLIN; LEVY, 2011; STEWART et al., 2011).

O FeLV-C é pouco prevalente e é derivado de mutações na sequência da SU do FeLV-A, causando anemia aplástica grave. Essas mutações levam o FeLV-C a utilizar como receptor funcional a proteína transportadora heme FLVCR (QUINGLEY et al., 2000).

O FeLV-T é oriundo de mutações na sequência do gene da SU de envelope do FeLV-A (DONAHUE et al., 1991). Além de requerer a mesma proteína transportadora de fosfato (fePit1) do FeLV-B, o FeLV-T necessita de um co-fator que permite a sua entrada na célula, a proteína FELIX. O FeLV-T tem tropismo por linfócitos T, gerando depleção linfóide e imunodeficiência (CHENG et al., 2007; OVERBAUGH, 1988).

### **2.1.2 Transmissão**

O reservatório principal do FeLV é o portador assintomático persistentemente infectado, que é capaz de eliminar até um milhão de partículas virais por mililitro de saliva (HARTMANN, 2006). Consequentemente, este vírus é transmitido pela convivência íntima e prolongada entre felinos saudáveis e portadores no mesmo ambiente, principalmente, pela saliva rica em partículas virais (LAPPIN, 1998; ROJKO; KOCIBA, 1991). A disseminação pela saliva é favorecida pelo comportamento social dos felinos, como hábitos de higiene mútua (por lambeduras) e uso comum de acessórios de comida e de água, que podem atuar como fômites (CRAWFORD, 2011; ROJKO; HARDY, 1994).

Outras formas de transmissão menos comuns ocorrem por meio da lágrima, placenta, leite, plasma, urina, fezes e formas iatrogênicas, como o uso de instrumentos contaminados e transfusão sanguínea (ARJONA et al., 2000; HARDY et al., 1976b; PACITTI et al., 1986). A transmissão por mordeduras também pode ocorrer, porém, é mais expressiva na transmissão do vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) (AUGUST, 1992). A transmissão transplacentária pode ocorrer caso a fêmea infectada esteja na fase virêmica durante a gestação, podendo resultar em reabsorção fetal ou aborto (HARDY et al., 1976a). Neste caso, filhotes que não se infectem *in utero* podem se infectar com o leite ou saliva maternos (AUGUST, 1992).

### **2.1.3 Classificação da patogenia pelo FeLV**

A infecção pelo FeLV foi classificada, de acordo com a evolução clínica, em três categorias: infecção regressiva, persistente e latente. Na infecção regressiva, ocorre replicação

nas portas de entrada do tecido nasofaríngeo e linfonodos regionais, na qual o animal produz uma efetiva resposta imune contra o vírus e este é eliminado (LEVY et al., 2008; ROJKO; HARDY, 1994). Cerca de 60% dos gatos apresentavam a infecção regressiva na qual a viremia era detectada pelo teste de ELISA (HARTTMANN, 2006)

Já na infecção persistente, há uma incapacidade de eliminação viral pelo sistema imune de 4 a 6 semanas, após a infecção. Neste caso, após o comprometimento da medula óssea, o vírus se dissemina por diversos epitélios e glândulas, tais como o epitélio intestinal e glândulas salivares (SPARKES, 1997). Cerca de 30% dos animais infectados desenvolvem a infecção persistente e geralmente sucumbem pelas doenças relacionadas ao FeLV, em um período de 3 a 5 anos, após o início da viremia (CRAWFORD, 2011; BARR, 1998; LINENBERGER; ABKOWITZ, 1995). Este tipo de infecção pode ser diagnosticada pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA e pela PCR.

Quando o animal apresenta viremia por mais de três semanas, o vírus alcança a medula óssea onde persiste integrado ao genoma das células, sob a forma de DNA proviral (PACITTI; JARRETT, 1985; PEDERSEN et al., 1984), caracterizando a infecção latente. As provas sorológicas são incapazes de detectar a infecção nesta fase, sendo a técnica de PCR recomendada para o diagnóstico, neste momento. Aproximadamente 30% dos gatos infectados podem desenvolver este tipo de infecção (ROJKO et al., 1982).

A utilização de técnicas de detecção do antígeno p27 e isolamento viral comumente apresentam resultados conflitantes. A comprovação da reativação viral em animais apresentando infecção regressiva originou o questionamento da sensibilidade dos testes de diagnóstico, levantando dúvidas quanto à patogenia do FeLV (TORRES et al., 2010; MADWEEL; JARRET, 1983; FIGUEIREDO; ARAÚJO Jr, 2011; HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2010).

Devido ao emprego de técnicas moleculares mais sensíveis, como a PCR em tempo real, as categorias de infecção foram reclassificadas. Este fato pode ser explicado principalmente pela identificação de gatos positivos para a presença de DNA proviral e RNA na ausência de viremia (FIGUEIREDO; ARAÚJO Jr, 2011).

De acordo com as análises de quantificação de DNA proviral, RNA viral, antigenemia (p27) e isolamento viral, HOFMANN-LEHMANN et al. (2008) reclassificaram as infecções pelo FeLV como:

- Infecção abortiva - ausência de DNA proviral, RNA viral, antígeno p27 e isolamento após contato;
- Infecção regressiva - níveis moderados de DNA proviral e RNA viral com antigenemia indetectável ou transiente. O DNA proviral é detectável ao longo da infecção porém o RNA viral pode ou não ser detectado;
- Infecção progressiva - níveis elevados de DNA proviral e RNA viral, antigenemia e isolamento viral constantes;
- Infecção latente - ausência de antigenemia e persistência do vírus com potencial de reativação na medula óssea.

Pesquisas mais recentes identificaram o DNA proviral integrado em linfomas de gatos não virêmicos, sugerindo que gatos com infecção regressiva contêm este DNA proviral do FeLV e que o desenvolvimento de linfomas pode estar associado com apenas a presença do provírus isoladamente (WEISS et al., 2010).

#### **2.1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais**

Os gatos naturalmente infectados pelo FeLV normalmente apresentam distúrbios associados à doenças proliferativas, incluindo linfomas e leucemias linfóides, mielóides ou

origem eritróide, e distúrbios degenerativos, como anemia e citopenias (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

A maioria dos gatos doentes apresenta distúrbios degenerativos induzidos pelo vírus, como alterações hematológicas, que podem ser representadas principalmente pelas anemias, leucopenias e trombocitopenias (ROJKO; KOCIBA, 1991) e diversos sinais clínicos como anorexia, prostração, emagrecimento progressivo, desidratação profunda, complexo estomatite-gengivite, distúrbios reprodutivos e neuropatias (CRAWFORD, 2011; HARDY et al., 1976b; HOOVER; MULLINS, 1991; SHELTON et al., 1989; SOUZA et al., 2003).

Algumas doenças imunomediadas também estão associadas à infecção pelo FeLV, incluindo anemia hemolítica pela coinfeção pelo *Mycoplasma haemofelis* (HAGIWARA et al., 1997; MACIEIRA et al., 2008), poliartrites e glomerulonefrites, devido à deposição de imunocomplexos nas articulações e rins (HARTMANN, 2006; ROJKO; HARDY, 1994). O caráter imunossupressor deste retrovírus pode favorecer as infecções secundárias, como pelos vírus da Rinotraqueíte e Calicivirose felinas, que se enquadram no Complexo Respiratório Viral Felino, bem como pelo vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (CRAWFORD, 2011; ROJKO; KOCIBA, 1991).

Muitos estudos sugerem a toxoplasmose e/ou a esporotricose como doenças concomitantes de gatos FIV e/ou FeLV positivos (HARTMANN, 2006), porém, estes dados nem sempre apresentam concordância com pesquisas realizadas no Brasil (SCHUBACH et al., 2004; LUCAS et al., 1998; SOUZA et al., 2005).

Como o FeLV é um vírus oncogênico, pode-se observar o desenvolvimento de linfomas, que são classificados de acordo com a sua localização em linfomas mediastínicos, multicêntricos, alimentares e extranodais, agravando o prognóstico e diminuindo a sobrevivência do animal infectado (HARDY, 1987; SOUZA et al., 2003). A literatura internacional relata que aproximadamente 25% dos gatos FeLV positivos irão desenvolver algum tipo de neoplasia (MOORE; OGILVIE, 2001), porém, os linfomas são constantemente diagnosticados na clínica de felinos no Brasil, cujas porcentagens estão acima das relatadas nestas pesquisas internacionais (ALMEIDA et al., 2009).

Em função do curso clínico, que pode ser longo e de difícil caracterização, e pelas alterações progressivas muitas vezes silenciosas da doença, o diagnóstico não pode ser determinado apenas pelos sinais, evidenciando a necessidade do diagnóstico laboratorial.

### **2.1.5 Epidemiologia**

O FeLV está amplamente distribuído pelo mundo e a prevalência da infecção depende de fatores como a população testada (sadios ou doentes), número de amostras e a técnica de diagnóstico adotada.

No Brasil, levantamentos epidemiológicos da ocorrência da infecção apresentaram valores divergentes, que podem estar relacionados com as variáveis anteriormente citadas. O mesmo fato também foi observado em estudos epidemiológicos internacionais (tabelas 1 e 2).

Na análise dos fatores de risco para a infecção, o acesso à rua sempre é a variável de maior relevância, podendo aumentar a probabilidade de infecção em até 47 vezes (GLEICH et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012; COELHO et al., 2011; JORGE – JUNQUEIRA et al., 2011). Fatores como idade, sexo e número de animais contactantes também estão relacionados com o aumento das chances de infecção.

Segundo Little et al. (2009), gatos FIV positivos adultos e não castrados, que tem acesso à rua, tem maior chances de se infectarem pelo FeLV. Já Bande et al. (2012) observaram que gatos machos não castrados e que conviviam com diversos contactantes foram os mais acometidos pelo FeLV, enquadrando-os nos grupos de risco para a infecção.

No Brasil, estudos feitos em São Paulo e Rio de Janeiro tiveram em comum o acesso à rua e o alto número de contactantes como principais fatores de risco para a infecção (JORGE – JUNQUEIRA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

Estudos de prevalência do FeLV são frequentemente publicados (tabela 1 e 2). Alguns destes trabalhos sugerem que a prevalência da doença está diminuindo em diversas regiões do mundo, fato explicado possivelmente pela incorporação do teste de diagnóstico na primeira consulta veterinária e a vacinação dos grupos de risco (LEVY et al., 2008; MOORE et al., 2004). Esta constatação não se aplica ao Brasil, onde os estudos evidenciam altas porcentagens de gatos infectados (ALMEIDA et al., 2012; MEINERZ et al., 2010; COELHO et al., 2011).

**Quadro 1:** Ocorrência do FeLV em diversas regiões do Brasil.

<b>Referências</b>	<b>N</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Região</b>	<b>Teste</b>
COELHO et al., 2011	1.072	47,50	Belo Horizonte - MG	PCR
BARBOSA et al., 2002	125	12,50	Uberlândia - MG	ELISA
MEINERZ et al., 2010	120	38,50	Pelotas e Rio Grande - RS	IFI
SILVA, 2007	65	10,80	Porto Alegre - RS	ELISA
JORGE – JUNQUEIRA et al., 2011	812	6,16	São Paulo - SP	IFI
SOUZA et al., 2002	126	17,46	Rio de Janeiro - RJ	ELISA
ALMEIDA et al., 2012	1.094	11,52	Rio de Janeiro - RJ	IFI

**Quadro 2:** Ocorrência do FeLV em diversas regiões do mundo.

<b>Referências</b>	<b>N</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Região</b>	<b>Teste</b>
ARJONA et al., 2000	180	15,60	Madrid - Espanha	ELISA
BANDECCHI et al., 2006	203	8,40	Pisa - Itália	ELISA
GÓMEZ et al., 1999	300	5,00	Argentina	ELISA
KNOTEK et al., 1999	727	13,20	República Tcheca	ELISA
LEVY et al., 2006	18.038	2,30	América do Norte	ELISA
LIN et al., 1995	75	1,30	Taiwan - Japão	ELISA/IFI
GLEICH et al., 2009	17.462	3,60	Alemanha	ELISA
LITTLE et al., 2009	11.144	3,44	Canadá	ELISA
BLANCO et al., 2010	96	16,70	Costa Rica	ELISA
BANDE et al., 2012	368	12,20	Malásia	ELISA

### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico do FeLV ainda é motivo de discordância entre os pesquisadores e clínicos veterinários devido muitas vezes à interpretação equivocada do resultado, que está intimamente relacionado ao curso de infecção do vírus. Os testes de diagnóstico disponíveis no mercado detectam a proteína de capsídeo p27 ou o DNA proviral integrado à célula do hospedeiro (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

A prova de ELISA e outros testes de imunocromatografia são considerados de triagem e detectam a p27 livre no sangue, enquanto que a IFI detecta a mesma proteína associada a leucócitos e plaquetas infectados, confirmando o comprometimento da medula óssea (HERRING et al., 2001, HARTMANN et al., 2007). A detecção de DNA proviral pela técnica de PCR é indicada nos casos de suspeita de infecção latente, quando a ELISA e IFI apresentam resultados negativos (TORRES et al., 2005; HERRING et al., 2001).

A compreensão das características do teste a ser utilizado no diagnóstico de FeLV é crítico para a interpretação do resultado. A prova de ELISA é capaz de detectar animais infectados a partir da quarta semana após a infecção (FLYNN et al., 2002) e é recomendada para triagem, uma vez que uma infecção latente não será diagnosticada por esta prova (LEVY et al., 2008; LUTZ et al., 2009). Esta técnica é a mais utilizada no Brasil, porém, aspectos como o seu custo elevado estão diretamente associados às dificuldades no diagnóstico desta retrovirose no País.

Já a IFI é o teste de menor custo em diversos países, incluindo o Brasil (ALMEIDA et al., 2012). Suas restrições estão relacionadas aos resultados falso-negativos devido à leucopenia e/ou trombocitopenia e falso-positivos devido à eosinofilia e/ou má confecção do esfregaço sanguíneo (esfregaços espessos) (HERRING et al., 2001; LOAR, 1987).

A PCR detecta o DNA proviral integrado em células de sangue periférico circulantes e da medula óssea. Recentemente, descobriu-se que o DNA proviral pode também ser detectado em gatos FeLV positivos ou negativos com linfomas (WEISS et al., 2010). Esta descoberta sugere que gatos não virêmicos, indetectáveis tanto pelas provas sorológicas quanto pela PCR de amostras de sangue, na verdade não eliminaram a infecção, o que antes se denominava “imunidade esterilizante contra infecções retrovirais” (HOFMANN-LEHMANN et al., 2008; FIGUEIREDO; ARAÚJO Jr, 2011).

O diagnóstico diferencial entre FeLV e FIV é recomendado, uma vez que ambas as infecções são similares no que se refere às manifestações clínicas e laboratoriais e aos fatores de risco para a infecção, sendo importante para o prognóstico da doença e para as medidas de controle e prevenção para cada retrovirose.

### 2.1.7 Controle e profilaxia

Embora o isolamento dos gatos FeLV positivos ainda represente a melhor forma de controle da infecção, a vacinação também é considerada uma grande ferramenta, principalmente no uso combinado de programas de teste e vacinação.

Segundo a *American Association of Feline Practitioners* (LEVY et al., 2008) e o *European Advisor Board on Cat Diseases* (ABCD) (LUTZ et al., 2009), há indicação da vacinação para o FeLV nas seguintes circunstâncias: gatos que convivem com gatos FeLV positivos, gatos que tem acesso à rua, gatos que vivem em abrigos com introdução rotineira de novos gatos e também os gatos quando filhotes, uma vez que não se sabe o estilo de vida que pode ser dado ao animal, como deixá-lo ter acesso à rua. Cabe ressaltar que não há indicação de vacinação para gatos que não foram previamente testados para o FeLV. Desta forma,

muitos países estão conseguindo reduzir a prevalência da infecção ao longo dos anos (LEVY et al., 2006; MOORE et al., 2004; HARTMANN, 2006).

As vacinas disponíveis no mercado utilizam vírus inativado, subunidades virais ou glicoproteínas do envelope viral (gp70) (LOAR, 1993; SPARKES, 2003). Uma vacina recombinante, que utiliza o vírus *canarypox* como vetor (ALVAC-FeLV) foi aprovada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) e introduzida no mercado americano em janeiro de 2012. Esta vacina expressa os genes *gag* (p27) e *env* (gp70) do FeLV, onde possui via de inoculação transdérmica, não havendo a necessidade de utilização de adjuvante em sua composição (POULET et al., 2003; GROSEMBAUGH et al., 2004). Esta vacina é conhecida como Purevax® Recombinant Leukemia nos Estados Unidos e Eurifel® Recombinant Leukemia na Europa.

No Brasil, está disponível uma vacina com vírus inativado, a Fel-O-Vax Lv-K® (Fort Dodge Animal Health), que ainda possui mais quatro antígenos, protegendo para as seguintes doenças: Calicivirose, Rinotraquite, Panleucopenia e Clamidiose.

Muitos estudos sobre a eficácia das vacinas para o FeLV foram realizados, muitas vezes com resultados contraditórios (RICHARDS et al., 2006; HOFMANN-LEHMANN et al., 2008; TORRES et al., 2010). Nenhuma vacina promove 100% de proteção, não prevenindo para a infecção. Porém, a vacinação previne o desenvolvimento de antigenemia persistente, fazendo com que animais vacinados sejam menos predispostos a desenvolver doenças associadas ao FeLV, garantindo uma maior sobrevivência (FIGUEIREDO; ARAÚJO Jr., 2011; HOFMANN-LEHMANN et al., 2008).

Por muitos anos, acreditou-se que os adjuvantes utilizados na vacinação para a Leucemia Viral Felina eram os únicos responsáveis pela indução de sarcomas no local de aplicação da vacina, denominados então “sarcomas pós-vacinais” (MACY; HENDRICK, 1996; TENNANT, 2000), representando uma incidência de aproximadamente 1 a 3 casos de sarcoma a cada 10.000 gatos vacinados (MEHL, 2001). Entretanto, diversos estudos evidenciaram que os fibroblastos dos gatos podem sofrer processos inflamatórios e transformativos pela inoculação de diversos medicamentos (incluindo vacina com adjuvantes), o que mudou a denominação destes para “sarcoma em sítios de injeção” (BERGMAN et al., 1999; SMITH, 1995; TENNANT, 2000).

O uso de vacinas para o FeLV ganha importância, uma vez que o risco de gatos expostos ao FeLV adquirirem a infecção é maior se comparado ao risco de gatos vacinados desenvolverem sarcomas nos sítios de injeção. A vacinação promove sólida imunidade em 80 a 90% dos gatos, porém, esta imunidade decresce quando os gatos são expostos continuamente a outros gatos infectados (NORSWORTHY, 1993).

## **2.2 Tecnologia de DNA recombinante em imunodiagnóstico**

Para o imunodiagnóstico das infecções virais, a obtenção de antígenos para diversas finalidades pode ser problemática, principalmente em se tratando de vírus dos animais. Classicamente para este fim, os vírus foram purificados a partir de tecidos animais infectados, o que implicava em uma série de dificuldades práticas e bioéticas.

O estabelecimento de culturas de células, na década de 50, tornou possível o cultivo e purificação de antígenos virais em escala industrial. Entretanto, ainda persistiam questões como o custo elevado para manutenção de células animais e a restrição de alguns tipos virais neste sistema hospedeiro (ARAÚJO, 2009; MAZUR et al., 2010).

Com advento da tecnologia do DNA recombinante, a expressão de proteínas recombinantes tornou-se uma ferramenta importante nos estudos da estrutura, função e identificação de novas proteínas, principalmente com finalidades terapêuticas e diagnósticas.

### 2.2.1 Expressão heteróloga em *E. coli*

A expressão de proteínas recombinantes em células onde elas não ocorram naturalmente é denominada produção heteróloga. Atualmente, uma gama de sistemas heterólogos estão disponíveis, como bactérias (*E. coli*), leveduras (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*), dentre outros sistemas (GIBERTONI et al.; 2010; GELISSEN, 2000). A escolha do processo para síntese e purificação de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de fatores, como as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, da finalidade e sua obtenção, e da viabilidade econômica do método (GIBERTONI et al.; 2010).

As bactérias, particularmente a *E.coli*, estão entre os sistemas mais comumente empregados na produção de proteínas recombinantes heterológicas, sendo atualmente utilizadas na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como a insulina e hormônio do crescimento humano, assim como na produção de imunobiológicos, como vacinas e testes de diagnósticos (CHOU, 2007; GEORGIOU; SEGATORI, 2005; CORNELIS, 2000). Além de uma gama de informações a respeito de sua genética, existe um grande conhecimento sobre a sua fisiologia, bioquímica e biologia molecular, o que a coloca como sistema de eleição para a expressão de muitas proteínas heterólogas (MAKRIDES, 1996).

Os diversos sistemas de expressão gênica utilizados na *E. coli* apresentam muitas características atrativas, como o controle da expressão gênica e estratégias que facilitam a purificação de proteínas, como a adição de uma cauda de poli-histidina (TERPE, 2006; BALAMURUGAN et al., 2010; ARAÚJO, 2009).

Além disto, estes sistemas proporcionam uma alta produção de proteínas recombinantes e a sua secreção para os compartimentos intra-celulares, incluindo o citoplasma, membrana interna, periplasma e membrana externa, assim como para o meio extracelular (CHOI; LEE, 2004; GEORGIOU; SEGATORI, 2005; CORNELIS, 2000; LEE et al., 2003). A obtenção de altos níveis de expressão protéica reflete em um decréscimo no custo de produção, possibilitando assim a obtenção de proteínas em larga escala. Ademais, esta bactéria é de fácil manipulação e apresenta versatilidade de multiplicação em meios bacteriológicos relativamente simples (CHOU, 2007).

Entretanto, a *E. coli* possui algumas desvantagens como sistema de expressão, tais como a deficiência em realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação, fazendo com que as proteínas recombinantes acumulem-se no citoplasma, ou formem agregados insolúveis (corpos de inclusão), devido a sobrecarga dos mecanismos celulares normais de processamento de proteínas, ocasionando a formação de interações intermoleculares (OLIVEIRA, et al., 2008; WEICKERT, et al., 1996).

Muitas pesquisas relatam o sucesso de vários sistemas de expressão heteróloga com diferentes genes clonados, porém, cada gene apresenta suas particularidades. Muitas vezes, a clonagem e expressão heteróloga é realizada de forma empírica, com sistemas funcionando bem para alguns genes, enquanto que, para outros, o mesmo não ocorre (ALMEIDA, 2010; BANEYX, 1999; BANEYX; MUJACIC, 2004; MAKRIDES, 1996; SORENSEN; MORTENSEN, 2005a,b; WEICKERT et al., 1996). Desta forma, a escolha de um sistema de expressão deve ser cautelosamente estudada para se obter um nível de expressão gênica desejado.

As leveduras também são usadas como sistemas hospedeiros para a clonagem e expressão de proteínas heterológicas virais recombinantes. Estas células, como as do gênero *Saccharomyces* e *Picchia*, também são capazes de produzirem proteínas heterológicas recombinantes de forma segura e econômica (FURUYAMA, 2005; GELISSEN, 2000). Entretanto, tal metodologia é empregada para um número bem menor de patógenos em geral, incluindo os vírus, se comparada com aquela que utiliza os sistemas de hospedeiros procariotos como *E. coli* (GILBERTONI, et al., 2010; ARAÚJO, 2009). Células de

mamíferos e de invertebrados também são utilizadas como sistemas de expressão, porém, ainda são poucos os estudos de sua aplicabilidade na expressão de proteínas recombinantes virais (ARAÚJO, 2009).

Portanto, o uso da *E.coli* para expressão de proteínas recombinantes tem sido largamente adotado em função da sua simplicidade, alto rendimento de expressão de proteínas heterólogas e baixo custo.

## **2.2.2 Sistema pET TOPO de expressão**

Dentre os diferentes vetores comerciais disponíveis para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, o sistema pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*, Novagen) ganha importância devido a promoção de elevados níveis de expressão através da RNA polimerase do bacteriófago T7, apresentando assim alta estabilidade e versatilidade combinadas a diferentes estratégias de purificação de proteínas (JONASSON et al., 2002; ALMEIDA, 2010).

As regiões alvo são clonadas no plasmídeo pET sob o forte controle transcricional do promotor T7, ocorrendo a expressão protéica através da indução da produção da RNA polimerase T7 que, por sua vez, liga-se ao promotor T7 e promove a transcrição do gene alvo. Essa RNA polimerase é tão ativa e seletiva que quase toda a maquinaria da bactéria é convertida para a expressão do gene de interesse (JONASSON et al., 2002). O produto desejado pode corresponder a mais de 50% das proteínas bacterianas, após poucas horas de indução do cultivo. Outro importante benefício desse sistema é sua habilidade em manter genes transcionalmente silenciados no período antes da indução, o que permite o crescimento bacteriano, já que, muitas vezes, a proteína de interesse é tóxica para a célula, dificultando ou impedindo o metabolismo celular normal (JONASSON et al., 2002; ALMEIDA, 2010).

Diante do exposto, a tecnologia de DNA recombinante é um procedimento promissor para o desenvolvimento de antígenos virais aplicados em ensaios imunológicos, assim como nas preparações vacinais contra vírus em geral, e estão diretamente relacionados à utilização de técnicas de engenharia genética que envolva a clonagem e a expressão dos genes codificadores das proteínas virais.

Como a maioria das técnicas de diagnóstico para a infecção pelo FeLV é baseada na detecção da p27, esta tecnologia pode representar uma alternativa viável para produção e purificação a obtenção deste antígeno.

## **2.3 A Tecnologia IgY**

### **2.3.1 A descoberta da IgY**

A IgY é uma imunoglobulina descrita pela primeira vez em 1893 por Klemperer, que observou que galinhas imunizadas eram capazes de produzir anticorpos detectáveis em gemas dos ovos, bem como no seu sangue. Na época, acreditava-se que as concentrações de IgY eram semelhantes tanto no sangue quanto na gema do ovo (KLEMPERER apud NARAT, 2003).

A IgY era chamada de IgG aviária, até que foi denominada IgY devido às descobertas de características peculiares desta imunoglobulina quando comparadas a IgG de mamíferos. Evidências físico-químicas e antigênicas demonstraram que a IgY ocorre nas classes dos

anfíbios, répteis e aves, diferentemente da IgG, exclusiva de mamíferos (WARR et al., 1995; ROSE et al., 1974).

Somente após décadas é que o conceito “Tecnologia IgY” foi criado, sendo definido pela obtenção da imunoglobulina Y, a partir da gema do ovo (STAAK, 1996). O interesse pela IgY vem crescendo nas últimas décadas, principalmente a partir da década de 90, quando esta tecnologia teve reconhecimento internacional e foi oficialmente aprovada pela comunidade europeia como método alternativo para o bem-estar animal (CHACANA et al., 2004). Desde então, diversas publicações têm reportado muitos aspectos desta tecnologia (JIN et al., 2013; PARMA et al., 2011; SILVA; TAMBOURGI, 2010; SCHADE et al., 2005).

Dentre os três isotipos de imunoglobulinas de aves (IgY, IgM e IgA), a IgY é a de maior abundância no soro, com concentrações próximas de 15 mg/mL em galinhas poedeiras, contrastando com as concentrações de IgM, que variam entre 1 a 3 mg/mL, e de IgA, que variam entre 0,3 a 0,5 mg/mL (SPILLNER et al., 2012). Uma consideração importante a ser feita é que encontramos IgY somente na gema do ovo, enquanto que as IgA e IgM, estão presentes na clara do ovo (ROSE et al., 1974).

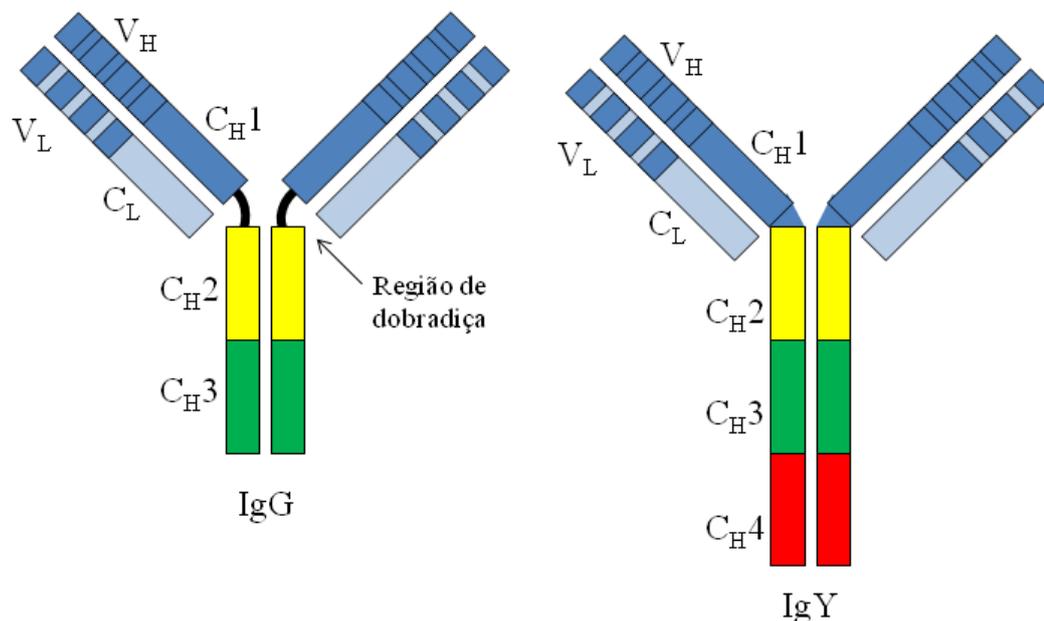
O desenvolvimento alternativo de anticorpos que possam ser utilizados no imunodiagnóstico e na terapia de doenças é faz necessário, uma vez que a obtenção de anticorpos de animais encarece a pesquisa clínica e causa, geralmente, o sacrifício dos animais envolvidos (SPILLNER et al., 2012). O uso de galinhas imunizadas como fonte de anticorpos traz inúmeras vantagens para a produção de anticorpos policlonais, como, por exemplo, obtenção de anticorpos mediante técnicas não invasivas, maior concentração de anticorpos encontrados na gema do ovo de galinha, bem como uma maior estabilidade protéica, comparando-se à IgG de mamíferos (SCHADE, 2001; GUIMARÃES et al., 2008; SPILLNER et al., 2012).

### 2.3.2 Estrutura molecular da IgY

Apesar da IgY apresentar características e funções similares à IgG, existem diferenças estruturais entre estas imunoglobulinas, fazendo com que a IgY possua propriedades bioquímicas peculiares (SPILLNER et al., 2012). De forma análoga à IgG, a estrutura da IgY é composta de duas cadeias leves (L – *light*) e duas cadeias pesadas (H – *heavy*), que são ligadas por pontes dissulfeto, apresentando peso molecular em torno de 180 kDa (BIZANOV et al., 2004; JIN et al., 2013), podendo ser visualizada na figura 2.

A cadeia leve da IgY, cujo peso molecular corresponde a aproximadamente 25 kDa, consiste de um domínio variável (VL), e um domínio constante (CL), similar à IgG de mamífero. Entretanto, a ligação dissulfeto intracadeia entre o domínio VL e o domínio CL da cadeia leve, que estabiliza a estrutura da cadeia leve da IgG de mamífero, é ausente na cadeia leve da IgY, tornando as forças intramoleculares da IgY mais fracas que as da IgG de mamífero (SHIMIZU et al., 1993; VASCONCELOS, 2010; SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A cadeia pesada da IgY possui peso molecular em torno de 68 kDa, com um domínio variável (VH) e quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4), diferentemente da IgG de mamífero, que apresenta três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) (CHALGHOUMI et al., 2009). Na cadeia pesada da IgG, os domínios CH1 e o CH2 são separados pela região de dobradiça, que permite considerável flexibilidade ao fragmento Fab (porção com atividade de ligação ao antígeno). Devido à ausência da região de dobradiça, a molécula de IgY é mais rígida quando comparada à IgG, conferindo uma maior estabilidade em relação à fragmentação ou degradação protéica (SPILLNER et al., 2012; SILVA; TAMBOURGI, 2010; WARR et al., 1995). Porém, os resíduos de prolina e glicina existentes entre as regiões CH1-CH2 e CH2-CH3 possibilitam a flexibilidade limitada do fragmento Fab da IgY (NARAT, 2003; CHALGHOUMI et al., 2009).



**Figura 2:** Representação da IgG de mamífero e IgY aviária. A seta indica a região de dobradiça, presente somente na IgG. Adaptado de Greunke et al. (2008).

### 2.3.3 Aplicações da IgY na Medicina Veterinária e Humana

Uma série de vantagens credenciam a IgY como anticorpo de eleição para inúmeros campos da pesquisa (SCHADE et al., 2005). Imunoensaios como ELISA e radioimunoensaios (RIA) empregando IgY vêm sendo utilizados na detecção e quantificação de proteínas e peptídeos na pesquisa básica clínica. Os anticorpos IgY tem sido usados com sucesso na imunohistoquímica para detecção de antígenos virais, bacterianos, de origem animal e vegetal, na pesquisa de parasitas intestinais em animais domésticos e na contaminação de alimentos por toxinas ou drogas (HUOPALAHTI et al., 2007).

Esta aplicação não está restrita somente ao imunodiagnóstico. Durante a década passada, a IgY passou a ser empregada em um novo contexto, como “alimento funcional”. Muitas pesquisas relatam a importância da IgY na imunotopia, podendo ser citada a sua utilização como terapia alternativa contra patógenos entéricos resistentes aos antibióticos convencionais (CARLANDER et al., 2000), no tratamento de fibrose cística, da colite e da doença celíaca, de doenças de peixes, de envenenamentos e na prevenção da cárie dentária (HUOPALAHTI et al., 2007; SMITH et al., 2001; KOLLBERG et al., 2003). Uma variedade de pesquisas utilizando a IgY foram descritas, como pode ser observado no quadro 3.

**Quadro 3:** Aplicação da IgY no imudodiagnóstico e/ou na imunoterapia de humanos e animais.

<b>Patógeno/Patologia</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referências</b>
<i>Candida albicans</i>	Inibição da aderência e formação de biofilme	FUJIBAYASHI et al., 2009.
<i>Vibrio cholerae</i>	Imunização passiva de camundongos lactantes	HIRAI et al., 2010.
Enterovírus humano tipo 71	Redução da morbidade e mortalidade em camundongos infectados	LIOU et al., 2010.
Influenza A (H1N1)	Neutralização da infectividade viral	TSUKAMOTO et al., 2011.
<i>Salmonella enteritidis</i> e <i>S. thyphimurium</i>	Inibição do crescimento <i>in vitro</i>	LEE et al., 2002.
Parvovirus canino	Deteção viral em fezes de cães infectados através de provas sorológicas	GUIMARÃES et al., 2008.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tratamento de mastite estafilocócica bovina	ZHEN et al., 2009.
<i>Botrops jararaca</i>	Produção de antiveneno botrópico	ARAÚJO, 2007.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Inibição do crescimento em alimentos	SUI et al., 2011.
Rejeição à xenotransplante	Inibição da rejeição ao xenotransplante suíno-humano	FRYER et al., 1999.

### 2.3.4 Protocolos de imunização com a IgY

As aves são capazes de produzir anticorpos com alta avidéz logo após a primeira imunização. Entretanto, este resultado depende de algumas variáveis, as quais incluem o tipo de antígeno (dose e peso molecular), o adjuvante empregado, a via de administração, a genética do animal e o tipo de criação (GUIMARÃES et al., 2008). A concentração do antígeno pode variar entre 0.10-1.0 mg, em casos especiais 10 µg, variando com o tipo de adjuvante a ser utilizado. O volume das inoculações varia entre 0.5-1.0 mL e a via de administração mais indicada é a intramuscular, preferencialmente no músculo do peito (CHANG et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2008). Em caso de imunizações pela via endovenosa, o antígeno deve ser injetado na sua forma solúvel (não associado ao adjuvante) e vagarosamente, evitando-se assim um choque anafilático (SCHADE et al., 2005).

O intervalo entre as imunizações é outro fator de relevância para a magnitude e duração da resposta imune dirigida pela imunização das aves. Diferentes protocolos são utilizados, variando em intervalos de 7, 14, 24 e até 48 dias, dependendo da imunogenicidade, dose, e outros fatores do antígeno e do adjuvante a ser inoculado (SCHADE et al., 2005; LEVÉSQUE et al., 2007; RANGEL et al., 2010). Estes fatores também são considerados

quanto à escolha do número de imunizações que serão necessárias para a produção dos anticorpos. O mais importante é que os intervalos e o número de imunizações sejam suficientes para produzir células de memória (SCHADE et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008; BERNARDO, 2009).

### 2.3.5 Adjuvantes empregados na imunização de galinhas

Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras, que promovem efeito vacinal de maior duração, com resposta de produção de anticorpos mais rápida e necessitando de uma quantidade menor de antígeno, podendo assim, diminuir os custos na produção de vacinas (AUDIBERT, 2003; AUDIBERT; LISE, 1993).

O seu efeito de depósito é caracterizado pela lenta liberação do antígeno, retardando sua absorção e destruição, e conseqüentemente prolongando o tempo do estímulo imunológico. Além disso, potencializam a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e induzem a maturação de células dendríticas através da ativação de células T (PLOTKIN; ORENSTEIN, 2004).

Os adjuvantes apresentam diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados baseados na rota de administração e na imunidade requerida pelo tipo de vacina em particular. O seu emprego nas imunizações é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade (GUPTA; SIBER, 1995; RESENDE et al., 2004). Isto se aplica principalmente aos antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes, cuja estrutura e conformação são menos complexas que vírus e bactérias intactos inativados. Isto também implica no requerimento de uma menor quantidade de antígeno para a estimulação de resposta imune efetiva e duradoura, bem como a competição entre antígenos (RESENDE et al., 2004; SINGH; O'HAGAN, 2002).

O adjuvante considerado padrão ouro para a indução da resposta imune específica em aves é o adjuvante completo de *Freund* (CFA). Este adjuvante é constituído por uma emulsão oleosa contendo micobactérias mortas pelo calor e ressecamento (LÉVESQUE et al., 2007). Porém, devido à sua associação aos efeitos adversos, como a formação de granulomas e necrose tecidual no local de inoculação, recomenda-se sua associação ao adjuvante incompleto de *Freund* (IFA), onde alguns componentes das micobactérias são removidos, diminuindo estes efeitos indesejáveis, tendo como consequência uma menor indução de resposta (LÉVESQUE et al., 2007; CHALGHOUMI et al., 2009).

Outro adjuvante promissor para uso em vacinas são os oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina, conhecido como CpG-ODN (KLINMAN et al., 1999; HEMMI et al., 2000; COOPER et al., 2004). Os oligonucleotídios de CpG são importantes na estimulação do sistema imune, visto que induzem a produção de IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  por células *Natural Killer*, linfócitos B e T CD4+ e secreção de imunoglobulinas em murinos (KLINMAN et al., 1996; KRIEG et al., 1995). Estas sequências CpG imunoestimulatórias são originadas de DNA bacteriano, não metiladas com dinucleotídeos CpG flanqueados por purinas e pirimidinas, diferentemente do DNA de vertebrados. Tais sequências podem estar presentes em plasmídios bacterianos ou estarem associadas ao plasmídio recombinante para aumentar a efetividade de uma vacina (KANO et al., 2007, COBAN et al. 2005). O sistema imune de vertebrados detecta a presença do DNA CpG estranho pela ligação com o receptor Toll-like (TLRs) das células APCs e liberação de citocinas, os quais estimulam a resposta imune adquirida (KANO et al., 2007; SINGH; O'HAGAN, 2002).

O efeito das sequências CpG é influenciado pela presença do antígeno e liberação do DNA (SINGH et al., 2000; COBAN et al., 2005). Pesquisas demonstraram a capacidade do CpG induzir uma resposta do tipo Th1, conferindo proteção a camundongos infectados com

cepa moderadamente virulenta de *Toxoplasma gondii* (EL-MALKY et al., 2005). Lévesque et al. (2007), concluíram que o uso de CpG na imunização das frangas resultou em um aumento de até 480% da concentração de anticorpos específicos presentes na gema, embora ocorresse um pequeno aumento nos custos do procedimento. Segundo Zhang et al. (2003), bovinos imunizados com MSP2, uma proteína de superfície do *Anaplasma marginale*, combinada com alúmen e CpG, desenvolveram altos títulos de IgG1 específicos. Além disso, a proliferação específica de linfócito e a frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  também aumentaram significativamente nos animais tratados com antígeno e CpG, indicando que esse último é um adjuvante eficiente para estimulação tanto de resposta humoral quanto mediada por células do sistema imune dos bovinos.

### 2.3.6 Métodos de purificação da IgY

Vários métodos de purificação da IgY da gema de ovos são citados na literatura, e podem ser usados em combinação, de acordo com a quantidade, grau de pureza e atividade biológica desejadas (CHACANA et al., 2003; SCHADE et al., 2005).

Um método de purificação é considerado eficiente quando é capaz de separar a IgY de outras proteínas contidas na fração solúvel da gema, o que é feito após a extração dos lipídeos. A IgY é transportada ativamente pelo epitélio folicular do ovário para a gema por um processo mediado por receptores, estando isolada das demais classes de anticorpos presentes no ovo e sendo a única classe de imunoglobulinas presente na gema (MORRISON et al., 2001).

Desta forma, existem diferentes métodos de purificação da IgY descritos, como por exemplo a precipitação com sal, cromatografia, diluição da gema em água acidificada, ultrafiltração, dentre outros métodos, podendo ser combinados para atingir um maior grau de pureza da IgY isolada (POLSON et al., 1980; AKITA; NAKAI, 1992; HORIKOSHI et al., 1993; CHANG et al., 2000; BIZANOV et al., 2006). O método de precipitação com sal envolve o uso de sulfato de amônio, sulfato de sódio, polietilenoglicol (PEG) ou ácido caprílico (CHACANA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2008; MCLAREN et al., 1994).

O PEG é um polímero de alto peso molecular, oriundo do etileno glicol, e apresenta a vantagem de ser manipulado a temperatura ambiente sem risco de desnaturação do anticorpo, sendo considerado o método padrão de precipitação da IgY (POLSON et al., 1980). Ademais, é um dos melhores métodos para a obtenção de IgY de alto grau de pureza (AKITA; NAKAI, 1993; POLSON et al., 1980).

Segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001), a cromatografia de afinidade em coluna é o método de purificação de IgY que apresenta melhor eficiência. Contudo, a eluição empregada pode apresentar efeito deletério sobre a atividade do anticorpo (CARROL et al., 1992). Outro aspecto desvantajoso está relacionado ao seu alto custo, inviabilizando sua utilização em larga escala (SVENDSEN et al., 1995).

A técnica da diluição em água ácida, incluindo a correção do pH e/ou o ciclo de congelamento, também é bastante empregada, já que utiliza poucos compostos químicos, reduzindo assim o custo e o número de etapas do processo. Desta forma, permite a sua utilização em escala industrial e havendo reutilização do restante da gema como produto e comestível ou para fracionamento de outros componentes biologicamente ativos (AKITA; NAKAI, 1993; ARAÚJO, 2009).

A escolha do método empregado para a purificação da IgY vai depender não somente das vantagens intrínsecas de cada técnica, mas também da estrutura de cada laboratório.

### 2.3.7 A Tecnologia IgY no imunodiagnóstico do FeLV

Em relação à tecnologia convencional de produção da IgG, existem diversos aspectos vantajosos da utilização da IgY como imunobiológico na pesquisa biomédica, na medicina veterinária e humana, a saber:

A. Estabilidade: a IgY é mais termoestável, podendo ser estocada em solução salina 0,85% a 4°C com 0,02% de azida sódica, por até 10 anos. Anticorpos biotinizados e purificados por imunoafinidade mantiveram sua reatividade estocados a 4 °C, por cinco anos. Até mesmo no ovo, *in natura*, estocado a 4°C, preserva sua atividade, por pelo menos seis meses (OLOVSSON; LARSSON, 1993). A IgY também é estável à temperatura de congelamento, permanecendo viável por mais de cinco anos (SHIMIZU et al., 1988). FU et al. (2006) também demonstraram que a IgY pode ser liofilizada e as propriedades físicas, biológicas e de neutralização se mantêm. A IgY também se apresenta estável em processos de pasteurização a 60°C (SHIN et al., 2002) e em condições alcalinas, permanecendo viável em pH 11, porém, sofrendo degradação quase completa em pH 12 (SHIMIZU et al., 1992; SHIMIZU et al., 1993).

B. Rendimento: o rendimento de IgY é, em geral, muito superior ao da IgG proveniente de mamíferos (JIN et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2008). Enquanto a concentração total de anticorpo adquirida em um coelho, após a sangria total, está em torno de 200mg IgG/40 mL de sangue, pode-se alcançar uma concentração de IgY que varia de 50 a 100mg/ovo (SILVA; TAMBOURGI, 2010; SCHADE et al., 2005). Mine e Kovacs-Nolan (2002) relataram que as concentrações de IgY podem alcançar de 100 a 150 mg/ovo, o que renderia cerca de 40 g de IgY/ano, uma vez que uma galinha produz geralmente cerca de 280 ovos em um ano.

C. Distanciamento filogenético: a distância evolutiva entre aves e mamíferos faz com que os antígenos de mamíferos inoculados em aves gerem uma resposta imune mais forte e duradoura, com elevada afinidade e avidéz (SPILLNER, et al., 2012; BERNARDO, 2009). Estas proteínas de mamíferos ativam mais intensamente o sistema imune da ave por serem detectadas como proteínas estranhas, que podem ainda detectar mais epítomos nestes tipos protéicos que o sistema imune de mamíferos (RODRIGUES, 2009; WOOLEY; LANDON, 1995). Portanto, são necessárias menores concentrações de antígenos inoculados e frequências de imunização, quando comparados ao mesmo protocolo em mamíferos (ROSOL et al., 1993; WOOLLEY; LANDON, 1995).

D. Incapacidade da ativação do complemento de mamíferos: a IgY não ativa o complemento, ao contrário da IgG de mamífero. Esta ativação pode interferir nos resultados de uma prova sorológica, já que componente C4 ativado pode ligar-se ao fragmento Fab da IgG, podendo interferir com a ligação do antígeno e gerar resultados inconclusivos ou negativos falsos (CAMPBELL et al., 1980; SCHADE et al., 2005).

E. Ausência de afinidade com fatores reumatóides: fatores reumatóides são autoanticorpos presentes na circulação sanguínea, que reagem com a fração Fc de IgG de mamíferos, causando na maioria das vezes a artrite reumatóide. Em testes de imunodiagnóstico, os fatores reumatóides podem se ligar à fração Fc de anticorpos utilizados nos testes, formando imunocomplexos, mimetizando a atividade antigênica e resultando em testes positivos falsos (GREUNKE et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008; ARAÚJO, 2009). Como a IgY não contém o domínio da fração Fc responsável pela ligação aos fatores reumatóides, elas não causam resultados falso-positivos. Larsson et al. (1991) compararam a IgG e IgY utilizados na fase sólida de um ELISA sanduíche mostrando que quando se utilizava IgG, havia reações positivas falsas nos testes, o que não

acontecendo quando se utilizava a IgY. O fato da IgY não ter afinidade por fatores reumatóides elimina a possibilidade de reações inespecíficas, como os resultados positivos falsos em provas sorológicas.

F. Ausência de afinidade com receptores celulares de Fc de anticorpos: a região Fc da IgG tem um domínio responsável pela ligação a receptores celulares, que em cultivos de células esta interação pode ativar as células, alterando a expressão de algumas proteínas de superfície, interferindo na pesquisa de outras proteínas de superfície na citometria de fluxo, bem como em provas sorológicas, como a imunohistoquímica (LINDAHL et al., 1992). O mesmo não ocorre com a IgY, que não apresentam esta afinidade com receptores celulares de Fc de anticorpos, sendo indicada como anticorpo primário em ensaios envolvendo componentes celulares (ROSOL et al., 1993; SCHIMIDT et al., 1993; MOTOI et al., 2005; BERNARDO, 2009).

G. Ausência de afinidade com receptores bacterianos para Fc: As proteínas A e G estão presentes em bactérias, o que pode levar a reação cruzada com anticorpos utilizados em provas sorológicas para a detecção de bactérias, acarretando em resultados positivos falsos (SILVA; TAMBORUGUI, 2010; SCHADE et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008). Jin et al (2013) comprovaram que a IgY não se liga às proteínas A e G, não interferindo, portanto, no desenvolvimento de testes imunológicos para a identificação de enterotoxinas estafilocócicas presentes em amostras de leite e derivados.

H. Bem estar animal: o método de obtenção dos anticorpos policlonais das aves é um método não invasivo. Uma vez que a maior concentração de IgY é encontrada na gema do ovo, não há necessidade de coletas por via parenteral, não causando estresse do animal e, principalmente, dispensando a sangria total para a obtenção de um maior volume de amostra, como o que ocorre em coelhos (GUIMARÃES et al., 2008; SPILLNER et al., 2012). Como a coleta de ovos é um método simples e não invasivo, há redução no número de animais utilizados na produção de anticorpos (GOTTSTEIN; HEMMELER, 1985).

I. Viabilidade econômica: aves como fonte de anticorpos policlonais implica em procedimentos mais econômicos dos que os realizados em mamíferos (GUIMARÃES et al., 2008; SOTIROPOULOU et al., 2012). O manejo de galinhas é considerado simples e relativamente barato, principalmente quando conjugado com sistemas automatizados de alimentação, o que diminui custos devido à redução do número de trabalhadores necessários (BERNARDO, 2009).

Entretanto, algumas desvantagens desta tecnologia devem ser citadas. A alta concentração de lipídios na gema do ovo pode interferir em métodos de purificação baseado em afinidade (VERDOLIVA et al., 2000). Outro ponto a ser discutido é a diminuição da atividade da IgY em pH ácido (pH <3,5), havendo mudança conformacional e dano na porção Fab, incluindo o local de ligação ao antígeno (SHIMIZU et al., 1992; SHIMIZU et al., 1994; SPILLNER et al., 2012). Esta mudança conformacional também é atribuída ao menor número de ligações dissulfeto intramoleculares, se comparada a IgG (SHIMIZU et al., 1992). A IgY também é sensível a ação da pepsina em pH ligeiramente ácido, perdendo 63% da sua atividade em pH 4 em períodos de incubação acima de quatro horas (HATTA et al., 1993).

Mesmo com as características negativas acima mencionadas, a tecnologia de IgY ainda é um método promissor para a obtenção de anticorpos em animais. Logo, apesar da produção de anticorpos ainda predominar em mamíferos, nas aves, na maioria das vezes, encontram-se vantagens, tais purificação relativamente simples; e maior facilidade de manejo dos animais e baixo custo (LOSSO et al., 1993). O rendimento de anticorpos obtidos também é uma das características mais relevantes desta tecnologia, o que indica a facilidade e a viabilidade de utilizar a IgY para fins diagnósticos e terapêuticos, como já ocorre em imunizações passivas

para o controle e tratamento de gastroenterite viral causada por rotavírus e norovírus em humanos (DAI et al., 2012), bem como para a prevenção contra o *Cryptosporidium parvum* em animais e humanos (SHAHBAZI et al., 2012), dentre uma infinidade de aplicações.

Portanto, a obtenção de anticorpos aviários específicos para o FeLV, conjugados a corantes fluorescentes e/ou enzimas, além de ser bioeticamente interessante, poderá possibilitar o desenvolvimento de imunoenaios para a pesquisa e diagnóstico da Leucemia Viral Felina.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. PRODUÇÃO DA p27 RECOMBINANTE

#### 3.1.1. Bioinformática

Para clonagem e posterior expressão da proteína p27 recombinante do FeLV (r-p27), preliminarmente, foram desenvolvidos estudos de bioinformática para obtenção e análises das sequências nucleotídicas homólogas da região codificante desejada. A obtenção das sequências nucleotídicas da p27 foi realizada por meio da página da internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

A partir da identificação dos números de acesso das sequências nucleotídicas da p27 depositadas no *Genbank* (números de acesso: AF052723; K01803; JF957361; JF957363; AB673431; M18247), o programa Vector NT Advance (TM) 11.0 (Invitrogen) foi empregado para análises de conservação, tamanho, fase de leitura e tradução.

Esta análise possibilitou o desenho dos oligonucleotídeos, necessários para a amplificação molecular desta região, a partir de DNA proviral. O programa PRIMER-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi utilizado para o desenho e otimização dos oligonucleotídeos baseados na sequência nucleotídica da p27 depositada no *Genbank*, nº de acesso AF052723. Esta sequência foi adotada, uma vez que a análise bioinformatizada indicou alta conservação entre as sequências analisadas.

#### 3.1.2. Clonagem Molecular da Região Codificante da p27

##### Amplificação molecular da região alvo

O DNA proviral do FeLV foi gentilmente cedido pelo responsável do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Unesp-Botucatu, Dr. João Pessoa Araújo Júnior, na forma de DNA genômico total purificado de neutrófilos de um gato FeLV positivo.

A técnica da PCR foi empregada para amplificação da região codificante da proteína de capsídeo p27 (região alvo) utilizando-se 1 ng do DNA proviral cedido, quantificado em Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc - EUA).

A reação foi feita utilizando termociclador TGradient (Biometra®) e para esta finalidade foram utilizados os oligonucleotídeos 5' CACCATGCCCTTGAGGGAGGG 3' (senso) e 5' CAGAACTTTAGTCATCTCCTTGTGG 3' (anti-senso).

O protocolo para amplificação foi realizado com um ciclo inicial de 94 °C durante 5 minutos, para desnaturação do DNA genômico, seguido de 35 ciclos de: (i) desnaturação do DNA a 94 °C durante 30 segundos, (ii) anelamento a 55 °C durante 30 segundos e (iii) extensão a 68 °C durante 60 segundos. A extensão final foi realizada a 68 °C durante 7 minutos. A reação de PCR foi realizada com tampão Tris-SO<sub>4</sub> 600 mM (pH 8,9), dNTPs 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 1U da DNA polimerase *Platinum® Taq High Fidelity (Life Technologies™)*, em volume final de 25 µL de reação.

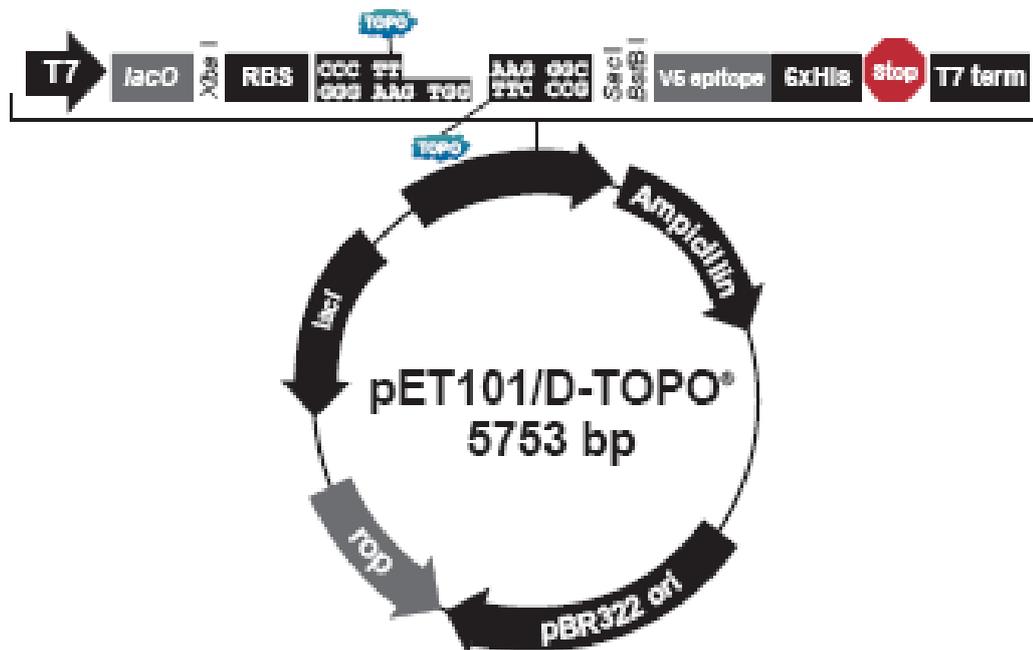
Para avaliação dos produtos da PCR foi feita a eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE (anexo A.1), com voltagem de 100 volts durante 1 hora, e o gel corado com brometo de etídeo a 10 µg/mL por 10 minutos, e visualizado em transiluminação UV.

### Ligação da região alvo ao vetor de expressão

O DNA alvo foi purificado com o uso de *kit* comercial (PureLink™ gel extraction, Invitrogen), a partir da banda com o tamanho molecular esperado (~744 bp) removida do gel de agarose, após eletroforese do produto da PCR. Após a extração, o DNA alvo foi quantificado, utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop ND-1000.

Para clonagem molecular, o vetor adotado foi o plasmídeo Champion™ pET101 Directional TOPO® (Invitrogen) (figura 3). Suas principais características são uso da topoisomerase unida às extremidades, das quais uma (5') com segmento de fita simples para ligação unidirecional. O vetor apresenta um promotor de regulação gênica forte (do bacteriófago T7), a presença de um gene de resistência à ampicilina e a sequência codificante de 6 resíduos de histidina a 3' ("cauda de histidina"). A cauda de histidina adicionada à extremidade carboxi-terminal da proteína recombinante confere afinidade ao níquel presente nas colunas com resina de sulfato de níquel utilizadas para purificação de proteínas por IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*).

Para a clonagem molecular, foi realizada a ligação do DNA alvo purificado ao vetor plasmidial, de acordo com as recomendações do fabricante. Em suma, uma mistura de ligação foi feita adicionando-se 2 ng DNA alvo purificado (p27), 1 µL NaCl 4M, 0,5 µL vetor (0,25 ng) e 6,5 µL água WFI, que foi incubada por 10 minutos TA e preservada a -20 °C, até o momento de uso.



**Figura 3:** Mapa do vetor pET 101/D-TOPO apresentando a origem de replicação (ori), o repressor lac (*lacI*), o gene de resistência à ampicilina (Ampicillin) e o sítio de múltipla clonagem, contendo o promotor T7, local de expressão da cauda de poli-histidina e extremidade coesiva para ligação do inserto e ação da topoisomerase (*Life Technologies*™).

## **Preparo de células eletrocompetentes**

Para seleção de clones bacterianos recombinantes com o plasmídeo ligado à região alvo, e posterior expressão da r-p27, foram preparadas células *E. coli* TOP10 e BL21 Star (Invitrogen), ambas eletrocompetentes.

Os procedimentos para o preparo de células eletrocompetentes *E. coli* foram de acordo com o protocolo adaptado de Sambrook e Russel, 2001

Inicialmente, uma colônia isolada de *E. coli* TOP10 foi semeada em meio LB líquido (*Luria Broth*) (anexo B) a 37 °C, *overnight*, sob agitação constante de 200 rpm (pré-inóculo saturado). Um novo cultivo foi realizado na diluição de 1:100 em meio LB até obtenção da OD600nm 05-06 (30°C/200 rpm). A cultura foi incubada em gelo por 15 minutos e centrifugada a 3220 x g a 4 °C por 20 minutos (Eppendorf® 5810R, rotor A-4-62). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuscitado em água WFI estéril a 4°C no volume original da cultura. O material foi novamente centrifugado, ressuscitando o precipitado celular em água na metade do volume original da cultura.

Uma nova etapa de centrifugação foi realizada, ressuscitando o precipitado celular resultante em glicerol 10% estéril gelado na concentração de 1:50 do volume inicial de cultura. O material foi novamente centrifugado e o precipitado celular ressuscitado em glicerol 10% estéril gelado em volume de 1:500 do volume de cultura original.

As células eletrocompetentes foram aliqüotadas em aliqüotas de 120 µL e logo após foi realizado o congelamento rápido (dióxido de carbono sólido e álcool etílico 70%, temperatura em torno de - 45 °C) para o armazenamento a -70 °C.

O mesmo procedimento foi realizado para a *E. coli* BL21 Star, empregada para a expressão da proteína recombinante.

## **Transformação em *E. coli***

A transformação do plasmídeo recombinante (pET101+DNA alvo) em *E. coli* TOP10 eletrocompetente foi realizada por eletroporação. Este método consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de poros o qual permite a entrada do plasmídeo recombinante na célula. Com esta finalidade, 5 µL da mistura da reação de ligação foram transferidas para uma cubeta de 0,2 cm de espessura entre os eletrodos (Bio-Rad®). O material foi submetido a uma descarga elétrica por cerca de 5 ms (2,5 kV, 25 µF e de 200 Ω), em um eletroporador (Gene Pulser® II, Bio-Rad®).

Para a recuperação das células após a eletroporação, as mesmas foram adicionadas em 900 µL de LB e incubadas a 37 °C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm, e em seguida centrifugadas a 20.817 x g a 4 °C (Eppendorf® 5417R, rotor F45-30-11).

O precipitado celular obtido foi ressuscitado em 100 µL de LB e cultivado, com auxílio de alça de Drigalski, em placa de Petri em LB sólido suplementado com ampicilina a 100 µg/mL (LB-amp), que foi incubada a 37 °C, *overnight*, para seleção dos clones recombinantes.

## **Seleção de clones bacterianos recombinantes**

Os clones bacterianos transformados em *E. coli* TOP10, representados pelas colônias que cresceram na placa com LB-amp sólido, foram inoculados em 5mL de LB-amp, incubados a 37 °C, *overnight*, e o seu DNA foi extraído com o *kit* Wizard® Plus SV

Minipreps DNA Purification System (Promega) para sequenciamento automático do gene, conforme instruções do fabricante.

Em seguida, alíquotas dos DNAs extraídos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, sob voltagem constante (15 V por cm de gel), em tampão contendo azul de bromofenol e glicerol (anexo A.2) e meio tamponado com TAE, juntamente com o DNA do PET-101 recircularizado (“vazio”), como marcador de peso molecular. Os géis resultantes foram corados com brometo de etídio a 10 µg/ mL, para visualização das bandas de DNA, sob transiluminação UV.

Baseados no tamanho dos fragmentos de DNA observados em comparação ao DNA do plasmídeo recircularizado, foi possível detectar os prováveis clones recombinantes desejados, que localizaram-se acima da banda do plasmídeo recircularizado, utilizado como marcador de peso molecular.

### **Sequenciamento e análise das sequências clonadas**

Dois clones bacterianos recombinantes, denominados clone 12 e 13, foram selecionados da forma acima descrita, para o sequenciamento nucleotídico da sequência inserida (inserto), pelo método de SANGER et al. (1977). O sequenciamento foi realizado utilizando-se terminadores fluorescentes (Big Dye, Applied Biosystems™) e sequenciador capilar ABI PRISM® XL3500 (Applied Biosystems™). As reações de sequenciamento foram preparadas com 200 ng de DNA plasmidial e 3,2 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões T7 e T7 terminal do vetor, adjacentes a sequência da p27 inserida. As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Vector NTI 11 (*Life Technologies*™). Os insertos foram sequenciados com o intuito de verificar a inserção correta da região codificante p27 e sua identidade com as sequências nucleotídicas da mesma região depositadas no *GenBank* utilizadas para as análises iniciais de bioinformática. O programa Sequencher 5.0™ (*Genes Code Corporation*) foi utilizado para o alinhamento das sequências de referências com os insertos sequenciados. As sequências nucleotídicas foram traduzidas, utilizando-se ferramentas deste programa.

### **Preparo de estoques de trabalho do clone recombinante selecionado**

Após o sequenciamento nucleotídeo, foram preparados estoques de trabalho de somente um dos clones sequenciados (clone 12). O cultivo do clone 12 foi incubado até a fase exponencial (OD final 5,0-6,0) a 37°C, sob agitação de 200rpm, em meio LB-amp. As leituras de densidade óptica foram realizadas a 600nm. Em seguida, foi adicionado glicerol na concentração final de 25% para o armazenamento de alíquotas a -70°C, até o momento de uso.

#### **3.1.3 Expressão da rp27**

Para expressão da r-p27, o DNA plasmidial do clone bacteriano recombinante foi introduzido por transformação em células BL21 Star por meio de eletroporação, como anteriormente descrito para transformação das células TOP10.

Inicialmente, o clone bacteriano recombinante foi semeado em placa de Petri com LB-amp, como acima descrito. Em seguida, uma colônia isolada foi cultivada em 5 mL de LB-amp e incubada *overnight* a 37°C sob agitação de 200 rpm, para obtenção de um pré-inóculo.

A expressão da r-p27 em *E. coli* BL21 Star foi feita em um novo cultivo, inoculado a 2% com o pré-inóculo, e incubado a 37 °C a 200 rpm até atingir a OD de 0,6 a 0,8. A análise da absorbância foi realizada por espectrofotometria de alíquotas da cultura, coletadas ao longo da incubação. Quando a OD atingiu o valor desejado, a expressão da proteína recombinante foi induzida adicionando-se IPTG (isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosídeo) a 0,5 mM e incubando-se por mais 4h, a 37°C e 200 rpm. O IPTG induz a produção da RNA polimerase T7 presente no genoma *E. coli* BL21 Star que, por sua vez, liga-se ao promotor T7 presente no plasmídeo e promove a transcrição do gene alvo. Os cultivos foram realizados em LB-amp, em frascos Erlenmeyer mantidos em agitador orbital (New Brunswick Scientific Innova® 44 e 44R) a 200 rpm. Enfim, a cultura foi centrifugada (3220 x g/20 min/ 4 °C) e o precipitado celular foi armazenado a -70 °C.

A análise da expressão da r-p27 foi realizada coletando-se 1,0 mL dos cultivos bacterianos antes e depois da indução por IPTG, que foram centrifugados e ressuspensos em 25 µL de tampão de proteína 2x (anexo A.3) para cada 0,1 de OD, para posterior aplicação em gel SDS-PAGE a 12,5% (anexo C). A eletroforese foi realizada a 100V por 90 minutos em tampão de corrida (anexo A.4). Após este tempo, o gel foi corado com *Comassie Blue* (Sigma®) por, no mínimo, 1 hora e em seguida tratado com uma solução descorante (anexo A.5) *overnight*, para a evidenciação das bandas protéicas.

### 3.1.4 Avaliação de solubilidade da r-p27

Para avaliação da solubilidade da proteína recombinante obtida, 1,0 mL da cultura (OD 2,0/600 nm/LB-amp), do clone recombinante selecionado induzido foi centrifugado a 20.817 x g durante 20 segundos. O precipitado celular resultante foi ressuspensionado em 500 µL de tampão de lise (Tris 20mM EDTA 1mM) (anexo A.6) e sonificado 3 vezes por 10 segundos (sonicador XL-2000, Misonic™) a uma amplitude de 30% (~36 µm), mantendo-se o tubo utilizado imerso em gelo.

O lisado obtido foi mais uma vez submetido à centrifugação e em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o novo precipitado celular foi ressuspensionado em 500 µL, com auxílio de agitador de tubos. A análise da alíquota do sobrenadante e do precipitado celular foi realizada em gel SDS-PAGE a 12,5%, a fim de identificar em qual fração (meio intracelular ou membrana, respectivamente) a proteína recombinante se acumulou.

### 3.1.5 Purificação da r-p27 solúvel

Para purificação da proteína recombinante, o precipitado celular contendo a r-p27 foi lentamente ressuspensionado em tampão de lise na razão de 1 mL para cada 0,1 g de massa úmida. Em seguida, o material ressuspensionado foi submetido a seis ciclos de sonicação (dois ciclos de 45 segundos e quatro ciclos de 30 segundos) a uma amplitude de 30%, mantendo-se o tubo utilizado imerso em gelo.

Em seguida, foi utilizada a coluna de afinidade por níquel (HisTrap FF crude, GE Healthcare®) de 1mL. Após a coluna ser equilibrada com 10 ml de tampão de lise, o lisado bacteriano foi aplicado na abertura superior da coluna manualmente, drenada com auxílio de bomba peristáltica ajustada para um fluxo de 1,0 mL/min. Após esta etapa, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol em tampão PBS (anexo A.6), variando de 5 mM a 1M, até eluição da r-p27 (tabela 1). As amostras dos eluatos das diferentes concentrações de imidazol, bem como do lisado bacteriano, precipitado celular e *void* foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE a 12,5%.

**Tabela 1:** Protocolo de lavagens com diferentes concentrações de imidazol para a eluição da r-p27.

Soluções	Quantidade de lavagens	Volume/lavagem
PBS + Imidazol 5 mM	1 X	10 mL
PBS + Imidazol 40 mM	3 X	2 mL
PBS + Imidazol 80 mM	2 X	2 mL
PBS + Imidazol 120 mM	2 X	2 mL
PBS + Imidazol 250 mM	2 X	2 mL
PBS + Imidazol 1 M	2 X	2 mL

### 3.1.6 Dessalinização da amostra

Após purificação em coluna de afinidade e avaliação das frações de interesse por eletroforese, a proteína solúvel foi dessalinizada por gel filtração em coluna PD10 matriz Sephadex G-25 (coluna HiTrap Desalting, GE Healthcare®), de acordo com as instruções do fabricante.

Desta forma, o imidazol foi retirado da amostra, permitindo a quantificação e posterior armazenamento da proteína em tampão PBS pH 7,2.

### 3.1.7 Quantificação da r-p27 purificada

A concentração da r-p27 purificada foi estimada por ensaio enzimático colorimétrico BCA (*Bicinchoninic acid assay*, Sigma®) e de Lowry (Bio-rad®). Estes métodos colorimétricos são baseados na oxi-redução de íons cúpricos presentes nas ligações peptídicas, em meio alcalino. A reação gera uma intensidade de cor proporcional à concentração da proteína, mensurada pela leitura em espectrofotometria (Sunrise® RChisto, Tecan) na absorvâncias de 750 nm (Lowry) e 560 nm (BCA). A r-p27 também foi estimada em 280 nm (Nanodrop).

Uma curva padrão foi feita utilizando-se BSA a 10 mg/mL (Sigma®) nas diluições decrescentes de 1,0, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0 mg/mL. O cálculo de regressão linear forneceu a equação da reta para quantificação final da proteína, aceitando-se valores de coeficiente de determinação  $R^2 > 0,98$ . Além dos métodos citados, a concentração da r-p27 também foi estimada por meio de avaliação semi-quantitativa em gel SDS-PAGE a 12,5%. As bandas da proteína recombinante foram comparadas às diluições conhecidas da proteína BSA após eletroforese e revelação das bandas no gel.

### 3.1.8 Avaliação da estabilidade protéica

Para avaliação da estabilidade da proteína em tampão PBS pH 7,2, a r-p27 foi previamente quantificada pelo método de BCA (concentração igual a 0,243 mg/mL) e armazenada em alíquotas nas temperaturas de 4 °C, -20 °C e -70 °C. A proteína foi novamente quantificada após 5, 15, 30, 90, 180 e 240 dias.

### 3.1.9 Preparo do inóculo para as imunizações

Para a produção do anticorpo desejado, a r-p27 foi misturada ao adjuvante hidróxido de alumínio (alúmen) na proporção de 1,6 mg/mL para cada 0,16 mg/mL de proteína, sob homogeneização constante, a 4 °C durante 8 horas.

Duas alíquotas de 1mL (uma antes e a outra após 8 horas do procedimento de adsorção) foram coletadas e centrifugadas a 20.817 x g a 4 °C por 10 minutos para a separação da r-p27 adsorvida ao alúmen (porção precipitada) da r-p27 livre (sobrenadante). Na fração sobrenadante foram adicionados 4,0 mL de acetona P.A., e a mistura foi agitada por inversão e mantida por 2 horas a -20 °C, para a precipitação da proteína. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 20.817 x g a 4 °C por 30 minutos.

A eficiência da adsorção do alúmen à r-p27 foi avaliada mediante eletroforese em gel SDS-PAGE a 12,5%, utilizando-se uma curva padrão de BSA a 10 mg/mL nas diluições decrescentes de 2,0, 1,0, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 mg/mL, onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 10 µL de água WFI e adicionados 10 µL de tampão de proteína 2x.

### **3.1.10 Reatividade da r-p27 contra anticorpos anti-p27 nativa**

Para a avaliação preliminar da reatividade da r-p27 contra o anticorpo para a p27 nativa, foi utilizado o *kit* de diagnóstico por imunocromatografia, de acordo com as instruções do fabricante (SNAP *combo* FIV/FeLV® -IDEXX Laboratories).

## **3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA A r-p27**

### **3.2.1 Animais e inoculações**

#### **Coelhos**

Os experimentos com animais foram realizados rigorosamente de acordo com as normas éticas do Conselho de Medicina Veterinária (RESOLUÇÃO Nº 879, 2008), os quais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética da UFRRJ (protocolo nº 230/2012).

Duas coelhas da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 28 semanas de idade, foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Zootecnia da UFRRJ e mantidas no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ, em gaiola própria para criação de coelhos, recebendo ração comercial e água à vontade.

O protocolo de imunização foi baseado no padrão utilizado pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório – Cecal/Fiocruz. As coelhas foram imunizadas com a r-p27 adsorvida em hidróxido de alumínio, como descrito anteriormente. O protocolo consistiu em 4 imunizações por via intramuscular na concentração de 80 µg da r-p27, em intervalos de 7 dias. Uma coleta de 200µL de sangue, através da veia marginal da orelha, foi realizada semanalmente. Uma quinta imunização foi realizada na mesma concentração, porém, sem adjuvante e pela veia femoral.

Para a obtenção dos anticorpos para r-p27, 3 dias após a última inoculação, os animais foram previamente anestesiados com quetamina (10mg/kg) e xilazina (3mg/Kg), por via endovenosa. Após a confirmação da anestesia, uma punção intracárdica para obtenção do maior volume possível de sangue destes animais foi realizada. Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, e o soro alíquotado e estocado a 4 °C para seguinte titulação frente ao reconhecimento da r-p27.

## **Galinhas**

Quatro galinhas de postura da linhagem comercial *Hy-line*, variedade *White* (W-36), com 16 semanas de idade, foram mantidas no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ, em gaiolas individuais para galinhas de postura, com água à vontade. A ração foi balanceada de acordo com as necessidades nutricionais padronizadas, conforme especificação da Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima, do Departamento de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia, UFRRJ.

O fotoperíodo para o estímulo de postura dos ovos foi iniciado quando as aves completaram 19 semanas de idade. O manejo da luz consistiu em 14 horas diárias de luz na primeira semana, seguida de acréscimo de 30 minutos de luz a cada semana, totalizando 4 semanas. Desta forma, atingiu-se 16 horas de luz diária em 5 semanas de manejo de luz. Nas três semanas posteriores, acrescentou-se mais 20 minutos de luz por semana, completando 17 horas de luz por dia.

O protocolo de imunização foi realizado conforme descrito por Bernardo (2009), com adaptações. Quando os animais atingiram o pico de postura, em torno de 24 semanas de idade, duas aves foram imunizadas com a r-p27 (60µg/inoculação) misturada ao adjuvante de *Freund* completo na primeira imunização, e *Freund* incompleto nas duas imunizações seguintes, ambos na proporção 1:1. A emulsão foi considerada adequada para inoculação nos animais quando uma gota era colocada em tampão PBS 1x e não se homogeneizava. As imunizações foram feitas no músculo do peito em 5 sítios diferentes de inoculação, em intervalos de 14 dias, totalizando 3 inoculações. Uma quarta inoculação foi feita com 20 µL de oligodeoxinucleotídeo sintético (CpG-ODN), na concentração 1mg/mL juntamente com a r-p27, também por via intramuscular. Duas galinhas foram utilizadas como controle negativo e não foram imunizadas.

### **3.2.2 Processamento dos ovos e método de extração da IgY aviária**

Uma semana antes da primeira inoculação, deu-se o início da coleta diária dos ovos, que foram identificados e armazenados a 4°C, até o início do processamento para a extração semanal da IgY. Os ovos das aves imunizadas foram quebrados e as gemas separadas e secas em papel toalha, para a remoção completa da clara. Posteriormente, as gemas foram acondicionadas em provetas para a mensuração do volume.

Para a extração da IgY da gema dos ovos foi utilizada a técnica de extração com polietilenoglicol-6000 (PEG-6000), conforme descrito por Rodrigues (2009). Para a delipidação, foi feita uma emulsão da gema, na proporção 1:3 (v/v) em PBS, pH 7,5, seguida de congelamento a -20°C e descongelamento lento, a 4°C. Após esta etapa, adicionou-se o PEG-6000 a uma concentração final de 3,5% (p/v), gradualmente, sobre a gema emulsificada, sob agitação constante, durante 20 minutos a TA. A mistura foi centrifugada a 20.817 x g por 10 minutos a 10 °C e o sobrenadante obtido foi vagarosamente filtrado em papel de filtro e a camada lipídica (amarela) descartada. Em seguida, o PEG-6000, a uma concentração final de 12% (p/v), foi lentamente adicionado ao filtrado, sob as mesmas condições de agitação e centrifugação anteriormente mencionadas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em PBS, pH 7,5, ao volume original da gema e adicionado uma concentração final de 12% (p/v) de PEG-6000, como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2,0 mL de PBS, pH 7,5.

A IgY foi dialisada utilizando-se uma membrana de diálise (*Spectrum*, MWCO : 25.000 Da) submersa em aproximadamente 400 mL de PBS, pH 7,5, sob agitação constante,

sendo o tampão trocado quatro vezes até a retirada da amostra da membrana de diálise. As amostras foram alíquotadas e armazenadas a 4°C, até o momento da realização dos testes.

### 3.2.3 Quantificação da IgY

A concentração da IgY da gema do ovo foi estimada mediante espectrofotometria das proteínas totais purificadas, pelo método de Bradford (1976) (595 nm), empregando uma curva padrão de BSA nas concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL. Para a avaliação da cinética da resposta imune das duas galinhas imunizadas, um *pool* das gemas purificadas na semana anterior a primeira inoculação (dia 1) e nas semanas de cada inoculação (dias 14, 28, 42 e 56) foram utilizadas na quantificação.

### 3.2.4 Caracterização da IgY

A IgY purificada foi analisada após eletroforese em gel SDS-PAGE a 12,5% com tampão de amostra de proteína 2x. Para isto, as amostras foram comparadas sob condições redutoras ( $\beta$ - mercaptoetanol a 5%, Sigma®), e não redutoras, em relação ao padrão de IgY (Sigma®), para a observação da cadeia leve e cadeia pesada da IgY. O padrão de peso molecular dual core (Bio-Rad®) foi empregado em todas as análises por eletroforese. Foram aplicados 2,5 $\mu$ g das amostras de IgY purificadas e da IgY padrão no gel e a eletroforese foi realizada em uma corrente elétrica a 100V durante 1h. O gel foi corado com *Comassie blue R* e descorado, como já citado anteriormente.

### 3.2.5 Avaliação da produção e da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a r-p27 por *Western Blot* (WB)

Inicialmente, foi realizada a eletroforese em gel SDS-PAGE a 12,5%, em uma corrente elétrica de 100V, durante 1h, aplicando-se 2  $\mu$ g/cm de r-27 misturada ao tampão de amostra de proteína 2x. Posteriormente, procedeu-se com a eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência (anexo A.7). Para confirmação da transferência, a membrana foi corada com Ponceau S 0,5% (Sigma®) e posteriormente lavada com água destilada até descoloração das bandas protéicas. Depois de seca, a membrana foi cortada em fitas de aproximadamente 0,5 cm de largura e armazenadas a -20 °C até a realização do *Immunoblot*.

#### *Immunoblot*

- Reação com IgG de coelho

Inicialmente, as fitas foram bloqueadas contra interações inespecíficas dos anticorpos utilizando-se PBS pH 7,2 contendo 0,3% de Tween, acrescidas de leite em pó desnatado a 5% do volume final, sob agitação por 1 h a TA. Posteriormente, a IgG de coelho nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000; 1:3000 e 1:4000 foi adicionada à solução de bloqueio, cada uma em sua respectiva canaleta, incubando-se durante 1h a TA. Uma amostra de soro das coelhas antes das imunizações foi utilizada como controle negativo. As membranas foram lavadas uma vez em PBS Tween e duas vezes em PBS sem Tween. Em seguida, o conjugado de cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Zymed, Invitrogen®) foi adicionado na diluição 1:1000 em PBS,

incubando-se por mais 1h a TA. As membranas foram lavadas por mais três vezes, como descrito anteriormente. A reação enzimática foi revelada com diaminobenzidina (DAB), Tris e peróxido de hidrogênio a 30% (60mg de DAB, 100 µL de peróxido de hidrogênio a 30% em 100mL de Tris 0,15M, pH 7,6), sob agitação constante. Após a marcação das bandas nas membranas, as mesmas foram retiradas rapidamente da solução reveladora e lavadas com água destilada.

- Reação com IgY aviária

As fitas foram bloqueadas como descrito anteriormente. A IgY aviária foi adicionada à solução de bloqueio nas diluições de 1:500, 1:1000, 1:2000; 1:3000 e 1:4000, e posteriormente incubada durante 1h a TA. As membranas foram lavadas uma vez em PBS Tween e duas vezes em PBS sem Tween. O anticorpo anti-galinha (Zymed, Invitrogen®) foi adicionado na diluição 1:1000, incubando-se durante 1h a TA. A etapa final foi realizada com a adição do conjugado anti-galinha marcado com peroxidase (Zymed, Invitrogen®) na diluição 1:1000 em PBS, incubando-se por mais 1h a TA. A reação enzimática foi revelada como descrito anteriormente.

#### ***Dot-blot***

- Reação com IgG de coelho

Para a realização do *Dot-blot*, foram acrescentados, individualmente, 0,6 µg da r-p27 em cada tira da membrana de nitrocelulose. Após secas, as membranas foram bloqueadas como descrito anteriormente e foram utilizadas as mesmas diluições dos anticorpos IgG e dos conjugados citados anteriormente para o *immunoblot*, com o mesmo período de incubações. Uma amostra de soro das coelhas antes das imunizações foi utilizada como controle negativo. A reação enzimática foi revelada como descrito anteriormente.

- Reação com IgY aviária

O mesmo procedimento realizado com a IgG foi repetido para a IgY aviária, com os reagentes utilizados na reação da IgY para a r-p27 no WB.

### **3.2.6 Avaliação da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a p27 nativa por IFI**

- Reação com IgG de coelho

Com o intuito de avaliar o reconhecimento dos anticorpos anti-rp27 contra a p27 nativa do FeLV, 60 esfregaços sanguíneos de 15 gatos FeLV positivos (4 esfregaços de cada gato) e 60 esfregaços sanguíneos de 15 gatos FeLV negativos (4 esfregaços de cada gato) foram confeccionados. Cada esfregaço de um mesmo gato recebeu uma diluição diferente de IgG de coelho anti-rp27, totalizando 4 diluições. Estes gatos foram previamente testados pelo *kit* comercial de IFI indireta (VRMD, Inc), onde alguns também haviam sido testados pelo teste de imunocromatografia SNAP *combo* FIV/FeLV® e/ou PCR. Este foi um procedimento de triagem para a identificação do melhor título dos anticorpos, para posterior validação estatística pela IFI.

Após a confecção e identificação dos esfregaços de sangue *in natura*, as lâminas de microscopia foram secas em TA (HARDY et al., 1973), identificadas e acondicionadas de forma a se evitar a lise celular. Posteriormente, as mesmas foram fixadas, utilizando-se uma

mistura de acetona e metanol, na proporção de 3:1 em TA, por 20 minutos, com o objetivo de preservar o antígeno viral presente em leucócitos e plaquetas. Após a secagem, as lâminas foram processadas imediatamente ou armazenadas a -20 °C até a realização do teste. Com o intuito de selecionar uma área com um grande número de leucócitos, dois círculos de aproximadamente um centímetro de diâmetro foram feitos em cada esfregaço, para demarcação da área a ser examinada. Uma das áreas foi utilizada como controle do negativo e a outra, com um grande número de leucócitos, para pesquisa de células com antígeno de FeLV (p27), na superfície da membrana plasmática.

Inicialmente, 30 µL de solução salina tamponada contendo BSA a 1% foram depositados na área do controle do negativo e 30 µL de anticorpos de coelhos anti-rp27 nas diluições de 1:10, 1:50, 1:100 e 1:200 foram depositados na área para pesquisa da p27 nativa do FeLV, sendo cada diluição adicionada em uma única lâmina das 4 lâminas do mesmo animal. As lâminas foram incubadas a 37 °C, em câmara úmida, durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em tampão de lavagem (anexo A.8) diluído em água destilada (1: 4), para a remoção do excesso de reagente, e depois foram mais uma vez imersas neste tampão, por mais 10 minutos. Após a retirada do tampão de lavagem, as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e colocadas para secagem, em TA.

Posteriormente, 30 µL do conjugado fluorescente FITC anti-IgG de coelho na diluição 1:1000 (Molecular Probes®) foram depositados em cada área, e repetiu-se as etapas de incubação, lavagem e secagem, desta vez no escuro. Após o término da secagem, 5 µL de glicerina tamponada (Anexo A.9) foram colocados sobre as lâminas, que foram montadas com lamínulas de vidro. Um microscópio de fluorescência Olympus BX41 com epi-iluminação, com a objetiva de 40x e 100x, foi utilizado para a leitura da reação. A amostra foi considerada positiva quando leucócitos e plaquetas apresentaram uma fluorescência nítida (HARDY et al., 1973), contrastando com os controles negativos.

- Reação com IgY aviária

Foi realizado o mesmo procedimento descrito para a avaliação da reatividade da IgG de coelho, diferenciando-se na adição de 30 µL de IgY r-p27 nas diluições de 1:10, 1:50, 1:100 e 1:200 na área para pesquisa da p27 nativa do FeLV. O conjugado utilizado (anticorpo de coelho anti-IgY FITC, Invitrogen®) foi adicionado na diluição 1:500. Cabe ressaltar que a amostra escolhida para o teste foi a que apresentou a maior concentração de IgY total, de acordo com a cinética de resposta imune das aves.

### 3.3 Análise estatística

Para a validação da reatividade dos anticorpos (IgG e IgY) anti-rp27 para a p27 nativa do FeLV pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), 60 esfregaços sanguíneos de gatos (30 positivos e 30 negativos para o FeLV) foram utilizados, sendo que os mesmos 15 gatos utilizados anteriormente na triagem tiveram o sangue coletado para a confecção de novos esfregaços. Os 45 gatos restantes também haviam sido previamente testados para o FeLV pelas mesmas técnicas de diagnóstico citadas anteriormente. A eleição da diluição dos anticorpos para a r-p27 (IgG e IgY) utilizada nesta validação foi de acordo com o melhor resultado observado na IFI.

O *software* SPSS versão 15.0 foi utilizado para a análise bivariada, que avaliou a significância das possíveis discordâncias dos resultados, utilizando os anticorpos anti-p27 nativa do *kit* comercial (VRMD, Inc) como padrão de referência.

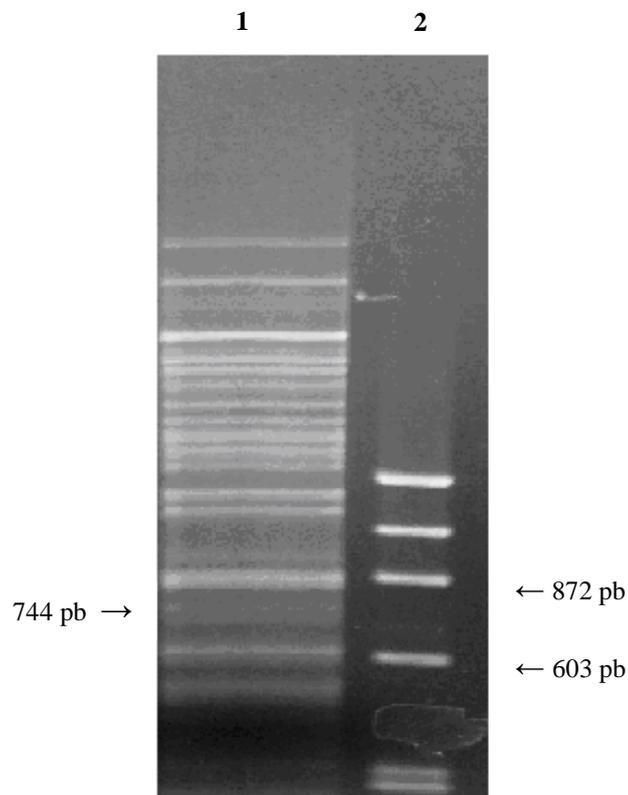
## 4 RESULTADOS

### 4.1. PRODUÇÃO DA p27 RECOMBINANTE

#### 4.1.1 Clonagem molecular da região codificante da p27

##### Amplificação molecular da região alvo

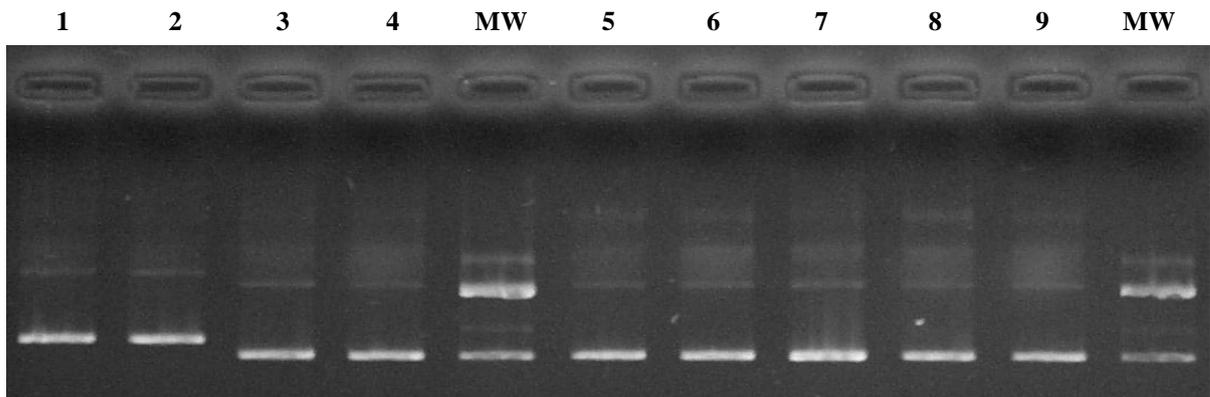
O resultado da amplificação da região alvo, usando-se o DNA genômico total purificado de neutrófilos de um gato infectado como *template* e os oligonucleotídeos descritos pode ser observado na figura 4.



**Figura 4:** Produto da amplificação por PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: Amplificação do DNA genômico total de um gato infectado pelo FeLV, indicando o produto de 744 pb referente à região codificante p27; canaleta 2: Marcador de peso molecular TrackIt øx174 RF DNA digerido com HAEIII (Invitrogen).

### Seleção de clones bacterianos recombinantes

Após a ligação do DNA alvo purificado a partir da remoção da banda de agarose selecionada no gel da PCR (Figura 4) e a transformação do DNA resultante da mistura de ligação por eletroporação em *E. coli* TOP10, os clones bacterianos recombinantes foram selecionados para o sequenciamento nucleotídico pela diferença de peso molecular, utilizando o plasmídeo pET 101 circular (5753 pb) como marcador de peso molecular (MW). Desta forma, dois clones bacterianos (clone 12 e 13) localizaram-se acima da banda referente ao MW, foram selecionados para o sequenciamento nucleotídico, pelo método de SANGER.



**Figura 5:** Análise da extração de DNA plasmidial em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para a seleção dos clones recombinantes. Canaletas 1 e 2: DNA plasmidial dos clones 12 e 13, selecionados para o sequenciamento nucleotídico; canaletas 3 a 9: DNA plasmidial recircularizados dos clones bacterianos; MW: marcador de peso molecular pET 101 recircularizado.

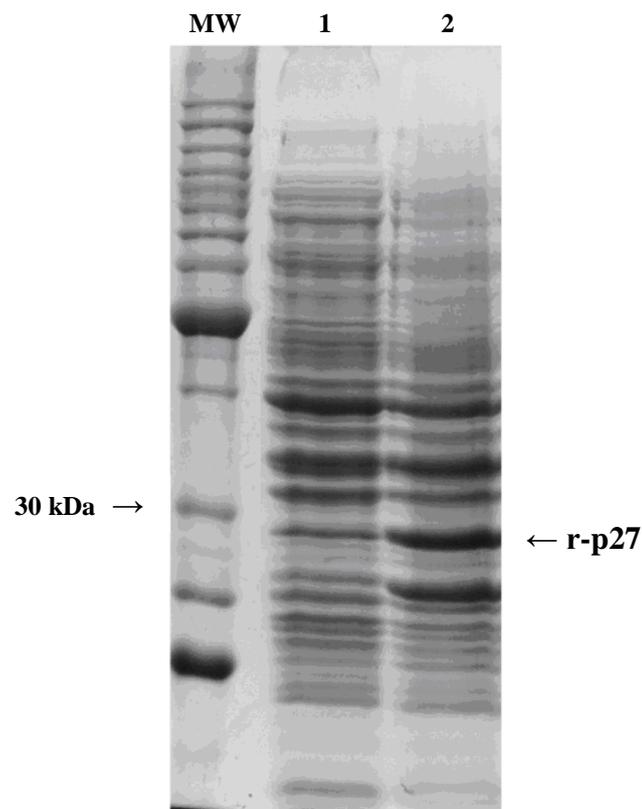
## Sequenciamento e análise das sequências clonadas

O alinhamento das sequências dos insertos do clone 12, clone 13 e das sequências nucleotídicas da região codificante da p27 depositadas no *GenBank*, foi realizado com o intuito de pesquisar possíveis variações nucleotídicas e/ou de aminoácidos (anexo D.1). Os dois clones recombinantes apresentaram uma variação nucleotídica entre si na posição 14 do códon 5, o que acarretou na variação de um aminoácido (clone 12- glutamina (G); clone 13- prolina (P)). A mesma variação ocorreu quando comparou-se esta posição do clone 13 com as demais seis sequências analisadas, onde as mesmas codificaram para a glutamina, apresentando similaridade com o clone 12.

Diversas variações nucleotídicas das sequências dos insertos dos clones 12 e 13 com as demais sequências analisadas foram observadas, porém, na maioria dos casos, não acarretaram na variação de aminoácidos. Em relação à variação em aminoácidos, três sequências apresentaram homologia de 100% com o clone 12 (número de acesso: AF052723; K01803 e AB673431). Uma quarta sequência de referência (número de acesso: JF957363) apresentou somente uma variação ao nível de aminoácidos (posição 286, códon 94), porém, segundo análise do cromatograma, houve possivelmente uma substituição de um nucleotídeo (G ao invés de A), o que acarretou em um aminoácido diferente (substituição da treonina por alanina). A mesma variação da posição 286 ocorreu em outra sequência de referência (número de acesso: M18247), também codificando para alanina, que ainda apresentou mais duas variações, nas posições 319 e 454, codificando para arginina (R) ao invés de alanina (A) e serina (S) ao invés de arginina (R), respectivamente. Uma última sequência de referência (número de acesso: JF957361) apresentou somente uma variação de aminoácido, na posição 431, havendo uma substituição de glutamina (Q) pela prolina (P). As sequências dos aminoácidos podem ser visualizadas no anexo D.2.

#### 4.1.2 Expressão da r-p27

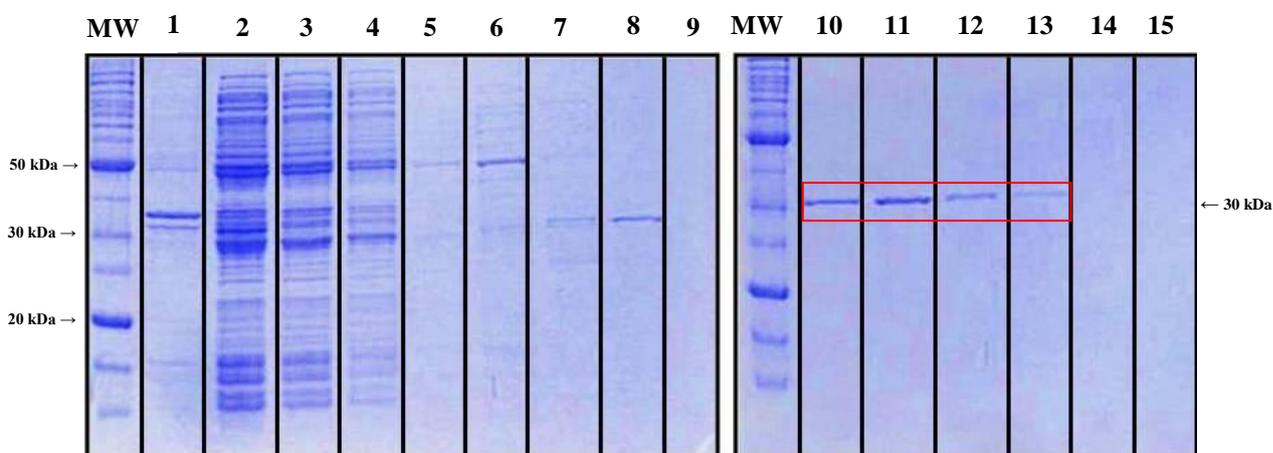
A avaliação da expressão da r-p27 foi feita em gel SDS-PAGE a 12,5%, utilizando-se alíquotas de lisados das culturas bacterianas recombinantes do clone selecionado, antes e depois da indução com IPTG a 0,5 mM. A figura 6 mostra que a eletroforese do extrato celular induzido com IPTG permitiu a detecção de uma banda protéica extra, em relação ao extrato não induzido, com o peso molecular esperado, em torno de 30 kDa.



**Figura 6:** Análise da expressão da r-p27 em gel SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: extrato celular sem indução de expressão; canaleta 2: extrato celular induzido com IPTG a 0,5 mM. MW: marcador de peso molecular Bench Marker™ Protein (Life Technologies).

### 4.1.3 Purificação da r-p27

A eluição da r-p27 foi avaliada por eletroforese dos eluatos coletadas durante a purificação em coluna de afinidade por níquel (Figura 7). Diferentes concentrações de imidazol, variando de 5 mM a 1M foram utilizadas para a eluição. A eluição da proteína recombinante foi iniciada nas etapas de lavagem com 120 mM, sendo totalmente eluída na segunda lavagem com 250 mM de imidazol. Um *pool* destas frações foi feito para a dessalinização e posterior quantificação pelos métodos de BCA (Abs<sub>560nm</sub>), Lowry (Abs<sub>750nm</sub>) e em Nanodrop ND-1000 (Abs<sub>280nm</sub>).



**Figura 7:** Purificação da rp27 em gel SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: precipitado celular; canaleta 2: lisado; canaleta 3: *void*; canaleta 4: eluição com imidazol a 5mM; canaleta 5: eluição com imidazol a 40mM 1ª lavagem; canaleta 6: eluição com imidazol a 40mM 2ª lavagem; canaleta 7: eluição com imidazol a 40mM 3ª lavagem; canaleta 8: eluição com imidazol a 80mM 1ª lavagem; canaleta 9: eluição com imidazol a 80mM 2ª lavagem.; canaleta 10: eluição com imidazol a 120mM 1ª lavagem; canaleta 11: eluição com imidazol a 120mM 2ª lavagem; canaleta 12: eluição com imidazol a 250 mM 1ª lavagem; canaleta 13: eluição com imidazol a 250mM 2ª lavagem; canaleta 14: eluição com imidazol a 1M 1ª lavagem; canaleta 15: eluição com imidazol a 1M 2ª lavagem. MW: marcador de peso molecular Bench Marker™ Protein (Life Technologies).

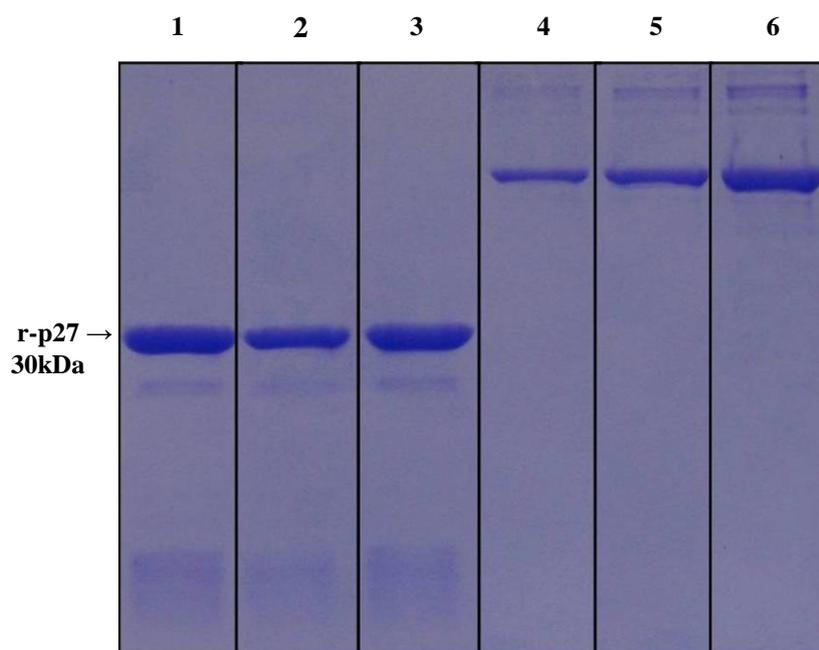
#### 4.1.4 Quantificação da r-p27 purificada

A r-p27 foi quantificada pelos métodos colorimétricos de BCA (Abs<sub>560nm</sub>) e Lowry, (Abs<sub>750nm</sub>), bem como em Nanodrop ND-1000 (Abs<sub>280nm</sub>). O método BCA mostrou-se mais preciso quando comparado às concentrações da proteína BSA em gel SDS-PAGE a 12,5% , sendo estabelecido para todas as demais dosagens. Os valores das concentrações da r-p27 de acordo com cada método de quantificação de proteínas estão expressos na tabela 2.

**Tabela 2:** Valores da concentração da r-p27 de acordo com os métodos de quantificação empregados.

<b>Métodos de quantificação</b>	<b>Concentração da r-p27(mg/mL)</b>
<b>BCA (Abs<sub>560nm</sub>)</b>	<b>0,2</b>
<b>Lowry (Abs<sub>750nm</sub>)</b>	<b>0,4</b>
<b>Nanodrop (Abs<sub>280nm</sub>)</b>	<b>0,3</b>

O resultado da concentração da r-p27 semi-quantitativa em SDS-PAGE a 12,5% pode ser visualizado na figura 8. As bandas da r-p27 foram comparadas às diluições conhecidas da proteína BSA (0,1, 0,2, e 0,4 mg/mL). Em comparação às concentrações proteicas de BSA, tanto a r-p27 quantificada pelo método de Lowry quanto a quantificada pelo nanodrop se assemelham à concentração de 0,4 mg/mL de BSA, enquanto a banda da r-p27 quantificada pelo método de BCA parece estar entre as concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL de BSA.



**Figura 8:** Quantificação da r-p27 em SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: r-p27 quantificada pelo método de Lowry; canaleta 2: r-p27 quantificada pelo método de BCA; canaleta 3: r-p27 quantificada por nanodrop; canaleta 4: BSA a 0,1 mg/mL; canaleta 5: BSA a 0,2 mg/mL; canaleta 6: BSA a 0,4 mg/mL.

#### 4.1.5 Cálculo do rendimento da r-p27 purificada

O cálculo do rendimento da r-p27 foi realizado utilizando-se a média dos rendimentos obtidos a partir de quantificações de cinco diferentes lotes da proteína purificada, dessalinizada e armazenada em tampão PBS pH 7,2. Como citado anteriormente, o método de BCA foi escolhido para a quantificação da r-p27.

O volume utilizado em cada lote purificado foi de 50 mL, originando em média 0,5 g de precipitado celular, com produção de 1,75 mg de proteína em volume final de 7 mL. Assim, estimou-se que, com o aumento de escala para 1 L de cultivo, pode ser obtido em torno de 35mg de proteína (tabela 3).

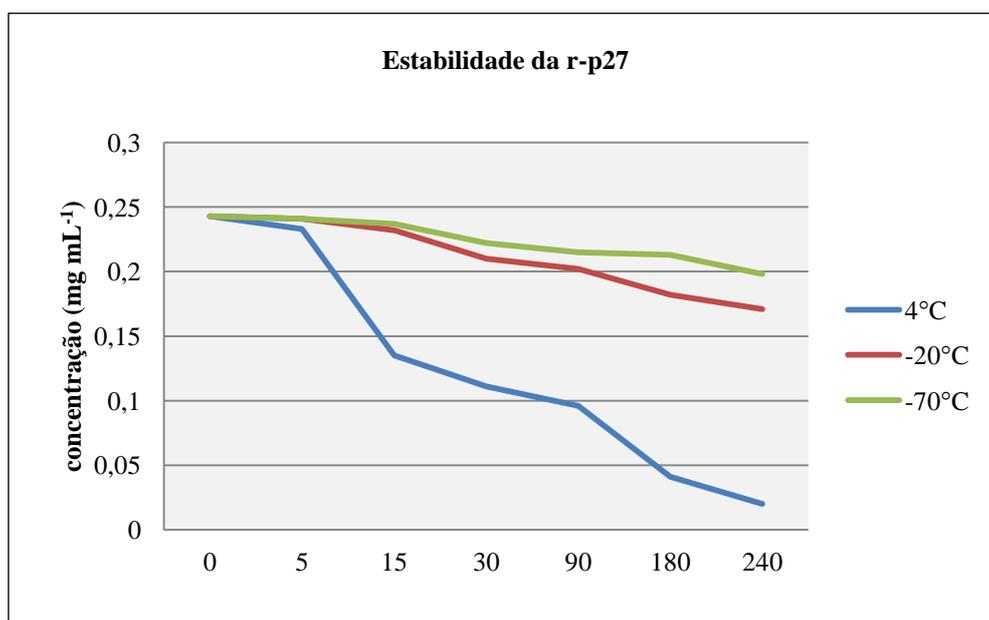
**Tabela 3:** Rendimento da r-p27 purificada.

<b>Volume de cultivo</b> <sup>1</sup>	<b>Biomassa do lisado (g)</b> <sup>2</sup>	<b>Volume purificado (mL)</b> <sup>3</sup>	<b>Concentração da r-p27 (mg)</b> <sup>4</sup>
<b>50 mL</b>	<b>0,5</b>	<b>7</b>	<b>1,75</b>
<b>1000 mL</b>	<b>10</b>	<b>140</b>	<b>35</b>

<sup>1</sup>Cultivo de *E. coli* BL21Star/ pET101/ r-p27em meio LB a 37 °C/200 rpm. <sup>2</sup>Lise por sonicação em tampão de lise Tris 20mM EDTA 1mM. <sup>3</sup>Volume do eluato dessalinizado obtido a partir da purificação por IMAC em coluna de 1mL. <sup>4</sup>Quantificação da proteína em PBS pH 7,2 pelo método BCA.

#### 4.1.6 Avaliação da estabilidade da r-p27

O gráfico 3 mostra os resultados de estabilidade da proteína recombinante quantificada pelo método de BCA no decorrer de 240 dias (dia 5, 15, 30, 90, 180 e 240) nas condições de estocagem a 4 °C, -20 °C e -70 °C. De acordo com os dados observados, houve uma redução de aproximadamente 54 % na concentração de r-p27 durante o primeiro mês de estocagem a 4 °C. Já nas condições de estocagem a -20 °C e -70 °C, a r-p27 apresentou uma melhor estabilidade, havendo reduções das concentrações em 14% e 9%, respectivamente. Após 240 dias de estocagem, constatou-se uma redução de 92%, 30% e 17% nas temperaturas de 4 °C, -20 °C e -70 °C, respectivamente. Os valores exatos das concentrações da r-p27 estão contidos na tabela 4.



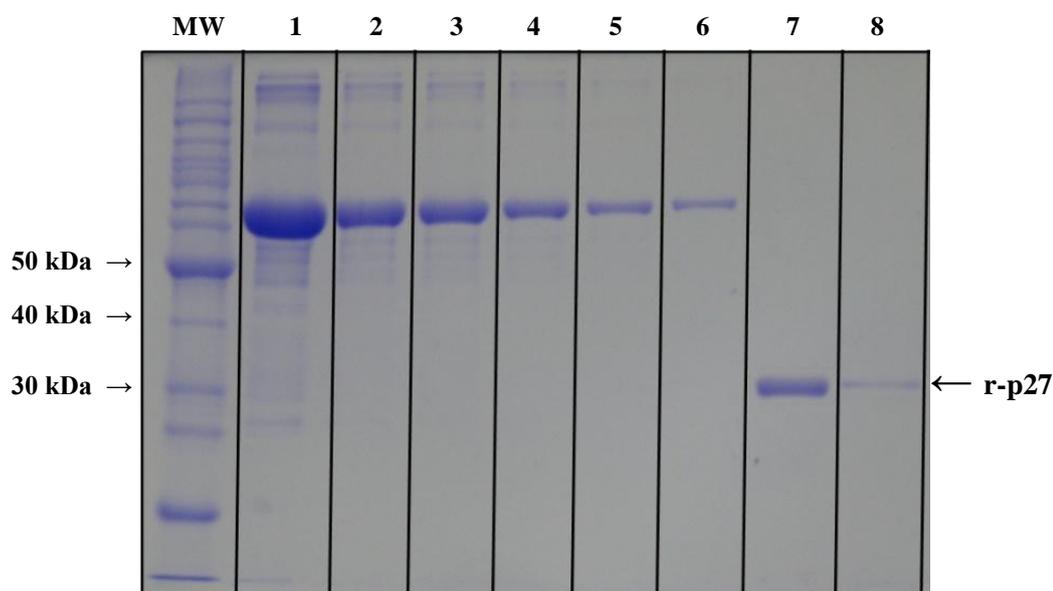
**Gráfico 1:** Estabilidade da r-p27 armazenada em condições de estocagem a 4 °C, -20 °C e -70 °C, durante 240 dias.

**Tabela 4:** Valores das concentrações de r-p27 em condições de estocagem a 4 °C, -20 °C e -70°C, durante 240 dias.

	0	5	15	30	90	180	240
4 °C	0,243	0,233	0,135	0,111	0,096	0,041	0,020
-20 °C	0,243	0,241	0,232	0,210	0,202	0,182	0,171
-70 °C	0,243	0,241	0,237	0,222	0,215	0,213	0,198

#### 4.1.7 Preparo dos inóculos para as imunizações

A adsorção da r-p27 em PBS pH 7,2 ao hidróxido de alumínio foi avaliada em gel SDS-PAGE a 12,5% utilizando-se uma curva padrão de BSA com concentrações de 2,0 a 0,1mg/mL. Os resultados indicam que, dos aproximados 0,4 mg de proteína contidos em cada mL de inoculo antes da adsorção, menos de 0,1 mg permaneceram na forma solúvel, não sendo aderidos ao hidróxido de alumínio (figura 9).



**Figura 9:** Gel SDS-PAGE a 12,5% para a avaliação da adsorção da r-p27 ao hidróxido de alumínio. Canaleta 1: BSA a 2,0mg/ml; canaleta 2: BSA a 1,0mg/mL; canaleta 3: BSA a 0,8mg/mL; canaleta 4: BSA a 0,4 mg/mL; canaleta 5: BSA a 0,2mg/mL; canaleta 6: BSA a 0,1 mg/mL; canaleta 7: r-p27 antes da adsorção ao hidróxido de alumínio; canaleta 8: r-p27 8h depois da adsorção ao hidróxido de alumínio. MW: marcador de peso molecular Bench Marker™ Protein (Life Technologies).

#### 4.1.8 Reatividade da r-p27 contra anticorpos anti-p27 nativa

A reatividade da r-p27 foi avaliada utilizando-se o *kit* comercial de diagnóstico imunocromatográfico (SNAP *combo* FIV/FeLV® -IDEXX Laboratories), de acordo com as instruções do fabricante. Após 15 minutos da adição da r-p27 ao orifício de entrada do material a ser testado, foi observado o surgimento de um círculo de coloração azul na posição correspondente de amostras positivas para o FeLV (seta), confirmando o reconhecimento do anticorpo anti-p27 nativa sensibilizado na membrana do *kit* pelo antígeno r-p27.

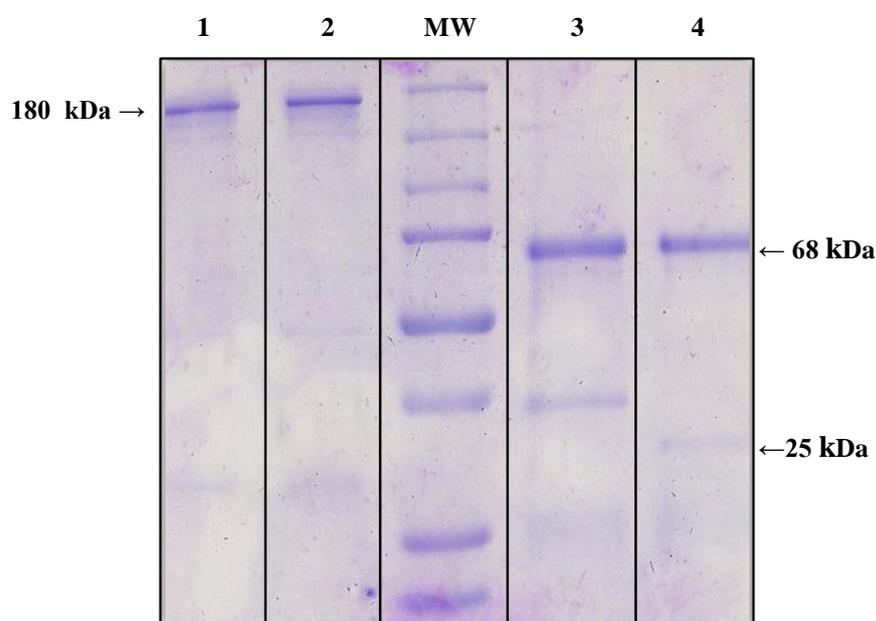


**Figura 10:** *kit* comercial de diagnóstico imunocromatográfico (SNAP *combo* FIV/FeLV® -IDEXX Laboratories). Reatividade dos anticorpos anti-p27 nativa contra a r-p27 evidenciada pelo surgimento de um círculo azul na membrana de imunocromatografia, no mesmo local correspondente a uma amostra positiva para o FeLV (seta). O círculo central representa o controle positivo da reação.

## 4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA A r-p27

### 4.2.1 Caracterização da IgY

A caracterização da IgY foi realizada por meio eletroforese do material purificado com PEG-6000 em gel SDS-PAGE a 12,5%, sob condições não redutoras e redutoras. Na figura 11 pode ser observado o perfil eletroforético das proteínas purificadas da gema do ovo de acordo com o da IgY padrão, onde o peso molecular da cadeia leve é de, aproximadamente, 25 kDa e o da cadeia pesada é de, aproximadamente, 68 kDa.

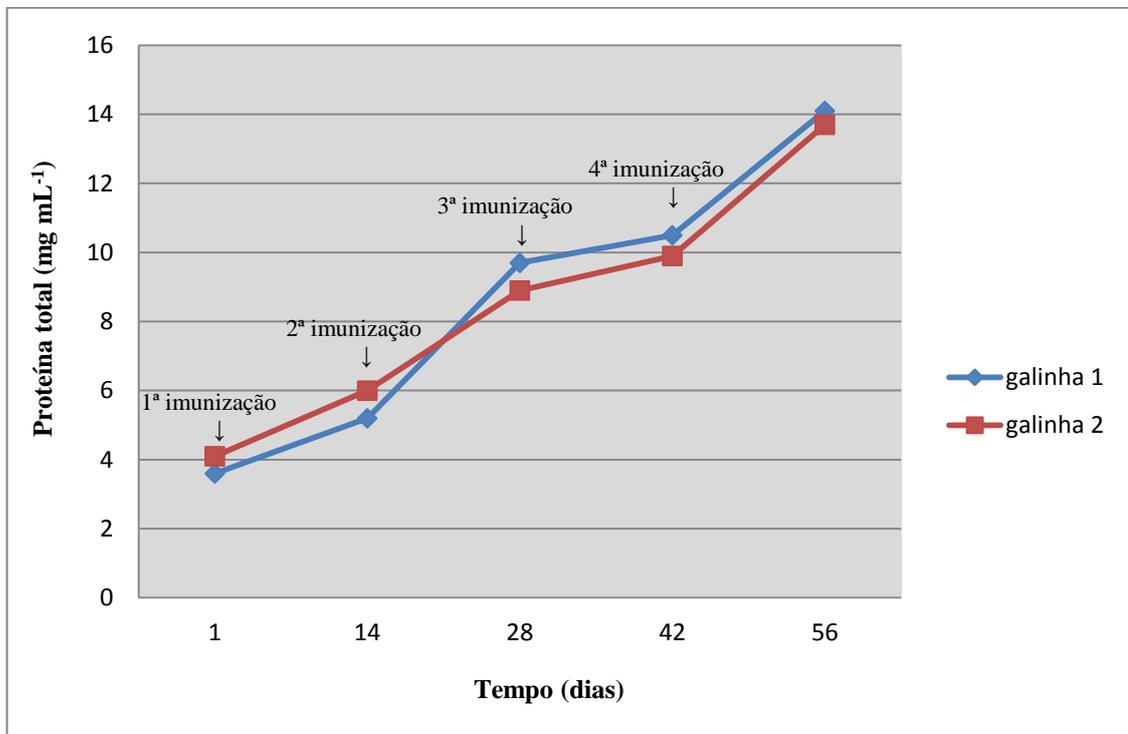


**Figura 11:** Caracterização da IgY obtida pelo método de extração PEG- 6000 por SDS-PAGE a 12,5%. Canaleta 1: IgY purificada, sob condição não redutora; canaleta 2: IgY padrão (Sigma), sob condição não redutora; canaleta 3: IgY padrão (Sigma), sob condição redutora; canaleta 4: IgY purificada, sob condição redutora. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad.

#### 4.2.2 Quantificação da IgY

Na espectrofotometria observou-se a quantidade de IgY total presente na gema do ovo. De acordo com o gráfico 4, observou-se um aumento da concentração de IgY entre o dia 1 e o dia 14 (dia da primeira imunização). O período compreendido entre a segunda e a terceira imunização foi marcado por um aumento mais acentuado da concentração de IgY total (dia 14 a 28), que passou a ser mais discreto no período seguinte (dia 28 a 42). O período posterior à quarta e última imunização (dia 42), agora com CpG-ODN, foi marcado por altas concentrações protéicas, alcançando valores aproximados de 14mg/mL de IgY total (dia 56). As duas galinhas apresentaram resposta similares quanto à concentração de IgY total.

Com base nestes dados, a alíquota da IgY purificada do período logo após a última imunização (dia 56) foi selecionada para as provas de WB e *Dot-Blot*.

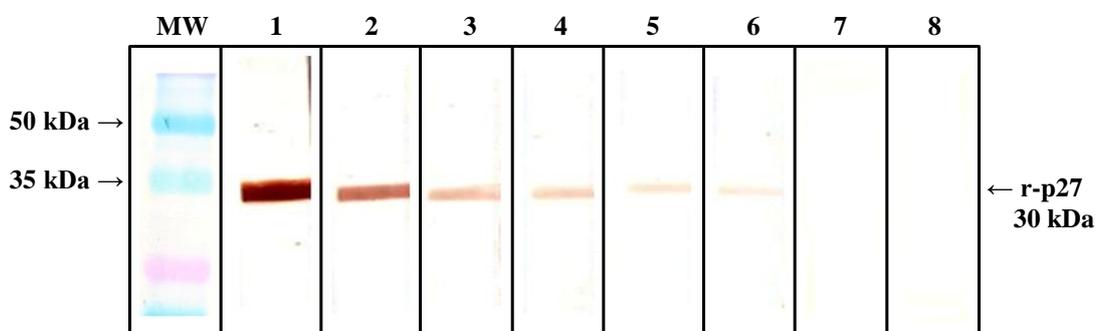


**Gráfico 2:** Concentrações de IgY total purificada da gema do ovo em 56 dias, quantificada pelo método de *Bradford*.

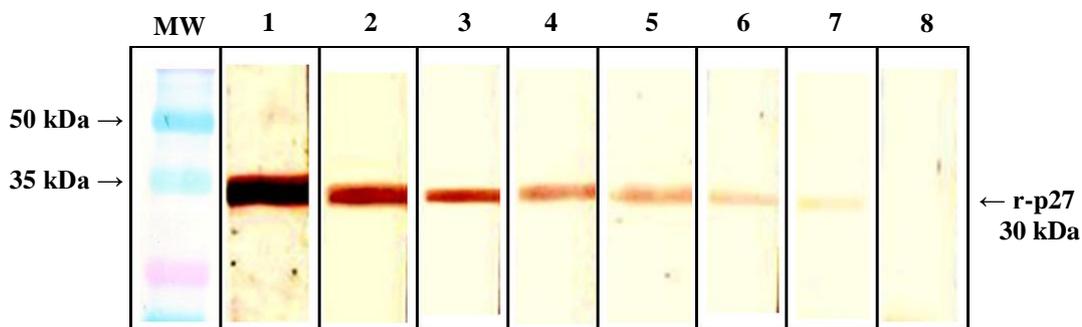
### 4.2.3 Avaliação da produção e reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a r-p27 por Western Blot (WB).

#### *Immunoblot*

As figuras 12A e B revelaram a presença e a reatividade da IgG de coelho e da IgY aviária para a r-p27, empregando conjugados anti-espécies específicos marcados com peroxidase, para ambas imunoglobulinas. Das diluições dos anticorpos empregadas (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000; 1:3000 e 1:4000), os melhores títulos observados foram de 1:2000 para a IgG de coelho e de 1:4000 para a IgY aviária.



**Figura 12A:** Reatividade da IgG para a r-p27 por WB nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad.



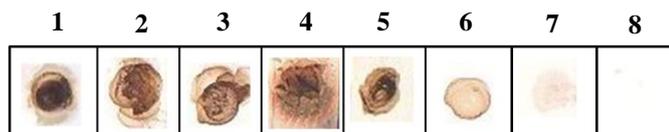
**Figura 12B:** Reatividade da IgY para a r-p27 por WB nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo. MW: marcador de peso molecular DuoCore, BioRad.

### ***Dot-Blot***

A presença e a reatividade da IgG de coelho e da IgY aviária para a r-p27 também foram avaliadas por *Dot-blot* (figura 13A e B). A reatividade dos anticorpos IgG (A) e IgY (B) para a r-p27 foram observadas em todas as diluições empregadas .



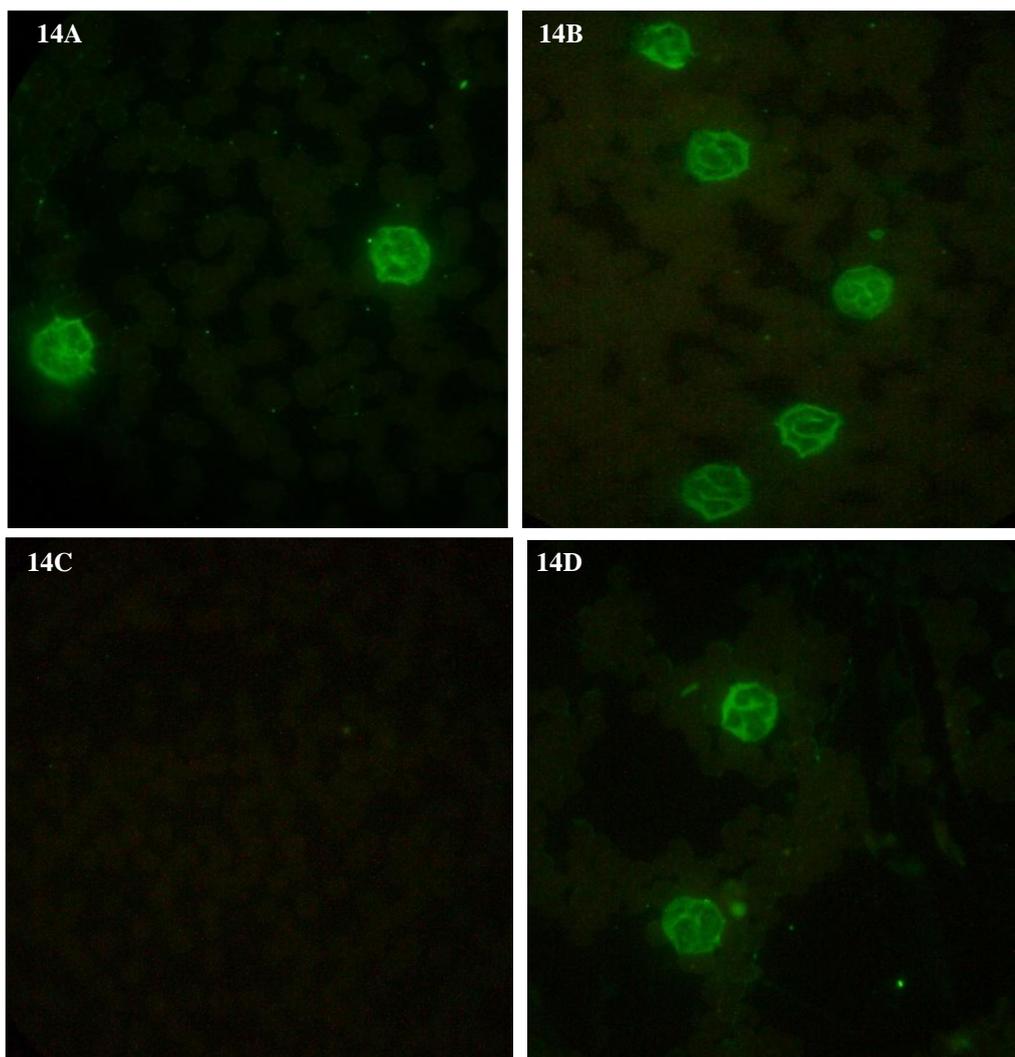
**Figura 13A:** Reatividade da IgG para a r-p27 por *Dot-Blot* nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2 diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta a 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo.



**Figura 13B:** Reatividade da IgY para a r-p27 por *Dot-Blot* nas diferentes diluições. Canaleta 1: diluição 1:100; canaleta 2: diluição 1:500, canaleta 3: diluição 1: 1000; canaleta 4: diluição 1:2000; canaleta 5: diluição 1:3000; canaleta 6: diluição 1:4000; canaleta 7: diluição 1:5000; canaleta 8: controle negativo.

#### 4.2.4 Avaliação da reatividade da IgG de coelho e IgY aviária para a p27 nativa por IFI

A IFI dos 60 esfregaços sanguíneos oriundos de 15 gatos FeLV positivos revelou uma fluorescência nítida na diluição de 1:10 para a IgG de coelho (Figura 14 A) e diluição de 1:100 para a IgY aviária (Figura 14 B), comprovando a reatividade da IgG e IgY contra a p27 nativa do FeLV. Os 60 esfregaços sanguíneos oriundos de 15 gatos FeLV negativos não apresentaram fluorescência. O controle negativo e positivo da IFI podem ser visualizados na figura 14 C e D, respectivamente.



**Figura 14:** Esfregaços de sangue utilizados para a avaliação da reatividade da IgG e IgY para a p27 nativa do FeLV. 14A: Leucócitos apresentando fluorescência, revelando reatividade da IgG para a p27 nativa do FeLV na diluição 1:10; 14B: Leucócitos apresentando fluorescência, revelando reatividade da IgY para a p27 nativa do FeLV na diluição 1:100; 14C: controle do conjugado; 14D: controle positivo utilizando *kit* comercial de IFI. Aumento de 100x.

### 4.3 Análise estatística

Do total de 120 esfregaços de sangue coletados de 30 gatos positivos e 30 negativos para o FeLV (amostras em duplicata), somente uma amostra positiva apresentou resultado discordante com o *kit* comercial de diagnóstico de IFI para FeLV (VRMD, Inc), apresentando resultado negativo tanto para a IgG de coelho tanto para a IgY aviária (mesma amostra). O teste de qui-quadrado apresentou valor de  $p= 0,03$ , não havendo diferença significativa entre as amostras testadas pelo *kit* comercial e as amostras testadas com as IgG de coelho e IgY aviária.

## 5 DISCUSSÃO

A crescente aquisição de gatos como animais de companhia e sua concentração em pequenos grupos ou em colônias tem propiciado a incidência e persistência das infecções virais. Assim, o FeLV tornou-se a maior causa de mortes entre os gatos domésticos.

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos Pet – Anfal Pet (2011), a população atual de gatos no Brasil gira em torno de 18,3 milhões e tem crescido anualmente, aumentando a preocupação do *status* sanitário dos felinos, principalmente com as retrovíroses felinas. Enquanto diversos estudos epidemiológicos apontam uma queda na prevalência da infecção pelo FeLV na Europa e Estados Unidos, no Brasil esta realidade ainda está distante (LEVY et al., 2008; MOORE et al., 2004). Estudos no estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte apontam uma prevalência da infecção de 6,16%, 11, 52% e 47,5%, respectivamente (JORGE – JUNQUEIRA et al., 2011, ALMEIDA et al., 2012; COELHO et al., 2011).

O teste comercial de imunocromatografia SNAP *combo* FIV/FeLV® (*IDEXX Laboratories*) é o mais utilizado na rotina clínica para o diagnóstico do anticorpo anti-p24 do FIV e proteína de capsídeo p27 do FeLV. Este *kit* de diagnóstico apresenta custo elevado, além da necessidade de repetição 60 dias após o primeiro teste, devido à possibilidade de resultados positivos falsos decorrentes de uma viremia transitória. Este custo restringe o diagnóstico das retrovíroses felinas no Brasil. Este aspecto vem representando, talvez, um dos maiores obstáculos para viabilização do diagnóstico de rotina e as pesquisas sobre o FeLV no País.

Naturalmente, o diagnóstico da Leucemia Viral Felina representa o passo inicial e indispensável para o gerenciamento clínico, pesquisa e desenvolvimento dos métodos de controle e tratamento. As técnicas de imunodiagnóstico utilizam de anticorpos específicos que, por sua vez, são obtidos a partir de inoculações de antígenos em animais de laboratório. Logo, a produção de antígenos é essencial para o estabelecimento dos métodos diagnósticos, bem como desenvolvimento vacinas e outras aplicações.

Neste sentido, o propósito deste estudo foi a obtenção de um antígeno recombinante do FeLV associado à produção de IgY, que servirá para o desenvolvimento de análises sorológicas de alta sensibilidade e especificidade, através da prova de IFI e ELISA. Estas provas sorológicas, quando incorporadas à rotina clínica, poderão reduzir drasticamente o custo das técnicas e viabilizar o diagnóstico de rotina, possibilitando o fornecimento de mais dados sobre a prevalência da infecção de FeLV no Brasil, que hoje é quase limitada à região sudeste.

A produção de proteínas virais recombinantes por bactérias e outros sistemas biológicos tem sido usada para diferentes efeitos como uma tecnologia alternativa aos métodos clássicos de purificação de proteínas a partir de vírus cultivado. Tais alternativas são de interesse especial para o vírus que dificilmente são cultivadas em culturas de células, tais como os lentivírus (MAZUR et al., 2010). Basicamente, a região codificante que se deseja expressar é ligada a um vetor, como um plasmídeo bacteriano, e esta construção é inserida em adequado sistema biológico para expressar a proteína recombinante, como bactérias (JONASSON et al., 2002). As culturas de bactérias recombinantes representam uma fonte prática de expressão de uma proteína heteróloga, tornando a tecnologia de DNA recombinante uma ferramenta importante nos estudos da estrutura, função e a identificação de novas proteínas, principalmente com finalidades terapêuticas, profiláticas e diagnósticas (DIGERMANN, 2008; CHOU, 2007; GEORGIU; SEGATORI, 2005; CORNELIS, 2000).

A p27 do FeLV foi amplificada e clonada com sucesso. No que se refere à expressão da r-p27 pela *E. coli* BL21 Star, não existem estudos suficientes para uma avaliação comparativa da eficiência de sua expressão. Também não se tem o conhecimento da característica de toxicidade desta proteína para a *E. coli*, mesmo diminuindo esta possível capacidade de

toxicidade submetendo as culturas inicialmente a crescimento em condições repressoras, procedendo com a indução da expressão após uma considerável biomassa alcançada. Um estudo mais semelhante, com expressão da p24 do FIV, apresentou níveis de expressão similares aos observados no presente estudo (ALVES, 2010).

É importante considerar as dificuldades existentes durante os processos de clonagem e expressão de proteínas recombinantes, citando exemplos como o enovelamento incorreto da proteína durante a expressão, o que pode acarretar na remoção de epítomos conformacionais necessários à resposta humoral; a formação de agregados protéicos insolúveis (corpúsculos de inclusão) em decorrência de uma superexpressão intracitoplasmática e a saturação de chaperonas presentes na célula hospedeira e consequente perda da conformação do antígeno expresso (JANA; DEB, 2005; KURLAND; GALLANT, 1996). Fatores como a preservação de características físico-químicas da proteína, de sua atividade funcional ou toxicidade nativa, influenciando o resultado de imunizações (KADIOGLU et al., 2004; LUCHESE et al., 2009) bem como a degradação protéica realizada por proteases do hospedeiro também são relevantes para o sucesso da obtenção de um antígeno recombinante (MAKRIDES, 1996; BANEYX, 1999).

A propósito, deve ser ressaltado que a escolha feita neste trabalho pelo vetor pET 101 Directional TOPO® foi em razão deste vetor incluir sequências extras de nucleotídeos, que permitem a expressão da proteína heteróloga com uma cauda de poli-histidina, facilitando o processo de detecção e de purificação após a expressão da proteína recombinante. Mediante isto, o tamanho molecular da r-p27 observado, na análise feita tanto em gel SDS-PAGE quanto para WB, correspondeu a aproximadamente 30 kDa, tendo em vista a incorporação da cauda de poli-histidina.

O sequenciamento nucleotídico identificou uma única alteração nucleotídica entre as sequências dos insertos dos clones recombinantes do FeLV, o que teve como consequência a variação de um aminoácido. Em um destes clones, o aminoácido também não apresentou homologia com as seis sequências de referência do FeLV. Este clone apresentou problemas na expressão e na purificação da proteína recombinante, portanto, foi descartado como clone de trabalho, optando-se trabalhar somente com o outro clone recombinante (clone 12). Algumas suposições podem ser feitas, como um erro durante o processo de amplificação do DNA proviral gerado na etapa de extensão pela enzima DNA polimerase *Platinum® Taq High Fidelity*, mesmo sendo a mais indicada para a clonagem de genes, uma vez que permite as correções equivocadas de incorporação nucleotídica, minimizando assim os erros de polimerização do DNA. Outra especulação, talvez de menor proporção, está relacionada a um possível erro de técnica, havendo uma incorporação nucleotídica equivocada pelo próprio sequenciador. Como não havia a presença de um pico do nucleotídico supostamente correto próximo ao incorporado equivocadamente, pressupõe-se que não houve erro de leitura pelo operador da técnica de sequenciamento.

Diferenças nucleotídicas entre o clone recombinante eleito para o estudo e as demais sequências analisadas foram observadas, porém, não acarretaram em alterações de aminoácidos em três das seis sequências de referência, apresentando homologia de 100% com as mesmas (número de acesso: AF052723; K01803 e AB673431). Uma maior frequência destas alterações nucleotídicas foi observada no terceiro nucleotídeo de cada códon, porém, não influenciou na variação dos aminoácidos. Este tipo de variação nucleotídica silenciosa é explicada pelo fato do terceiro nucleotídeo de cada códon ser menos específico do que os dois primeiros, pois durante o processo de tradução ocorre uma ligação mais fraca entre o terceiro nucleotídeo do RNA mensageiro com o primeiro nucleotídeo do RNA transportador (STRACHAN; READ, 1999). Assim, dois aminoácidos diferentes podem ser codificados por tripletos que difiram entre si somente na terceira posição. Observa-se, portanto, que uma substituição de um único nucleotídeo na molécula do DNA (e do RNA mensageiro) não vai, obrigatoriamente, alterar a cadeia de

aminoácidos da proteína por ele codificada (SILVA, 2006). Estes dados corroboram com o descrito anteriormente neste estudo.

Das três sequências nucleotídicas de referência onde houve variação em aminoácidos, uma apresentou somente um aminoácido alterado (número de acesso: JF957363). De acordo com a análise do cromatograma desta sequência, pode-se concluir que a mesma apresentou um nucleotídeo incorporado erroneamente, o que acarretou na modificação deste aminoácido. Em outra sequência de referência ocorreu o mesmo, porém, a variação ocorreu em outro aminoácido. Quando esta sequência foi alinhada às demais sequências de referência e sequência do inserto do clone de trabalho do presente estudo, pôde-se concluir que a mesma era a única que apresentava tal aminoácido variante (número de acesso: JF957361). A última sequência analisada apresentou uma maior variação, tanto nucleotídica quanto de aminoácidos (três variações), a qual diferia da maioria das demais sequências (número de acesso: M18247). Esta sequência foi publicada em uma época onde o resultado do sequenciamento nucleotídico ainda era analisado em gel (DONAHUE, 1988). Como este método de sequenciamento apresentava uma menor sensibilidade, acredita-se que esta sequência não seja fidedigna com a sequência da p27.

Pela análise do alinhamento das sequências nucleotídicas, pôde-se observar que a região p27 do gene *gag* do FeLV permanece conservada, e as variações nucleotídicas identificadas não interferiram na sequência de aminoácidos. Uma vez que a r-p27 apresentou homologia com a maioria destas sequências de referência depositadas no *GenBank*, concluiu-se que a mesma possui homologia com a p27 nativa, podendo ser usada como fonte de antígeno para a produção de anticorpos utilizados nos imunoenaios para a detecção da leucemia viral felina.

Em se tratando da concentração da r-p27, foram verificadas limitações para obtenção de maiores concentrações da proteína na forma solúvel, sendo 0,4 mg/mL o máximo atingido, utilizando os protocolos descritos neste trabalho. Concentrações acima das mencionadas resultaram na saturação da proteína, que apresentou um aspecto gelatinoso.

Embora as análises de estabilidade das proteínas recombinantes sejam frequentemente negligenciadas, estas representam um importante passo para a sua purificação e armazenamento, podendo viabilizar uma produção em larga escala (LARENTIS et al., 2011). A estabilidade da r-p27 em tampão PBS foi avaliada em temperaturas de estocagem 4°C, -20°C e -70°C, durante 240 dias. Foi observada instabilidade da proteína a temperatura de 4°C, que após 30 dias de estocagem teve sua concentração reduzida por aproximadamente a metade da concentração inicial. Já nas temperaturas de -20°C e -70°C a r-p27 apresentou uma maior estabilidade, com uma redução na concentração protéica após 30 dias de estocagem em torno de 13% e 8%, respectivamente. Ao final do período de avaliação da estabilidade da r-p27 (240 dias), observou-se um declínio nas concentrações em 19% a -70°C e 30% a -20°C. Futuros experimentos devem ser realizados com a finalidade de otimizar a estabilidade desta proteína recombinante, como por exemplo, testando-se a estocagem em tampões diferentes ao tampão PBS e também pela utilização de agentes que removam as proteases da amostra purificada.

A necessidade da retirada do imidazol da proteína purificada (dessalinização) com a finalidade de inoculação em animais de laboratório para a produção de anticorpos e/ou formulação de vacina acaba aumentando a manipulação e diluição da amostra, também contribuindo para o decréscimo da concentração da r-p27. Isto implicou, por exemplo, na ausência de um estudo de cinética de adsorção da r-p27 ao hidróxido de alumínio, optando-se em prosseguir por um tempo de adsorção de 8 horas, onde somente uma alíquota desta amostra foi coletada para análise em gel de poliacrilamida.

A r-p27 foi reconhecida pelos anticorpos anti-p27 nativa no teste imunocromatográfico SNAP *combo* FIV/FeLV® (*IDEXX Laboratories*), comprovando que há homologia antigênica entre a p27 nativa e a p27 recombinante do FeLV.

A caracterização da IgY foi avaliada pela eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese da IgY, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, promoveu a quebra da imunoglobulina em dois fragmentos de aproximadamente 68 e 25 kDa, compatíveis com os pesos moleculares das cadeias pesada e leve, respectivamente. Não há um consenso sobre este peso molecular, havendo divergências na literatura, que podem variar entre 70 a 18 kDa, respectivamente (CARLANDER et al., 2000). O alto grau de pureza obtido pela purificação da IgY pôde ser comprovado pela presença de poucas bandas inespecíficas no gel. Uma vez confirmada que a imunoglobulina purificada da gema do ovo era realmente a IgY, os imunoenaios de WB, *Dot-blot* e IFI puderam ser realizados.

No que se refere à produção e reatividade dos anticorpos, ambas espécies responderam às imunizações com a r-p27, sendo observados títulos de IgY maior ou igual a 1:4000 e de IgG de coelho maior ou igual a 1:2000. Já no *Dot-blot*, não foram observadas diferenças entre os títulos, onde ambas imunoglobulinas reagiram até a diluição de 1:4000, concluindo que houve reconhecimento para r-p27 tanto para os epítomos conformacionais quanto para os epítomos lineares. Ambas imunoglobulinas reagiram para a p27 nativa em esfregaços de sangue de gatos FeLV positivos, pela técnica de IFI, as quais foram validadas estatisticamente pelo teste de qui-quadrado.

Uma comparação entre a resposta imune das duas espécies perante as inoculações não pôde ser avaliada, cabendo ressaltar a diferença dos adjuvantes empregados nas imunizações das duas espécies. Na imunização das coelhas foi empregado o hidróxido de alumínio como adjuvante, cuja atividade baseia-se em pelo menos quatro aspectos: formação de depósito de antígenos nos tecidos para produzir uma exposição prolongada; produção de antígenos particulados para facilitar a apresentação para as células apresentadoras de antígenos; ativação do complemento e estimulação dos macrófagos para induzir retenção e ativação de linfócitos (LINDBLAD, 1995). Algumas limitações podem ser citadas para o uso dos adjuvantes à base de alumínio, como reações locais, produção de anticorpos do tipo IgE e, principalmente, a incapacidade de estimular a imunidade mediada por células, que representa a principal resposta de defesa contra vírus (BAYLOR et al., 2002).

Já o adjuvante CFA, o qual foi utilizado na primeira imunização das aves, é composto por uma emulsão oleosa em água contendo micobactéria morta pela ação do calor ou componentes de sua parede celular, sendo conhecidas como efetivos adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune elevada e duradoura, tanto do tipo humoral quanto celular (HILLEMANN, 1966; EDELMAN, 1980; GUPTA; SIBER, 1995). Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes oleosos é que o uso frequente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como formação de granulomas e cistos, que são atribuídas a diversos fatores incluindo impurezas do óleo (BARTELING; VREESWIJK, 1991). Em aves, o uso do CFA não parece ocasionar lesões severas como em mamíferos, sendo bem tolerado, porém, um protocolo é sugerido como mais efetivo, utilizando o CFA na primeira imunização e substituindo as demais imunizações com IFA, que é mais eficaz para a produção de imunoglobulinas específicas (LÉVESQUE et al., 2007; CHALGHOUMI et al., 2008; CHALGHOUMI et al., 2009; KAPOOR et al., 2000).

No presente trabalho, este protocolo foi seguido, havendo somente a alteração com uma quarta inoculação com o CpG-ODN, com o intuito de aumentar a resposta imune para produção IgY para a rp27. Os CpG-ODN são agonistas sintéticos de receptores *Toll-like* e fortes indutores tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida, podendo ser usado como adjuvante para vacinas contra uma variedade de patógenos (EASTCOTT et al., 2001, MAHMOOD et al., 2006; WU et al., 2009).

O único adjuvante aprovado para uso em vacinas humanas é o hidróxido de alumínio, pois os padrões de segurança das vacinas são elevados e não permitem os efeitos colaterais dos adjuvantes. Como a elaboração dos inóculos para as imunizações das coelhas foi realizada no laboratório de tecnologia recombinante (LATER) – Biomanguinhos/Fiocruz, que seguem o protocolo de imunização de coelhos com o adjuvante hidróxido de alumínio, o presente estudo também seguiu o mesmo protocolo de imunização.

Uma significativa resposta imune das aves para a r-p27 era esperada, devido a fatores tais como a distância filogenética, maior rendimento, dentre outros anteriormente mencionados. Não foram verificadas diferenças significativas dos títulos de anticorpos entre as galinhas imunizadas, ocorrendo o mesmo entre as coelhas.

Diferenças entre os conjugados, que podem apresentar sensibilidade de detecção diferentes, bem como a diluição dos mesmos também podem ter interferido na comparação de resposta de anticorpos entre as duas espécies.

No que se refere à resposta imune das aves perante às inoculações da r-p27, foi observado que as aves imunizadas com a r-p27 misturada ao CFA apresentaram resposta com aumento de IgY total purificada da gema do ovo logo após a primeira imunização. Entre a terceira e a quarta imunizações (com IFA), estas concentrações apresentaram aumento discreto, que foi contrastada com uma alta concentração de IgY duas semanas após a última inoculação da r-p27 (com CpG-ODN), alcançando um rendimento protéico de aproximadamente 14,0 mg/mL.

Segundo Vasconcelos (2010) a IgY total purificada de gemas de ovos de frangas imunizadas com o vírus da hepatite A (HAV), misturado ao IFA e CpG-ODN, alcançou concentrações máximas de, aproximadamente, 14,0 mg/mL, após 15 semanas da primeira inoculação. Este grupo também apresentou um maior título de IgY específica para o HAV. Um outro grupo imunizado com o HVA misturado somente ao IFA, alcançou concentrações de, aproximadamente, 9,0 mg/mL de IgY total na gema do ovo, demonstrando que houve uma melhor resposta quando o HVA é inoculado misturado ao IFA e CpG-ODN. Lévesque et al. (2007) compararam a resposta de frangas imunizadas com a porção F4 (fímbria) da *E. coli* enterotoxigênica misturada ao IFA e IFA suplementado com CpG-ODN, comprovando um rendimento na produção de IgY de até 942% do grupo imunizado com IFA e CpG-ODN.

Entretanto, optou-se por uma última inoculação utilizando a r-p27 misturada somente ao CpG-ODN, sem o IFA, o que levantou a hipótese que a presença do IFA suplementado com o CpG-ODN poderia ter potencializado a resposta imune das aves. Mesmo assim, uma concentração de IgY total foi alcançada para os ensaios de WB e *Dot-Blot*. Além disso, concluiu-se que uso de CpG-ODN é rentável e bioético para a produção de anticorpos em aves, o que permite uma redução do número de imunizações necessárias e efeitos adversos.

A espectrofotometria avaliou somente a concentração de IgY total, sugerindo um aumento da concentração total perante as inoculações com a r-p27. Um ensaio por ELISA deverá ser padronizado para avaliar a concentração de IgY específica, com o intuito de analisar com mais clareza a resposta das aves desafiadas com a r-p27.

Na cinética da resposta de anticorpos nas galinhas é mais frequente ocorrer um aumento transiente de IgY na resposta imune primária, após a primeira imunização, seguida de uma resposta secundária mais efetiva, logo após a segunda imunização, aumentando a concentração de IgY sérica, dentro de aproximadamente 10 dias. O título de anticorpos pode se manter estável por várias semanas ou declinar em alguns dias (SCHADE et al., 2005).

A concentração de IgY, assim como o seu grau de pureza, também estão diretamente relacionados ao método de purificação. Diversas formas de delipidação dos ovos e purificação da IgY tem sido descritos na literatura, variando desde as características anteriormente citadas até o custo e praticidade da técnica de purificação (POLSON et al., 1980; SPILLNER et al., 2012; SCHADE et al., 2005). Estes procedimentos podem ser usados em combinação, de

acordo com a quantidade, pureza e atividade biológica desejada. A inconveniência e os custos envolvidos são fatores relevantes. Um processo de isolamento pode ocasionar uma escolha entre a quantidade e pureza dos anticorpos, uma vez que vários estágios de purificação tendem a resultar em baixas concentrações de IgY na gema (GUIMARÃES et al., 2008).

Dentre as diversas técnicas de obtenção da IgY, pode-se citar a precipitação por sulfato de amônio, polietilenoglicol (PEG-6000), etanol ou métodos de congelamento e descongelamento para a delipidação da gema (POLSON et al., 1980; VASCONCELOS, 2010; HORIKOSHI et al., 1993; CHANG et al., 2000; BIZANOV et al., 2006). A purificação com PEG é uma das mais utilizadas para a obtenção de IgY, obtendo-se alto rendimento concentrações e grau de pureza, ainda com a vantagem de se trabalhar em temperatura ambiente, sem nenhum risco de desnaturação do anticorpo (AKITA; NAKAI, 1993). Estas vantagens mencionadas, juntamente com a experiência da utilização do PEG para a obtenção de IgY em pesquisas anteriores realizadas no Laboratório de Imunologia e Viroses da UFRRJ (BERNARDO, 2009), fizeram com que este método fosse o eleito para a obtenção de IgY anti- r-p27.

Uma das limitações da purificação com o PEG é a sua interferência em alguns imunoenaios. De acordo com Segundo Ismail (2005), a precipitação pelo PEG pode acarretar na formação de complexos de IgY, com posterior ligação do anticorpo secundário fluorescente aos complexos, acarretando em fluorescências inespecíficas, como o que ocorreu no estudo de Vasconcelos (2010), que observou reações inespecíficas utilizando IgY anti-HAV em cortes de fígado de primatas. Esta informação não corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde a presença de reações inespecíficas foram ínfimas e similares as que ocorreram quando utilizou-se o *kit* de IFI para o diagnóstico do FeLV.

A IFI ainda é o teste mais barato em muitos países, incluindo o Brasil, podendo ser uma alternativa para os proprietários de felinos terem o acesso ao diagnóstico do FeLV (ALMEIDA et al., 2012). Gatos diagnosticados pelo IFI são considerados persistentemente infectados porque este teste detecta antígeno viral associado aos leucócitos e plaquetas em uma viremia secundária, quando as células progenitoras da medula óssea estão infectadas. Desta forma, este método foi eleito para a análise da reatividade da IgG e IgY para a p27 nativa do FeLV.

Futuros experimentos, como a padronização de uma prova de ELISA utilizando a IgY para r-p27, ainda serão feitos com o intuito de incorporação de opções de imunodiagnóstico da leucemia viral felina.

Assim como a incorporação da tecnologia de IgY vem trazendo vários benefícios em diversos ramos de pesquisas biológicas, apresentando resultados mais satisfatórios se comparados aos mamíferos, as técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas de procariotos e eucariotos representam alternativas para a produção de antígenos isolados e, ainda, podem contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios.

## 6 CONCLUSÕES

A p27 do FeLV foi clonada e expressa com sucesso e a inoculação da r-p27 foi capaz de estimular as aves e coelhos inoculados.

A avaliação pelo teste qui-quadrado da especificidade, pela IFI, da IgG de coelho e a IgY produzidas para a p27 recombinante e nativa, comprovou sua aplicabilidade no imunodiagnóstico da Leucemia Viral Felina.

A produção de IgY para a r-p27 é um método de alto rendimento, baixo custo e de grande aceitação pelo caráter bioético, sendo promissor para o desenvolvimento de imunodiagnóstico, vacinas e possíveis finalidades terapêuticas da Leucemia Viral Felina.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 629-634, 1992.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunology Methods**, v. 160, n. 2, p. 207-214, 1993.

ALMEIDA, M.O. **Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua aplicação na imunização de animais**. 2010, 97p. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ALMEIDA, N.R.; DANELLI, M.G.M.; SILVA, L.H.P.; HAGIWARA, M.K., MAZUR, C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 8, p. 583-586, 2012.

ALMEIDA, N.R; ALVES, R.S.; CASTRO, A.M.T.; VALENTIM, L.F.; PISTELLI, A.L. Ocorrência de linfomas em gatos com Leucemia Viral Felina atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA) da UFRRJ. *In: Anais da 9ª Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, 2009.

ALVES, FABIANA. **Padronização de um ELISA indireto para o diagnóstico da imunodeficiência felina a vírus**. 2010, 32p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ANAI, Y.; OCHI, H.; WATANABE, S., NAKAGAWA, S.; KAWAMURA, M.; GOJOBORI, T.; NISHIGAKI, K. Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses. **Journal of Virology**, v. 86, n.16, p. 8634-8644, 2012.

ARAÚJO, A.S. **Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007, 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ARAÚJO, M.R.T. **Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero *Flavivirus*: Aplicação no desenvolvimento de kits de diagnóstico e em estratégias antivirais**. 2009, 172p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I; BARQUERO, N.; MARTIN, D. Seroepidemiological Survey of Infection by Feline Leukemia Virus and immunodeficiency Virus in Madrid and Correlation with Some Clinical Aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3448-3449, 2000.

AUDIBERT, F. M.; LISE, L. D. Adjuvants: Current Status, Clinical Perspectives and Future Prospects. **Immunology Today**, v. 14, p. 281-284, 1993.

AUDIBERT, F. Adjuvants for vaccines, a quest. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1187-1193, 2003.

AUGUST, J.R. Moléstias virais felinas. *In*: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3.ed.São Paulo: Manole, 1992. cap.48. p. 340-346.

BALAMURUGAN, V.; VENKATESAN, G.; SEN, A.; ANNAMALAI, L.; BHANUPRAKASH, V.; SINGH, R.K. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 731-753, 2010.

BANDE, F.; ARSHAD, S.S.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; SAPIAN, N.A.; RAHMAN, N.A.; AL-AZAWY, A. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 33, 2012.

BANDECCHI, P.; DELL'OMODARME, M.; MAGI, M.; PALAMIDESSI, A.; PATRI, M.C. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. **The Veterinary Record**, v. 158, p. 555-557, 2006.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, 2004.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.

BARBOSA, F.C.; CHRISTIANINE, M.O.T.; WALDEMARIN, K.C.A. Prevalência de leucemia felina em gatos domésticos de Uberlândia – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, 2007.

BARR, F. Feline Leukemia virus. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, n. 1, p. 41-43, 1998.

BARTELING, S. J.; VREESWIJK, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. **Vaccine**, v. 9, p. 75-88, 1991.

BAYLOR, N. W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminium salts in vaccines- US perspective. **Vaccine**, v. 20, n.18, 2002.

BERGMAN, P.; HENDRICK, M.J.,MACY, D.; MCGILL, L.; STARR, R.M.; VAN KAMPEN, K.R.Feline Sarcoma and Vaccination: Roundtable on the Injection-Site problem in cats. **Veterinary Forum**, v. 16, n. 3, p. 40-47, 1999.

BERNARDO, A.R. **Tecnologia IgY: produção de anticorpos aviários para Leishmania (Leishmania) amazonensis com o uso ético dos animais de experimentação**. 2009, 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

BIZANOV, G; JONAUSKIENA, I; HAU, F. A novel method based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk Immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendi virus. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 31, p. 121-130, 2004.

BIZANOV, G.; NORMANTIENE, T.; JONAUSKIEN, I. Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. **Biologija**, v. 2, n. 1, p. 68-71, 2006.

BLANCO, K.; PRENDAS, J.; CORTES, R.; JIMENEZ, C.; DOLZ, G. Seroprevalence of Viral Infections in Domestic Cats in Costa Rica. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 71, n. 5, p. 661-663, 2009.

BOLIN, L.L.; LEVY, L.S. Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. **Viruses**, v. 3, p. 1681-1698, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPBELL, R.D.; DODDS, A.W.; PORT, R.R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. **The Biochemical Journal**, v. 189, n. 1, p. 67-68, 1980.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P.E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunology Research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000.

CARROL, S.B.; THALLEY, B.S.; THEAKSTON, R.D.G. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. **Toxicon**, v. 30, n. 9; p. 1017-1025, 1992.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R.; CALAZADO, E.G.; SCHADE, R. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 85, n. 2, p. 179-189, 2004.

CHALGHOUMI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, v. 87, n. 1, p. 32-40, 2008.

CHALGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnology Agronomy Society and Environment**, v. 13, n. 2, p.295-308, 2009.

CHANG, H.M.; LU, T.C.; CHEN, C.C.; TU, Y.Y.; HWANG, J.Y. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 995-999, 2000.

CHENG, H.H.; ANDERSON, M.M.; OVERBAUGH, J. Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. **Virology**, v. 359, p. 170-178, 2007.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625-635, 2004.

CHOU, C. P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 521-532, 2007.

COBAN, C., ISHII, K. J., GURSEL, M., KLINMAN, D. M., KUMAR, N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 5, p. 647-655, 2005.

COELHO, F.M.; MAIA, M.Q.; LUPPI, M.M.; COSTA, E.A.; LUIZ, A.P.M.F., RIBEIRO, N.A.; BONFIM, M.R.Q.; FONSECA, M.M.; RESENDE, M. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 778-783, 2011.

COFFIN, J.M. Retroviridae: the viruses and their replication. *In*: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; NELMICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROZMAN, B.; STRAUS, S.E. (3ed). **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 1767-1847.

COOPER, C.L.; DAVIS, H.L.; MORRIS, M.L.; EFLER, S.M.; ADHAMI, M.A.; KRIEG, A.M.; CAMERON, D.W.; HEATHCOTE, J. CpG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist 69 oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. **Journal of Clinical Immunology**. v. 24, n. 6, p. 693-701, 2004.

CORNELIS, P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 450-454, 2000.

CRAWFORD, CYNDA. Progressos no diagnóstico de infecções retrovirais. *In*: AUGUST, J.R. Medicina Interna de Felinos. 6ed., Philadelphia, WB Saunders Company, 2011. cap. 6. p. 53-62.

DAI, Y. C.; ZHANG, X.F.; TAN, M.; HUANG, P.; LEI, W.; FANG, H.; ZHONG, W.; JIANG, X. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. **Antiviral Research**, v. 97, p. 293-300, 2012.

DINGERMANN, T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. **Biotechnology Journal**, v.3, n. 1, p. 90-97, 2008.

DONAHUE, P.R.; QUACKENBUSH, S.L.; GALLO, M.V.; DENORONHA, C.M.C.; OVERBAUGH, J.; HOOVER, E.A.; MULLINS, J. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. **Journal of Virology**, v.65, p.4461-4469, 1991.

DONAHUE, P.R.; HOOVER, E.A.; BELTZ, G.A.; RIEDEL, N.; HIRSCH, V.M.; OVERBAUGH, J.; MULLINS, J.I. Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. **Journal of Virology**, v. 62, n. 3, p. 722-731, 1988.

DUNHAM, S.P.; GRAHAM, E. Retroviral Infections of Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animals Practice**, v. 38, p. 879-901, 2008.

EASTCOTT, J.W.; HOLMBERG, C.J.; DEWHIRST, F.E.; ESCH, T.R.; SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to

mucosally or systemically administered tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 19, n. 13-14, p.1636-1642, 2011.

EDELMAN R. Vaccine adjuvants. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 370-83, 1980.

EL-MALK, M.; SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; YABU, Y.; NOURELDIN, M.S.; SAUDY, N.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Protective Effect of Vaccination with *Toxoplasma* Lysate Antigen and CpG as an Adjuvant Against *Toxoplasma gondii* in Susceptible C57BL/6 Mice. **Microbiology and Immunology**, v. 49, p. 639-646, 2005.

FIGUEIREDO, A.S.; ARAÚJO Jr, J. P. Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1952-1959, 2011.

FLYNN, J.N., DUNHAM, S.P., WATSON, V., JARRETT, O.. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **Journal of Virology**, v. 76, p. 2306- 2315, 2002.

FRYER, J.; FIRCA, J.; LEVENTHAL, J.; BLONDIN, B.; MALCOLM, A.; IVANCIC, D.; GANDHI, R.; SHAH, A.; PAO, W.; ABECASSIS, M.; KAUFMAN, D.; STUART, F.; ANDERSON, B. IgY anti-porcine endothelial cell antibodies effectively block human anti-porcine xenoantibody binding. **Xenotransplantation**, v. 6, n. 2, p. 98–109, 1999.

FU, C.H.; HUANG, H.; WANG, X.M.; LIU, Y.G.; WANG, Z.G.; CUI, S.J.; GAO, H.L.; LI, Z.; LI, J.P.; KONG, X.G. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. **Journal of Virology Methods**. v. 133, n. 1, p. 112-115, 2006.

FUJIBAYASHI, T.; NAKAMURA, M.; TOMINAGA, A.; SATOH, N.; KAWARAI, T.; NARISAWA, N. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida spp.* Adherence and biofilm formation. **Japanese Journal of Infections Diseases**, v. 62, p. 337-342, 2009.

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

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p.538–545, 2005.

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

GLEICH, S.E.; KRIEGER, S.; HARTMANN K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 985–992, 2009.

GÓMEZ, N.; SCARAMAL, J.; MIRA, G. Prevalencia de VIF y VILeF en 300 felinos en Argentina. **Veterinaria Argentina**, v. 16, n. 160, p. 786-793, 1999.

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 71, p. 273–278, 1985.

GREUNKE, K.; BRAREN, I.; ALPERS, I.; BLANK, S.; SODENKAMP, J.; BREDEHORST, R.; SPILLNER, E. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 14-15, p. 1237-1244, 2008.

GROSENBAUGH, D.A.; LEARD, T.; PARDO, M.C., MOTES-KREIMEYER, L., ROYSTON, M. Comparison of the safety and efficacy of a recombinant feline leukemia virus (FeLV) vaccine delivered transdermally and an inactivated FeLV vaccine delivered subcutaneously. **Veterinary Therapeutics**, v. 5, n. 4, p. 258–262, 2004.

GUIMARÃES, M.C.C.; AMARAL, L.G.; BORGES, F.V.; VIEIRA, H.P.L.; SHIMOYA, A.; MATTA, C.G.F.; MATTA, M.F.R. Production and use of egg-yolk antibody for detection of canine parvovirus in feces. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 7, n. 3, p. 241-248, 2008.

GUPTA, R.; K, SIBER, G.R. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

HAGIWARA, M.K.; RECHE Jr., A; LUCAS, S.R.R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n .1, p. 35-38, 1997.

HARDY, W.D. jr Oncogenic Virus of Cat: the leukemia and sarcoma virus. *In*: HOLZWORTH, J. **Disease of the Cat : medicine and surgery**. Philadelphia. WB Saunders Company, 1987. p. 246-268.

HARDY, W.D. jr.; HIRSHAUT, Y.; HESS, P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. **Bibliotheca Haematologica**, v. 39, p. 778-799, 1973.

HARDY, W.D. jr.; HESS, P.W.; MACEWEN, E.G.; MCCLELLAND, A.J.; ZUCKERMAN, E.E.; ESSEX, M.; COTTER, S. M; JARRETT, O. Biology of Feline Leukemia Virus in the Natural Environment. **Cancer Research**, n. 36, p. 582-588, 1976a.

HARDY, W.D. jr.; McCLELLAND, A. J.; ZUCKERMAN, E. E.; HESS, P. W.; ESSEX, M.; COTTER, S. M.; C. ; HAYES, A. A. Prevention of the contagious spread of feline leukaemia virus and the development of leukaemia in pet cats. **Nature**, v. 263, p. 326-328, 1976b.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. *In*: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3ed., Philadelphia, WB Saunders Company, 2006. cap.13. p. 105-130.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C.E.; VIDYASHANKAR, A. N.; JARRETT, O. ; EGBERINK, H. F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 439-445, 2007.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 450-454, 1993.

HELPER-HUNGERBUEHLER, K.; CATTORI, V.; BORETTI, F.S.; OSSENT, P.; GREY, P.; REINACHER, M.; HENRICH, M.; BAUER, E., BAUER-PHAM, K.; NIEDERER, E.; HOLZNAGEL, E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Dominance of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma, **Retrovirology**, v. 7, n. 14, p. 1-14, 2010.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p.740–745, 2000.

HERRING, E.S.; TROY, G.C.; TOTH, T.E.; FORRESTER, S.D.; WEIGT, L.A.; HERRING, I.P. Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, n. 3, p. 133-141, 2001.

HILLEMANN, M. R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccine. **Progress in Medical Virology**, v. 8, p. 131-182, 1966.

HIRAI, K.; ARIMITSU, H.; UMEDA, K.; YOKOTA, K.; SHEN, L.; AYADA, K. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. **Acta Medica Okayama**. v. 64, p. 163-170, 2010.

HOFMANN-LEHMANN, R.; VALENTINO CATTORI, V.; RAVI TANDON, R.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; RIOND, B.; LUTZ, H. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 119–123, 2008.

HOOVER, E.A.; MULLINS, J. I. Feline leukemia virus infection and diseases. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, p.1287-1297, 1991.

HORIKOSHI, T.; HIRAOKA, J.; SAITO, M.; HAMADA, S. IgY antibody from hen egg yolks: purification by ethanol fractionation. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 739-742, 1993.

HUOPALAHTI, R. et al. 2007. In: Bioactive Egg Compounds. Dieter Czeschlik (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 297 p.

ISMAIL, A. A. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 25-26, 2005.

JANA, S.; DEB, J. K.; Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289-98, 2005.

JARRETT, O.; LAIRD, H.M.; HAY, D. Determinants of the host range of feline leukemia viruses. **Journal of General Virology**, v. 20, n. 2, p. 169-175, 1973.

JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 99-107, 1999.

JIN, W.; YAMADA, K.; IKAMI, M.; KAJI, N.; TOKESHI, M.; ATSUMI, Y.; MIZUTANI, M.; MURAI, A.; OKAMOTO, A.; NAMIKAWA, T.; BABA, Y.; OHTA, M. Application of

IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products. **Journal of Microbiological Methods**, 2013. No prelo.

JONASSON, P.; LILJEQVIST, S.; NYGREN, P. A.; STAHL, S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 35, n. 2, p.91–105, 2002.

JUNQUEIRA-JORGE, J.; FERREIRA, F.; HAGIWARA, M.K. Risk factors for feline leukemia virus (FeLV) infection in cats in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 392-398, 2011.

KADIOGLU, A.; COWARD, W.; COLSTON, M.J.; HEWITT, C.R.A.; ANDREW, P.W.; CD4-T-Lymphocyte Interactions with Pneumolysin and Pneumococci Suggest a Crucial Protective Role in the Host Response to Pneumococcal Infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2689-97, 2004.

KANO, F.S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 709-726, 2007.

KAPOOR, P.; COMPTON, M.M.; HOWARTH, B. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. **Poultry Science**, v. 79, n. 2, p. 245-256, 2000.

KLEMPERER F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie v.31, p. 356-382, 1883 apud Narat M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology Biotechnology** v. 41, n.3, p. 259-267, 2003.

KLINMAN, D.M.; AE-KYUNG, Y.; BEAUCAGE, S.L.; CONOVER, J.; KRIEG, A.M. CpG Motifs Present in Bacterial DNA Rapidly Induce lymphocytes to Secrete Interleukin 6, Interleukin 12, and Interferon Gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 2879-2883, 1996.

KLINMAN, D.M.; BARNHART, K.M.; CONOVER, J. CpG motifs as immune adjuvants. **Vaccine**. v.17, p.19-25, 1999.

KNOTEK, Z.; HADJOKOVA, P.; SVOBODA, M.; TOMAN, M.; RASKA, V. Epidemiology of feline leukaemia and feline immunodeficiency virus in Czech Republic. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 26, n. 10, p. 665-671, 1999.

KOLLBERG, H.; CARLANDER D.; OLESEN H.; WEJAKER, P.E.; JOHANNESSEN, M.; LARSSON, A. Oral administration of specific yoIk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. **Pediatric Pulmonology**, v. 35, p. 433-440, 2003.

KRIEG, A.M.; AE-KYUNG, Y.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T.J.; BISHOP, G.A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G.A.; KLINMAN, D.M. CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger Direct B-cell Activation. **Nature**, v. 374, p. 546-549, 1995.

KURLAND, C.; GALLANT, J.; Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 489-93, 1996.

LAPPIN, M.R. Feline Leukemia Virus. *In: Seminário Internacional de Doenças Infeciosas*, 1998, São Paulo. Anais...p. 36-44.

LARENTIS, A. L.; ARGONDIZZO, A.P.C.; ESTEVES, G.S.; JESSOURON, E.; GALLER, R.; MEDEIROS, M.A. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. **Protein Expression and Purification**, v. 78, n. 1, p. 38-47, 2011.

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 411-414, 1991.

LEE, E.N.; SUNWOO, H.H.; MENNINEN, K.; SIM, J.S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 81, p. 632-641, 2002.

LEE, S. Y.; CHOI, J. H.; XU, Z. Microbial cell-surface display. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 45-52, 2003.

LEVÉSQUE, S.; MARTINEZ, G.; FAIRBROTHER, J.M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poultry Science**, v.86, p. 630-635, 2007.

LEVY, J.; CRAWFORD, P. C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E. American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline and Surgery**, v. 10, n .3, p.300-316, 2008.

LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; LACHTARA, J. L.; CRAWFORD, P. C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n .3, p. 371-376, 2006.

LIN, J.A.; CHENG, M.C.; INOSHIMA, Y; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; TOHYA, Y.; TOH, K.; LU, Y.S.; MIKAMI, T. Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in cats in Taiwan in 1993 and 1994. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 161-163, 1995.

LINDAHL, T.L.; FESTIN, R.; LARSSON, A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for detection of platelet activation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 68, p. 221-225, 1992.

LINDBLAD, E. Aluminium adjuvants. *In: Stewart- Tull, D. Editor. The theory and practical application of adjuvants*. New York: Wiley, p. 21- 35, 1995.

LINENBERGER, M.L.; ABKOWITZ, J.L. Haematological disorders associated with feline retrovirus infections. **Baillière's clinical haematology**, v. 8, n. 1, p. 73-112, 1995.

LIU, J.F.; CHANG, C.W.; TAILIU, J.J.; YU, C.K.; LEI, H.Y.; CHEN, L.R. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. **Vaccine**, v. 28, p. 8189-8196, 2010.

LITTLE, S.; SEARS, W.; LACHTARA, J.; BIENZLE, D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 644-648, 2009.

LOAR, A.S. The controversy continues. *In: THE FIFTH ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM*, 15, 1987. **Proceedings...**American College of Veterinary Internal Medicine. 1987. p. 338-342.

LOAR, A.S. Feline Leukemia virus: Immunization and Prevention. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.23, n.1, p. 193-211, 1993.

LOSSO, J. N.; KUMMER, A.; LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Development of a particle concentration fluorescence immunoassay for the quantitative determination of IgG in bovine milk. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 41, p. 682-686, 1993.

LUCAS, S.R.R.; HAGIWARA, M.K.; RECHE JR., A.; GERMANO, P.M.L. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 41-45, 1998.

LUCHESE, M.D.; ARGONDIZZO, A.P.C.; JESSOURON, E.; PEREIRA, D.S.G.; ANDRADEGOES, A.C.M.; ARDENGHI, P.G.; MEDEIROS, M.A.; LARENTIS, A.L. Influência de Diferentes Condições na Expressão da Proteína Recombinante Pneumolisina (rPly). *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Sinaferm, 2009.

LUTZ, H; ADDIE, D; BELAK, S. et al. Feline leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, p. 565-74, 2009.

MACIEIRA, D.B.; MENEZES, R.C..A.A.; DAMICO, C.B; ALMOSNY, N.R.P., MCLANE, H.L.; DAGGY, J.K.; MESSICK, J.B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro - Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 120-129, 2008.

MACY, D.W.; HENDRICK, M.J. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26 , n. 1 , p. 103-109, 1996.

MCLAREN, R.D.; PROSSER, C.G.; GRIEVE, R.C.J. The use of caprylic acid for extraction of immunoflobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Immunological Methods**, v. 177, n. 1, p. 175-184, 1994.

MADEWELL, B.R.; JARRET, O. Recovery of feline leukaemia virus from nonviraemic cats. **Veterinary Record**, v. 112, n. 1, p. 90-93, 1983.

MAHMOOD, M.S.; SIDDIQUE, M.; HUSSAIN, I.; KHAN, A.; MANSOOR, M.K. Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very

virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4838-4846, 2006.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 521-538, 1996.

MARCIANI, D.J.; KENSIL, C.R.; BELTZ, G.A.; HUNG, C.H.; CRONIER, J.; AUBERT, A. Genetically-engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. **Vaccine**, v. 9, 1991.

MAZUR, C.; REIS, J.K.P.; LEITE, R.C.; DANELLI, M.G.M.; HAGIWARA, M.K.; GÓES, A.C.M.A.; MEDEIROS, M.A. Evaluation of a recombinant p24 antigen for the detection of Feline Immunodeficiency Virus-specific antibodies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30; n. 10, p. 877-880, 2010.

MEHL, M.L. Feline Leukemia virus. *In*: LAPPIN, M.R. **Feline International Medicine Secrets**, Philadelphia: Hanley & Belfus. 2001. cap.76. p. 387-391.

MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; FARIA, R.O.; CLEFF, M.B.; GOMES, F.R.; NOBRE, M. S.O; REISCHAK, D.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Frequência do vírus da leucemia felina (vlfe) em felinos domésticos (*felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 90-93, 2010.

MENDOZA, R.; ANDERSON, M.M.; OVERBAUGH, J. A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. **Journal of Virology**, v. 80, p. 3378-3385, 2006.

MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. **Food and Agricultural Immunology**, v. 13, n. 1, p. 275- 288, 2001.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of Medical Food**, v. 5, n. 3, p. 159-169, 2002.

MIYAZAWA, T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. **Front Biosci**, v. 7, p. 504-518, 2002.

MOORE, A.S; OGILVIE, G.K. Lymphoma in Feline Oncology: A Comprehensive Guide to Compassionate Care. **Veterinary Learning Systems**, p. 191-219, 2001.

MOORE, G. E.; WARD, M. P.; DHARIWAL, J. Use of a primary care veterinary medical database for surveillance of syndromes and diseases in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 386, 2004.

MOREIRA, A.S.A.S. **Produção antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MORRISON, S.L.; MOHAMMED, M.S.; WIMS, L.A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 8, p.619-625, 2001.

MOTOI, Y.; INOUE, S.; HATTA, H.; SATO, K.; MORIMOTO, K.; YAMADA, A.; Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies vírus proteins produced in *Escherichia coli*. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 115-118, 2005.

NARAT M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n.3, p. 259-267, 2003.

NORSWORTHY, G.D. Feline leukemia virus diseases. *In*: NORSWORTHY, G.D. Feline Practice. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 1993. p. 360-368.

OLIVEIRA, A.P. **Expressão da proteína s1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação no imunodiagnóstico**. 2008, 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 145-152, 1993.

OVERBAUGH, J. Molecular cloning of feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. **Science**, v. 239, n. 19, p. 906-910, 1988.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C.R.M. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**, v. 292, p. 1106-1109, 2001.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O. Duration of the latent state in feline leukaemia virus infections. **Veterinary Record**, v. 117, p. 472-474, 1985.

PACITTI, A.M.; JARRETT, O.; HAY, D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. **Veterinary Record**, v. 118, p. 381-384, 1986.

PARMA, Y.R.; CHACANA, P.A.; ROGÉ, A.; KAHL, A.; CANGELOSI, A.; GEOGHEGAN, P.; LUCCHESI, P.M.A.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 58 p. 380–388, 2011.

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, v.88, n.2, p. 281-290, 2009.

PEDERSEN, N. C.; MERIC, S.M.; JOHNSON, L.; PLUCKER,S.; THEILEN, G.H. The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. **Feline Practice**, v. 14, p. 32-48, 1984.

- PLOTKIN, S.A., ORENSTEIN, W.A. *Vaccines*. 4th ed. Saunders. Philadelphia, 2004. p.69-79.
- POLSON, A.; VON WECHMAR, M.B.; VAN REGENMORTELO, M.H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, v. 9, n. 5, p. 475-93, 1980.
- POULET, H.; BRUNET, S.; BOULARAND, C.; GUIOT, A.L.; LEROY, V.; TARTAGLIA, J.; MINKE, J.; AUDONNET, J.C.; DESMETTRE, R. Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. **Veterinary Record**, v. 153, p. 141-145, 2003.
- QUIGLEY, J.G., BURNS, C.C., ANDERSON, M.M., LYNCH, E.D., SABO, K.M., OVERBAUGH, J., ABKOWITZ, J.L. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 1093–1099, 2000.
- RANGEL, M.F.N.; LEMOS, L.S.; ALMEIDA, C.M.C.; SALES, L.G.; VIEIRA-DAMOTTA, O. Development of IgY antibodies in chickens and IgG in rabbits immunized against proteins of *Pythium insidiosum* isolated from horses in the state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 87-93, 2010.
- RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C.; ZANETTI, C.R.; LIMA, H.C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 27, n. 3, 2004.
- RICHARDS, J.R.; ELSTON, T.H.; FORD, R.B. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n.9, p.1405–1441, 2006.
- ROJKO, J.L.; HARDY Jr., W.D. Feline Leukaemia virus and other retroviruses. *In*: SHERDING, R.G. **The Cat: diseases and clinical management**. New York. Churchill Livingstone, 1994, 2.ed, v. 1, p. 263-432.
- ROJKO, J. L.; KOCIBA, G.J. Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 25, n. 4, p. 6-11, 1991.
- ROSE, M.E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. Immunoglobulin classes on the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal Immunology**. v. 4, p. 521–523, 1974.
- ROSOL, T.J.; STEINMEYER, C.L.; MCCAULEY, L.K.; MERRYMAN, J.I.; WERKMEISTER, J.R.; GRONE, A.; WECKMANN, M.T.; SWAYNE, D.E.; CAPEN, C.C. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (I-36). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 321-337, 1993.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 74, n.12, p. 5463-5467, 1977.

SCHADE, R. IgY-antibodies, future prospects. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M. HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology**. Berlím: Springer, 2001. p. 218-222.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R., CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.T. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A review of Progress in production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. **Alternatives of Laboratory Animals**, v. 33, p. 1-26, 2005.

SCHMIDT, P., ERHARD, M.H.; SCHAMS, D.; HAFNER, A.; FOLGER, S.; LOSCH, U. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labelling of growth-hormone and prolactin in bovine pituitary gland. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry**, v. 41, p. 1441-1446, 1993.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; OKAMOTO, T.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; SANTOS, I.B.; REIS, R.S.; PAES, R.A.; PEREZ, M.C.A.; MARZOCH, M.C.A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; WANKE, B. Utilidade do coágulo sangüíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 404-408 , 2004

SHAHBAZI, P.; SHAYAN, P.; EBRAHIMZADEH, E.; RAHBARI, S. Specific Egg Yolk Antibody against Recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 Protein. **Iranian Journal of Parasitology**. v.4, n.3, p. 15-24, 2009

SHELTON, G.H.; WALTIER, R.M.; CONNOR, S.C.; GRANT, C.K. Prevalence of immunodeficiency vírus and leukemia virus infection in pet cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 25, p. 7-12, 1989.

SHIMIZU, M.; NAKAI, S.; FITZSIMMONS, R.C. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1360-1366, 1998.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 270-274, 1992.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comparative Biochemistry and hysiology – Part: B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 106, n. 2, p. 255-261, 1993.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, p. 763-772, 1994.

SHIN, J.H.; YANG, M.; NAM, S.W.; KIM, J.T.; MYUNG, N.H.; BANG, W.G.; ROE, I.H. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, n. 5, p. 1061-1066, 2002.

SILVA, F. R. C. **Prevalência das infecções pelo vírus da leucemia viral felina e da imunodeficiência viral felina na cidade de Porto Alegre.** 2007, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SILVA, J.M. Código genético. *In:* Bioquímica da Informação Genética, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/1120>

SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D.V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010.

SINGH, M.; BRIONES, M.; OTT, G.; O'HAGAN, D. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 811-816, 2000.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p.715-728, 2002.

SMITH, C.A. Are we vaccinating too much? **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 4, p. 421-425, 1995.

SMITH, D.J.; KING, W.F.; GODISKA, R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p.135-142, 2001.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v.115, p.113-128, 2005(a).

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005(b).

SOTIROPOULOU, G.; PAMPALAKIS, G.; PROSNIKLI, E.; EVANGELATOS, G.P.; LIVANIOU, E. Development and immunochemical evaluation of a novel chicken IgY antibody specific for KLK6. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 148, 2012.

SOUZA, L.L.; NOBRE, M.O.; SILVEIRA, E; DILMARA REICHAK, D.; NASCENTE, P. Esporotricose em gatos portadores do vírus da leucemia felina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.12, n.1/3, p.99-101, 2005.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, n. 36, p. 14-21, 2002.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R. *In:* SOUZA, H.J.M. Leucemia viral felina *In:* **Coletâneas em medicina e cirurgia felina**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, cap.22, p. 251-271, 2003.

SPARKES, A.H. Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 5, p. 187-194, 1997.

SPARKES, A.H. Feline leukaemia virus and vaccination. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, p. 97-100, 2003.

STAAK, C. Egg Yolk Antibodies (IgY) in Routine Diagnostic Work. **Altex.**, v. 13, n.5, p.73-75, 1996.

STEWART, H.; JARRETT, O.; HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J. Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? **Veterinary immunology and immunopathology**, v.15, n.143 (3-4), p.325-31, 2011.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy, **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012.

STRACHAN, T.; READ, A.P. Human Molecular Genetics. 2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999. Chapter 9, Instability of the human genome: mutation and DNA repair. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7566/>

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 1946-1950, 2011.

SUNTZ, M.; FAILING, K.; HECHT, W; SCHWARTZ, D.; REINACHER, M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 71–80, 2010.

SVENDSEN, B.L.; COWLEY, A.; OSTERGAARD, L.H. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, v.45, n.1, p.89-93, 1995.

TENNANT, B. Feline injection-site fibrosarcomas: results of a BSAVA survey. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 4, p. 181-182, 2000.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p.211–222, 2006.

TORRES, A.T; MATHIASON, C.K; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, v. 332: p. 272–83, 2005.

TSUKAMOTO M, HIROI S, ADACHI K, KATO H, INAI M, KONISHI I. Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A/H1N1. **Molecular Medicin Report**. v.4, p.209-214, 2010.

VASCONCELOS, G.A.L.B.M. **Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado**. 104p. 2010. Dissertação (mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, 2010.

- VERDOLIVA, A.; BASILE, G.; FASSINA, G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applied**, v. 749, n. 2, p. 233-242, 2000.
- WARR, G.W.; MAGOR, K.E.; HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392-398, 1995.
- WEICKERT, M.J., et.al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* **Current Opinion of Biotechnology**, v.7, p. 494-499, 1996.
- WEISS, A. T. H.; KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, D.A. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v. 12, p. 929-935, 2010.
- WILLETT, B.; HOLSIE, M.J. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. **The Veterinary Journal** , v. 195, n. 1, p. 16-23, 2012.
- WOOLLEY, A.; LANDON, J. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, p. 253-265, 1995.
- WU, F.; YUAN, X.Y.; LI, J.; CHEN, Y.H. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 32, p. 4320-4324, 2009.
- ZHANG, Y.; PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum. **Vaccine**, v. 21, n. 23, p. 3307-3318, 2003.
- ZHEN, Y.H.;JIN, L.J.; LI, X.Y.; GUO, J.; LI, Z.; ZHANG, B.J. FANG, R.; XU, Y.P. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 317-322, 2009.

## 8 ANEXOS

### A. Tampões

#### 1. Tampão TAE 50x (Tris-HCl-Acetato)

Componentes	Quantidade
Tris base	2 M
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA pH 8,0	50 mM
Água Milli-Q (q.s.p.)	10 mL

Utilizado na concentração final de 1X.

#### 2. Tampão de mostra para DNA (1x)

Componentes	Quantidade
Glicerol 50 %	25 mL
Azul de bromofenol (0,125%)	0,0625g
Xileno cianol (0,125%)	0,0625g
TE pH 8,0 (q.s.p.)	50 mL

#### 3. Tampão de amostra para proteína (4x)

Componentes	Quantidade
Tris pH 6,8	0,5 M
SDS	8 %
Glicerol	40%
B-mercaptaetanol	16%

Utilizado na concentração final de 1X.

#### 4. Tampão de corrida para WB (10X)

Componentes	Quantidade
Tris-base	0,25 M
Glicina	1,90 M
SDS	41 mM

Utilizado na concentração final de 1X.

## 5. Solução descorante para SDS-PAGE

Componentes	Quantidade
Metanol	100 mL
Ácido acético glacial	70 mL
H <sub>2</sub> O qsp	830 mL

## 6. Tampão PBS (10x)

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio	1,54 M
Cloreto de potássio	27 mM
Fosfato de sódio	115 mM
Fosfato de potássio dibásico	14 mM
H <sub>2</sub> O qsp	1000 mL

Utilizado na concentração final de 1X.

## 7. Tampão de transferência para WB (10x)

Componentes	Quantidade
Tris-base	0,25 M
Glicina	1,90 M
SDS	41 mM

Utilizado na concentração final de 1X.

## 8. Tampão alcalino para IFI (4x)

Componentes	Quantidade
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11,4g
NaHCO <sub>3</sub>	33,6g
NaCl	8,5g
H <sub>2</sub> O qsp	1000 mL

Utilizado na concentração final de 1X.

- Glicerina tamponada: 9 partes de glicerina, 1 parte de solução para tampão de lavagem concentrado

## B - Meios de Cultivo LB

<i>Meio Luria-Bertani (LB)</i>		
<b>Componentes</b>	<b>LB Líquido</b>	<b>LB Sólido</b>
Extrato de levedura	5 g/ L	5 g/ L
Cloreto de sódio	10 g/ L	10 g/ L
Triptona	10 g/ L	10 g/ L
Ágar bacteriológico	-	17 g/ L

Autoclavado por 15 minutos a 121 °C e estocado em temperatura ambiente.

### C- Gel para SDS-PAGE 12,5%

<b>Componentes</b>	<b>Gel de separação</b>	<b>Gel de empilhamento</b>
Acrilamida 30%	4,2 mL	880 µL
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,66 mL
SDS 10%	100 µL	66 µL
Persulfato de amônio 10%	50 µL	40 µL
TEMED	5 µL	6 µL
Água Milli-Q	3 mL	4 mL

Quantidades descritas para o preparo de dois géis de 1 mm a 12,5%.

**D1. Alinhamento das seqüências nucleotídicas.**

```

Clone 12 FeLV  CCCTTGAGGGAGGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAATC
Clone 13 FeLV  CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAATC
M 18247        CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAAGTC
JF 957363      CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAAGTC
JF 957561      CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAAGTC
AF 052723     CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAAGTC
K 01803       CCCTTGAGGGAGGCCCCAACAAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCCTTCAGACCTGTATAACTGGAAAGTC
AB 673431     CCCTTAAGGGAGGCCCCCAATAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCGGCCCTCGGACCTGTATAAATTGGAAATC
|1           |20           |40           |60
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCCGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACACATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGAC
GCATAACCCCTTCTCCCAAGACCCCGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTAACGCACCAACCAACCTGGGAC
ACATAACCCCTTCTCCCAAGACCCCGTAGCCCTAACCAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACGCATCAGCCAAACCTGGGAC
|80         |100        |120        |140

```

Clone 12 FeLV GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 Clone 13 FeLV GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 M 18247 GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 JF 957363 GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 JF 957561 GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 AF 052723 GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 K 01803 GACTGCCAGCAACTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 AB 673431 GACTGCCAGCAGCTCTTGCCAGGCACTCCTGACAGGCCGGAAGAAAGGCCAAAGGGTCCCTTCTTGAGGCCCGGAAAAGCA  
 |160 |180 |200 |220

GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 GGTGCCAGGACGGACGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 AGTTCCAGGCGAAGACGGCGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 AGTTCCAGGCGAAGACGGCGGCCAAACCCAACTACCCAAATGTCAATTGATGAGACTTTCCCTTGAACCCCGCCCAACTGGGATTT  
 |240 |260 |280 |300

Clone 12 FeLV GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 Clone 13 FeLV GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 M 18247 CGTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTGTTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 JF 957363 GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCTAG  
 JF 957561 GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 AF 052723 GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 K 01803 GCTACGCCGGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGGGCTGCAAG  
 AB 673431 GCTACGCCAGCAGGTAAGGAGCACCTACGCCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGAGGGGCTGCAAG

| 320

| 340

| 360

| 380

ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTTGTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTTGTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAAGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCCTCATTTCTTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTTGTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTTGTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTTGTAGAAAAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTCTAGAGAGATTAAGAGAG  
 ACGCCCCACTAATTGGCCACAGGTAAGCAAGTTGTACAAGGGAAAAGAGGAAAACGCCAGCAGCATTTCTTAGAAAAGATTAAGAGAG

| 400

| 420

| 440

| 460

Clone 12 FeLV GCTTACAGAAATGTATACTCCCTATGACCCCTGAAGACCCAGGGCAGGCTGCTAGTGTTATCCTGTCCCTTTATCTA  
 Clone 13 FeLV GCTTACAGAAATGTATACTCCCTATGACCCCTGAAGACCCAGGGCAGGCTGCTAGTGTTATCCTGTCCCTTTATCTA  
 M 18247 GCTTACAGAAATGTATACTCCCTATGACCCCTGAAGACCCAGGGCAGGCTGCTAGTGTTATCCTGTCCCTTTATCTA  
 JF 957363 GCTTACAGAAATGTACACTCCCTATGACCCCTGAGGACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTCATATA  
 JF 957561 GCTTACAGAAATGTACACTCCCTACGACCCCTGAGGACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTCATATA  
 AF 052723 GCTTACAGAAATGTACACTCCCTATGACCCCTGAGGACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTTATATA  
 K 01803 GCTTACAGAAATGTACACTCCCTATGACCCCTGAGGATCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTTATCTA  
 AB 673431 GCTTACAGGATGTATACTCCCTATGACCCCTGAAGACCCAGGGCAGGCTGCTAGTGTTATCCTGTCCCTTTATCTA

| 540

| 520

| 500

| 480

CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA  
 CCAGTCTAGCCCGGACATAAAGAAATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCCTACAAGGGTTCAACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCA

| 620

| 600

| 580

| 560

Clone 12 FeLV GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGAGA  
 Clone 13 FeLV GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGAGA  
 M 18247 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 JF 957363 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 JF 957561 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 AF 052723 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 K 01803 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACCCCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 AB 673431 GAAAAGATATACAACA AAAAGGGAGACTCCAGAGGAAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCCAAGAAAGAGAGA  
 | 640 | 660 | 680 | 700

TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCATAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 TAAAAGCGCCATAAGGAGATGACTAAAAGTTCTG  
 | 720 | 740

**D2. Sequência dos Aminoácidos**clone 12 FLV  
(Unsequenced Strand)

```
1      CCCTTGAGGG AGGGCCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC
      P L R E   G P N   N R P   Q Y W P
41     CATTCTCAGC TTCAGACCTG TATAACTGGA AATCGCATAA
      F S A   S D L   Y N W K   S H N
81     CCCCCCTTTC TCCCAAGACC CAGTGGCCCT AACTAACCTA
      P P F   S Q D P   V A L   T N L
121    ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAACCA ACCTGGGACG
      I E S I   L V T   H Q P   T W D D
161    ACTGCCAGCA GCTCTTGACG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA
      C Q Q   L L Q   A L L T   G E E
201    AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCCA
      R Q R   V L L E   A R K   Q V P
241    GGCGAGGACG GACGGCCAAC CCAACTACCC AATGTCATTG
      G E D G   R P T   Q L P   N V I D
281    ATGAGACTTT CCCCTTGACC CGCCCCAACT GGGATTTTGC
      E T F   P L T   R P N W   D F A
321    TACGCCGCA  GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG
      T P A   G R E H   L R L   Y R Q
361    TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA
      L L L A   G L R   G A A   R R P T
401    CTAATTTGGC ACAGGTAAAG CAGGTTGTAC AAGGGAAAGA
      N L A   Q V K   Q V V Q   G K E
441    GGAAACGCCA GCAGCATTTT TAGAAAGATT AAAAGAGGCT
      E T P   A A F L   E R L   K E A
481    TACAGAATGT ATACTCCCTA TGACCCTGAA GACCCAGGGC
      Y R M Y   T P Y   D P E   D P G Q
521    AGGCTGCTAG TGTTATCCTG TCCTTTATCT ACCAGTCTAG
      A A S   V I L   S F I Y   Q S S
561    CCCGGACATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGCCTA
      P D I   R N K L   Q R L   E G L
601    CAAGGGTTCA CACTGTCTGA TTTGCTAAAA GAGGCAGAAA
      Q G F T   L S D   L L K   E A E K
641    AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA
      I Y N   K R E   T P E E   R E E
681    AAGATTATGG CAGCGGCAAG AAGAGAGAGA TAAAAAGCGC
      R L W   Q R Q E   E R D   K K R
721    CACAAGGAGA TGAATAAAGT TCTG
      H K E M   T K V L
```

clone 13 FLV  
(Unsequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AGGCCCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E A P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCAGC TTCAGACCTG TATAACTGGA AATCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCCAAGACC CAGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGACG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GCGGAGGACG GACGGCCAAC CCAACTACCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ATGAGACTTT CCCCTTGACC CGCCCCAACT GGGATTTTGC  
E T F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCGGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATTTGGC ACAGGTAAAG CAGGTTGTAC AAGGGAAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 GGAAACGCCA GCAGCATTTT TAGAAAGATT AAAAGAGGCT  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGAATGT ATACTCCCTA TGACCCTGAA GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AGGCTGCTAG TGTTATCCTG TCCTTTATCT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCGGACATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAAGGGTTCA CACTGTCTGA TTTGCTAAAA GAGGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGGCAGG AAGAGAGAGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CACAAGGAGA TGAATAAAGT TCTG  
H K E M T K V L

A - AF052723.1  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AGGGCCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCAGC CTCAGACCTG TATAACTGGA AGTCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCCAAGACC CAGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGCAG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCOA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GCGGAGGACG GACGGCCAAC CCAACTACCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ATGAGACTTT CCCCTTGACC CGTCCCAACT GGGATTTTGC  
E T F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCGGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATTTGGC ACAGGTAAAG CAGGTTGTAC AAGGGAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 GGAAACGCCA GCAGCATTTT TAGAAAAGAT AAAAGAGGCT  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGAATGT ACACTCCCTA TGACCCTGAG GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AAGCAGCTAG TGTTATACTA TCCTTTATAT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCAGATATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGTCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAAGGGTTCA CCCTATCTGA TCTGCTAAAA GAGGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGCAAG AAGAAAGAGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CACAAGGAGA TGAATAAGT TCTG  
H K E M T K V L

F. K01803.1  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AAGGCCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCGGC CTCAGACCTG TATAATTGGA AGTCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCCAAGACC CGGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTAAC GCACCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA ACTCTTGCAG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGA GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAAGTTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GGCGAAGACG GGCGGCCAAC CCAACTGCCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ACGAGACTTT CCCCTTGACC CGCCCCAACT GGGATTTTGC  
E T F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCGGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CCAATTTGGC ACAGGTAAAG CAGGTTGTGC AAGGGAAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 AGAAACGCCA GCAGCA'TTTC 'TAGAGAGAT'I' GAAAGAGGC'I'  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGAAATGT ACACTCCCTA TGACCCTGAG GATCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AAGCGGCTAG TGTTATCCTA TCCTTTATCT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 TCCAGATATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAAGGGTTCA CCCTATCTGA TCTGCTAAAA GAAGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AAATATATAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGACAGG AAGAAAGGGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CACAAGGAGA TGACTAAAGT TCTG  
H K E M T K V L

J- AB673431.1  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTAAGGG AAGGCCCAA TAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCGGC CTCGGACCTG TATAATTGGA AATCACATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCAAGACC CCGTAGCCCT AACCAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAGCCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGCAA GCTCTCCTGA CAGCAGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T A E E  
201 AAGACAAAGG GTCCTTCTCG AGGCCCGAAA GCAAGTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GGCGAAGACG GTCGGCCAAC CCAACTACCC AATGTTATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ACGAGACTTT CCCCCTGACC CGTCCCAACT GGGATTTTGC  
E T F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCAGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTGTTAG CGGGTCTCCG AGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATCTGGC ACAGGTAAAG CAAGTTGTAC AAGGGAAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 GGAAACGCCA GCAGCATTCT TAGAAAAGATT AAAAGAGGCT  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGGATGT ATACTCCCTA TGACCCTGAA GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AGGCTGCTAG TGTTATCCTG TCCTTTATCT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCAGACATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAGGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAGGGGTTCA CACTGTCTGA CTTATTAATA GAAGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AAATATACAA CAAAAGGGAG ACTCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGACAGG AAGAAAGAGA TAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CATAAGGAGA TGAATAAAGT TCTG  
H K E M T K V L

C - JF957363.2  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AAGGCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCAGC TTCAGACTTG TATAACTGGA AGTCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCCAAGACC CAGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC ACATCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGACG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GCGAGGACG GACGGCCAAC CCAACTACCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ACGAGGCTTT CCCCTTGACC CGTCCCAACT GGGATTTTGC  
E A F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCT AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATTTGGC ACAGGTAAAG CAGGTTGTAC AAGGAAAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 GGAAACGCCA GCAGCATT'T' TAGAAAGAT'T' AAAAGAGGCT  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGAATGT ACACTCCCTA TGACCCTGAG GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AAGCGGCTAG TGTTATCCTA TCCTTCATAT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCAGATATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAAGGGTTCA CCCTATCTGA TCTGCTAAAA GAGGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AGAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGGCAGG AAGAAAGAGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CACAAGGAGA TGACTAAAGT TCTG  
H K E M T K V L

D - JF957361.2|  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AAGGCCCCAA CAACCGACCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCAGC TTCAGACCTG TATAACTGGA AGTCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCCTTTC TCCAAGACC CAGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGACG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GGCGAGGACG GACGGCCAAC CCAACTACCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ACGAGACTTT TCCCTTGACC CGTCCCAACT GGGATTTTGC  
E T F P L T R P N W D F A  
321 TACGCCGGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTATTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATTTGGC ACAGGTAAG CAGGTTGTAC CAGGGAAAGA  
N L A Q V K Q V V P G K E  
441 GGAAACGCCA GCAGCATTTT TAGAAAGATT AAAAGAGGCT  
E T P A A F L E R L K E A  
481 TACAGAATGT AACTCCCTA CGACCCTGAG GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AAGCGGCTAG TGTTATTCTA TCTTTCATAT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCAGATATA AGAAATAAGT TACAAAGACT AGAAGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAAGGGTTCA CCCTATCTGA TCTGCTAAAA GAGGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGGCAGG AAGAAAGAGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CACAAGGAGA TGAATAAAGT TCTG  
H K E M T K V L

B M18247.1  
(Sequenced Strand)

1 CCCTTGAGGG AAGGCCCAA CAACCGGCC CAGTATTGGC  
P L R E G P N N R P Q Y W P  
41 CATTCTCAGC TTCAGACCTG TATAACTGGA AGTCGCATAA  
F S A S D L Y N W K S H N  
81 CCCCCTTTC TCCAAGACC CCGTGGCCCT AACTAACCTA  
P P F S Q D P V A L T N L  
121 ATTGAGTCCA TTTTAGTGAC GCATCAACCA ACCTGGGACG  
I E S I L V T H Q P T W D D  
161 ACTGCCAGCA GCTCTTGACG GCACTCCTGA CAGGCGAAGA  
C Q Q L L Q A L L T G E E  
201 AAGGCAAAGG GTCCTTCTTG AGGCCCGAAA GCAGGTTCCA  
R Q R V L L E A R K Q V P  
241 GCGGAGGACG GACGGCCAAC CCAGCTGCCC AATGTCATTG  
G E D G R P T Q L P N V I D  
281 ACGAAGCTTT CCCCTTGACC CGTCCCAACT GGGATTTTCG  
E A F P L T R P N W D F R  
321 TACGCCGGCA GGTAGGGAGC ACCTACGCCT TTATCGCCAG  
T P A G R E H L R L Y R Q  
361 TTGCTGTTAG CGGGTCTCCG CGGGGCTGCA AGACGCCCCA  
L L L A G L R G A A R R P T  
401 CTAATTTGGC ACAGGTAAAG CAAGTTGTAC AAGGGAAAGA  
N L A Q V K Q V V Q G K E  
441 GGAAACGCCA GCCTCATTCT TAGAAAGATT AAAAGAGGCT  
E T P A S F L E R L K E A  
481 TACAGAATGT ATACTCCCTA TGACCCTGAG GACCCAGGGC  
Y R M Y T P Y D P E D P G Q  
521 AGGCTGCTAG TGTTATCCTG TCCTTTATCT ACCAGTCTAG  
A A S V I L S F I Y Q S S  
561 CCCGACATA AGAAATAAGT TACAAAGGCT AGAAGGCCTA  
P D I R N K L Q R L E G L  
601 CAGGGGTTCA CACTGTCTGA TTTGCTAAAA GAGGCAGAAA  
Q G F T L S D L L K E A E K  
641 AGATATACAA CAAAAGGGAG ACCCCAGAGG AAAGGGAAGA  
I Y N K R E T P E E R E E  
681 AAGATTATGG CAGCGGCAGG AAGAAAGAGA TAAAAAGCGC  
R L W Q R Q E E R D K K R  
721 CATAAGGAGA TGAATAAAGT TCTG  
H K E M T K V L