

KARIN FLORENCIO LINS DE PAIVA FONTES

**EXPRESSÃO DO GENE OTIMIZADO DA PROTEÍNA p26 DO VÍRUS DA
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM *Escherichia coli***

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

KARIN FLORENCIO LINS DE PAIVA FONTES

**EXPRESSÃO DO GENE OTIMIZADO DA PROTEÍNA p26 DO VÍRUS DA
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

RECIFE

2013

Ficha catalográfica

F682c Fontes, Karin Florencio Lins de Paiva
 Expressão do gene otimizado da proteína p26 do vírus
 da anemia infecciosa equina em *Escherichia coli* / Karin
 Florencio Lins de Paiva Fontes. – Recife, 2013.
 74 f. : il.

 Orientador: Roberto Soares de Castro.
 Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
 de Ciência Veterinária, Recife, 2013.
 Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

 1. Sistema de expressão heterólogo 2. Antígeno
 recombinante 3. Proteína nuclear 4. Equideocultura
 I. Castro, Roberto Soares de, orientador II. Título

CDD 636.089

DEDICATÓRIA

A Tia Dida por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial a minha mãe que me deu a base necessária para que eu pudesse me dedicar a estudar;

Ao meu filho Caio por ser a grande alegria e o motivo de minha vida;

Ao meu namorado Gutemberg por ter embarcado comigo nesta aventura sempre com muita gentileza e me fazendo sorrir;

Ao Professor Roberto Soares de Castro, por ser o alicerce de minha vida acadêmica e a pessoa mais dinâmica e empreendedora que conheço;

A minha amiga Ana Lisa por todo apoio, vasto conhecimento e senso de organização;

A minha amiga e colega de trabalho Luciana Coutinho por me mostrar como uma pessoa de garra deve ser;

Ao meu grande amigo Cosme, por sua grande capacidade de ajudar as pessoas, por sua sinceridade, honestidade e alegria;

Ao meu grande amigo Marcelo Nazário por sempre tirar minhas dúvidas com atenção e carinho;

Ao meu amigo André Luiz por me proporcionar ensinamentos inestimáveis;

Ao Professor Antonio Carlos de Freitas por ter contribuído com a oportunidade de me juntar a seu grupo extraordinário;

Aos meus colegas de laboratório da UFPE, meus bons amigos;

Aos meus amigos do Lavian em especial a Serginho e Camilinha.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE), considerada uma das viroses mais importantes em equinos no mundo, é causada por um lentivírus da família *Retroviridae*. É uma infecção crônica, sem tratamento, prevalente principalmente em regiões de clima quente e úmido, favorável à transmissão por insetos hematófagos. Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), a restrição do trânsito e abate de animais infectados são as estratégias para o controle da AIE no Brasil, o que ocasiona perdas na equinocultura. O diagnóstico oficial da doença é realizado pela detecção de anticorpos circulantes através da imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e de ELISA. A proteína p26 do vírus da AIE é altamente conservada e utilizada na maioria dos testes de diagnóstico, uma vez que induz uma forte resposta humoral. O objetivo com este trabalho foi a produção de uma proteína p26 recombinante em *Escherichia coli* para uso em testes diagnóstico sorológico. A sequência do gene p26 foi otimizada com relação aos códons preferenciais e ao conteúdo GC para uso em *E. coli*, a fim de maximizar a produção de proteínas, e foi adicionado à sequência um marcador de seis resíduos de histidina (6xHis-tag) para posterior detecção e purificação protéica. A sequência foi sintetizada e clonada a jusante do gene de uma proteína ligante de maltose (MBP2*) no vetor de expressão pMAL-c4X. A indução gênica da *E. coli* transformada foi realizada com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo e a proteína resultante (MBP2*.p26mod) foi detectada por SDS-PAGE em gel e Western blot com anticorpo monoclonal anti-HIS. A MBP2*.p26mod foi visualizada como uma banda de 68,5 kDa, a qual foi clivada com fator Xa resultando em duas bandas de 42,5 e 26 kDa, correspondentes à MBP2* e à p26mod respectivamente. A purificação MBP2*.p26mod foi realizada por cromatografia de afinidade com resina de níquel e foi obtido um rendimento de 78,12 mg/L de cultura bacteriana. A proteína MBP2*.p26mod foi intensamente imunoreativa no teste de IDGA, onde foram observadas linhas de precipitação únicas entre os soros positivos, inclusive o soro de referência OIE, e a proteína MBP2*.p26mod, demonstrando altas especificidade e sensibilidade analíticas da proteína recombinante.

Palavras-chave: Sistema de expressão heterólogo, antígeno recombinante, proteína nuclear, equideocultura.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA), considered one of the most important viruses in horses in the world, is caused by a lentivirus of the *Retroviridae* family. It is a chronic infection without treatment, mainly prevalent in regions with hot and humid climate, favorable for transmission by blood-sucking insects. According to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), the restriction of transit and slaughter of infected animals are the strategies for the control of EIA in Brazil, which causes losses in equine breeding. The official diagnosis of the disease is carried out by detection of circulating antibodies by Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and ELISA. The p26 protein from EIAV is highly conserved and used in most diagnostic tests, since it induces a strong humoral response. The aim of this work was the production of a p26 recombinant protein in *Escherichia coli* for use in serologic tests. The p26 gene sequence was optimized with respect to *E. coli* codon usage, in order to maximize protein production, and was added with a marker sequence of six histidine residues (6xHis-tag) for later protein detection and purification. The sequence was synthesized and cloned downstream of the gene of a maltose binding protein (MBP2*) on the pMAL-c4X expression vector. The *E. coli* gene induction was performed by Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside and the resulting protein (MBP2*.p26mod) was detected by SDS-PAGE gel and Western blot with monoclonal anti-HIS. The MBP2*.p26mod was visualized as a 68.5 kDa band, the recombinant fusion protein was cleaved with factor Xa resulting in two bands of 42.5 and 26 KDa, corresponding to MBP2* and p26mod respectively. The MBP2*.p26mod purification was performed with affinity chromatography by nickel resin and yielded 78.12 mg/L of bacterial culture. The MBP2*.p26mod protein was intensely immunoreactive at AGID test where precipitation lines were observed only among the positive sera, including reference OIE serum, and the protein MBP2*.p26mod, showing high analytical sensitivity and specificity of the recombinant protein.

Keywords: Heterologous expression system, recombinant antigen, core protein, horse industry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura		Página
Figura 1	Estrutura do vírion do VAIE.	20
Figura 2	Organização do genoma pró-viral.	21
Figura 3	Ciclo retroviral, representação esquemática do ciclo viral do VAIE nas células hospedeiras.	24
Figura 4	Insetos hematófagos da família <i>Tabanidae</i> .	26
Figura 5	Mapa de distribuição da AIE no mundo.	27
Figura 6	Mapa de áreas com surtos de AIE no mundo.	28
Figura 7	Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).	31
Figura 8	Sacrifício de equinos portadores de AIE.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VAIE	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
AIE	Anemia Infecciosa Equina
BL-21	Linhagem de célula de <i>Escherichia coli</i> livre de plasmídeo utilizada para produção de proteínas
DNA	Desoxiribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>
IDGA	Imunodifusão em gel de Ágar
PF	Primer forward
PR	Primer reverse
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de leitura aberta)
FAO	<i>Food and agriculture Organization of the United Nations</i>
Kb	Kilobase
KDa	Kilodáton
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
EcoR I	Enzima de restrição que corta no sítio - GAATTC
BamH I	Enzima de restrição que corta no sítio - GGATCC
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico mensageiro)
tRNA	<i>Transfer ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico transportador)
PAGE	Polyacrimilamide Gel Eletrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
gag	Região do genoma viral
rev	Região do genoma viral
pol	Região do genoma viral

pr26	Proteína Recombinante p26
AMP	Ampicilina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
IPTG	IsoPropil-BETA-DTioGalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani medium (meio Luria Bertani)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampão salina fosfato)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
µg	micrograma
µl	microlitro
IgG	Imunoglobulina do tipo G
MBP	Maltose Binding Protein (Proteína ligadora de maltose)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	12
2- OBJETIVOS	14
3- REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1- Equideocultura no Brasil	14
3.2- Histórico da AIE	16
3.3- Patogênese	16
3.4- Fases clínicas da doença	18
3.5- Genoma do VAIE	20
3.6- Mecanismos de replicação viral	21
3.7- A proteína p26	25
3.8- Epidemiologia	26
3.9- Técnicas de Diagnóstico	30
3.10- Controle	32
3.11- Sistemas heterólogos de produção de proteínas recombinantes	33
3.12- Uso preferencial de códons - <i>Codon usage</i>	38
3.13- Proteínas de fusão	39
4- REFERÊNCIAS	41
5- ARTIGO	55
Abstract	56
Resumo	57
1- Introdução	59
2- Material e métodos	61
2.1- Síntese do gene p26 códon-otimizado para expressão em <i>E. coli</i>	61
2.2- Construção do cassete de expressão	61
2.3- Análise das colônias transformantes	62
2.4- Transformação, cultivo e indução dos clones selecionados	62
2.5- SDS-PAGE e Western blot	63
2.6- Purificação proteica	63
2.7- Clivagem da proteína de fusão	64
2.8- Imunodifusão em gel de Agar com a MBP2*.p26mod	65

3- Resultados	65
4- Discussão	66
Agradecimentos	69
Figuras	70
Referências	73

1 INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma virose caracterizada por anemia hemolítica do tipo imune em equídeos. Segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses o vírus da AIE (VAIE) está classificado como Equine infectious anemia vírus, gênero Lentivirus, Subfamília Orthoretrovirinae, Família Retroviridae. O VAIE compartilha características morfológicas, antigênicas e genéticas com outros retrovírus, como os vírus da imunodeficiência humana, bovina e felina.

A AIE tem distribuição mundial e faz parte da Lista de Doenças da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (OIE, 2013). A principal forma de transmissão do VAIE ocorre por insetos hematófagos, mas podem ocorrer ainda de maneira iatrogênica, transplacentária, e via colostro e sêmen. Esta enfermidade constitui em grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, acarretando prejuízos aos criadores, além de dificultar o acesso ao mercado internacional. No Brasil, a infecção pelo VAIE apresenta prevalências variadas, chegando a mais de 50% no Brasil Central, Roraima e Minas Gerais (ALMEIDA et al., 2006).

Segundo Riet-Correa et al., (2003), no Brasil relataram que entre 1974 a 1993 foram examinados 3.553.626 equídeos, com 94.129 positivos para AIE. A distribuição dos resultados positivos mostra as regiões Norte com 11,51%, Nordeste com 3,36%, Centro-Oeste com 8,0%, Sudeste com 0,43% e Sul com 0,32%.

O vírus da AIE tem basicamente a mesma composição genética de outros lentivírus, com os genes gag, env e pol. O gene gag codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9; o gene pol codifica a transcriptase reversa, integrase e protease; e o gene env codifica as glicoproteínas gp90 (superfície externa) e gp45 (transmembrana). O gene regulador tat controla a transcrição viral e o rev, o transporte e tradução do RNA; vif e vpu regulam a produção das partículas virais infecciosas; e vpr e nef estão envolvidos nas manifestações clínicas da doença. As elevadas taxas de mutações nos genomas dos lentivirus permitem seu escape ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas.

Os primeiros e predominantes anticorpos produzidos por um animal infectado pelo VAIE são contra a glicoproteína gp90, detectáveis entre sete e 10 dias após a infecção. Porém, como as mutações relacionadas com esta proteína são frequentes e determinantes ao escape viral, muitos testes não a utilizam para o diagnóstico da AIE. O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína p26 (principal

proteína nuclear viral), observados entre 10 e 14 dias após a infecção, atingindo pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90.

Os testes sorológicos mais empregados no diagnóstico da AIE são a imunodifusão em gel de agar (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Embora os ELISA detectem anticorpos mais precocemente e em títulos mais baixos do que a IDGA, os resultados positivos nos ELISA devem ser confirmados na IDGA, pois resultados falso-positivos têm sido registrados nos ELISAs que utilizam antígeno advindos de purificação de partículas virais de cultura de células. Além disso, como a leitura da IDGA é feita com base na comparação das linhas de identidade do soro teste com um soro controle positivo, apresenta a vantagem de poder distinguir as reações inespecíficas das específicas (OIE, 2012). Por isto, a IDGA é recomendada como teste oficial para trânsito internacional de equídeos e ELISA como teste alternativo (OIE, 2012). No Brasil o teste oficial para diagnóstico da AIE é a IDGA (BRASIL, 2004).

Devido a sua sequência gênica ser conservada, a p26 é a proteína mais utilizada para a realização dos testes sorológicos, que pode ser obtida a partir do VAIE multiplicado em cultivo celular ou como antígenos recombinantes. Os antígenos produzidos para o diagnóstico da AIE no Brasil são obtidos por purificação de partículas virais de culturas celulares infectadas com o VAIE, constituindo-se de técnica dispendiosa e de baixo rendimento.

Com os avanços da engenharia genética a produção de proteínas recombinantes em diversos sistemas de expressão eucariotos e procariotos vem sendo empregada de forma eficiente e econômica para diversas finalidades. Dentre eles o mais utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, que apresenta várias vantagens: rápida expressão, alto rendimento, fácil cultivo e manipulação genética, e baixo custo para produção. Entretanto, algumas proteínas não são expressas nesse sistema, são expressas fragmentadas, insolúveis ou pouco solúveis, ou são expressas em altos níveis, porém inativas devido à formação de corpúsculos de inclusão. Parte desses problemas é resultado da incompatibilidade entre os códons da sequência a ser clonada e os códons preferenciais do genoma da *E. coli*. Atualmente, com as facilidades da bioinformática e da síntese de genes é possível a otimização de códons da sequência gênica alvo através da substituição de códons raros, de modo a aumentar a produção proteica sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína codificada.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Aprimorar a produção da proteína p26 do VAIE em *Escherichia coli* para utilização no diagnóstico sorológico da AIE.

2.2 Específicos

- Obter clones de *E. coli* transformados com um gene sintético (p26s) códon otimizado construído a partir da sequência do gene p26 do VAIE;
- Expressar o gene p26 em cultivo de clones de *E. coli* transformados com o gene códon otimizado;
- Avaliar a imunoreatividade da p26 recombinante através de imunodifusão em gel de Agar (IDGA).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Equideocultura no Brasil

O Brasil possui o quarto maior rebanho equino no mundo, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, China e México. No Brasil os equídeos perfazem um total de 7.803.140 animais (Equinos com 5.496.817, Asininos com 1.030.584 e Muares com 1.275.739). Somente a Região Nordeste é responsável por 26,44% dos equinos no Brasil com 1.375.419 animais. O agronegócio do cavalo gera 642,5 mil empregos diretos, os postos de trabalhos indiretos chegam a 2,6 milhões. Com toda a cadeia produtiva equina que envolve mais de 30 segmentos, os quais compõem a base do chamado Complexo do Agronegócio do Cavalo. O faturamento anual da indústria do cavalo encontra-se estimado em R\$ 7,5 bilhões, ficando as exportações desta atividade em 2009 estimadas em US\$ 27,4 milhões (CNA, 2010).

A exportação de carne de equídeos representa um dos principais segmentos do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Entre 1990 e 2008, o volume das exportações brasileiras de carne de cavalo aumentou 465%. Entre os Estados brasileiros,

o Paraná tem tido a maior participação nas exportações de carnes, representando 47% ou US\$13.209.692 do total exportado. Com relação às exportações brasileiras de cavalos vivos, entre 1996 e 2008, houve um aumento de 530% em relação ao número de animais exportados.

Sobre a exportação de cavalos vivos a expansão alcançou 524% entre 1997 e 2009, passando de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões. O Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina. A maior população brasileira de equinos encontra-se na região Sudeste, com São Paulo como maior exportador do Brasil de cavalos vivos; seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte. Destaque para o Nordeste, que além de equinos, concentra maior registro de asininos e muares.

Para garantir o fortalecimento da equideocultura nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE; além de investir também na formulação de políticas públicas, estudos e pesquisas (MAPA, 2011).

As doenças de notificação obrigatória são aquelas constantes da lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que possam comprometer o rebanho animal, a economia, a saúde pública ou o meio ambiente. Dela se faz constante a AIE, devido à gravidade desta doença e ao seu modo de transmissão. O trânsito de equídeos, independente do destino e da finalidade, está condicionado à emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) e à apresentação dos demais documentos sanitários e fiscais constantes na legislação vigente relacionada. O trânsito de equídeos é condicionado à apresentação de exame negativo para **AIE**. Os exames sanitários exigidos para o trânsito de equídeos e participação em exposições e demais eventos de aglomeração são realizados somente nos laboratórios credenciados integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (MAPA,2011).

3.2 Histórico da AIE

A AIE, hoje em dia, é reconhecida como a principal virose equídea no Brasil e vem sendo utilizada como modelo de estudo para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (KONEMAN, 2008). A AIE foi descrita como doença inicialmente em 1843 por Lignéé, na França, sendo a primeira doença animal associada à etiologia viral (VALLÉ e CARRÉ, 1904). A primeira vez que a doença foi relatada nas Américas foi em

Manitoba, Canadá, no ano de 1881, sendo que em 1896 foi descrita em Wisconsin já tendo sido diagnosticada em muitas regiões dos Estados Unidos (BYRNE, 1960).

No Brasil, Manente (1952) admitiu a existência da doença em São Paulo, mas apenas foi notificada pela primeira vez em 1968, na época no chamado estado da Guanabara por Dupont et al. (1968). Também em 1968, a doença foi descrita por Silva et al. (1968) em animais do Clube Hípico Fluminense na cavalaria da Polícia Militar na cidade de Niterói, Rio de Janeiro. Ainda em 1968, Guerreiro et al. também descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul. Em 1971, relacionando exames clínicos de animais infectados, achados anátomo-patológicos, e exames laboratoriais é que os dados foram publicados, comprovando também mais 18 casos em equídeos do Jockey Club de Minas Gerais (BATISTA JUNIOR E FONSECA, 1971).

3.3 Patogênese

O VAIE replica-se em macrófagos do tecido hepático, baço, nódulos linfáticos, pulmões, rins e glândulas adrenais. As novas partículas virais são liberadas na corrente sanguínea e os títulos do vírus tendem a aumentar após o período de incubação de 7 a 21 dias (WEIBLEN, 2001). Uma vez infectado, o animal permanecerá com o vírus para o resto da vida, sendo incapazes de remover completamente o vírus do organismo, apesar da resposta imune humoral e celular ao VAIE. Muitos sinais clínicos e lesões tanto da forma aguda como da crônica são atribuídos à resposta imune do hospedeiro para o vírus (TRAUB-DARGATZ, 1993; MURPHY et al., 1999).

Nos animais infectados com o VAIE, existe uma estreita relação entre sinais clínicos da doença e o título viral. Tem sido demonstrado que a quantidade de tecido infectado com o vírus deve atingir um valor crítico ou limite, a fim de provocar a doença (COOK et al. 2003). Para que o animal seja infectado, o vírus deve possuir potencial replicativo suficiente dentro do seu hospedeiro. Embora o espectro de virulência entre as estirpes de ocorrência natural VAIE não tenham sido perfeitamente determinadas, sabe-se que qualquer mutação no genoma viral que reduza as taxas de replicação viral *in vivo* irá atenuar a patogenicidade. Além da replicação viral, as diferenças entre os animais hospedeiros de uma mesma espécie ou de espécies diferentes desempenham um papel significativo no aparecimento dos sinais clínicos após a infecção com o VAIE (COOK ET AL 2003; LICHTENSTEIN et al 1995).

A persistência viral provavelmente está ligada ao fato do vírus inserir uma cópia de DNA viral no DNA cromossomal dos macrófagos do hospedeiro, formando o provírus, que pode não ser manifestado por longo período de tempo, com baixa (ou nenhuma) transcrição ou tradução de genes virais. Sem expressar o antígeno viral, a célula não será reconhecida como infectada pelo sistema imune do hospedeiro. O estímulo responsável pela reativação do provírus ainda não é plenamente conhecido (TRAUB-DARGATZ, 1993), mas sabe-se que fatores imunossupressores como administração de corticóides, doenças que debilizem o sistema imunológico ou estresse, induzem ao retorno do aparecimento de alguns sinais clínicos (KONO et al., 1976; TUMAS et al., 1994; CRAIGO et al., 2002).

A anemia resultante de infecção por VAIE é normocítica e normocrômica, resultante de uma combinação de hemólise, eritrofagocitose e de uma redução na produção de eritrócitos. Na histologia observa-se hemossiderose do fígado, baço, linfonodos, vasculite, com infiltração de células mononucleares em diversos órgãos, e glomerulonefrite proliferativa (TRAUB-DARGATZ, 1993; SELON, 1996; JONES, 2004).

Em relação aos achados patológicos encontrados após necropsia, as lesões típicas são encontradas no coração, fígado, baço, linfonodos, rim e medula óssea. Os principais achados macroscópicos são edema subcutâneo, icterícia, tumefação de órgãos parenquimatosos, hemorragias petequiais, hipertrofia ventricular, palidez e flacidez do miocárdio (TRAUB-DARGATZ, 1993).

Muitos dos sinais clínicos da fase aguda são causados por mediadores pró-inflamatórios liberados em resposta à carga viral, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 (IL-1 α e IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6) (LECHNER et al 1997; LIM et al 2005). Durante a doença aguda, tem sido observado que os níveis no sangue de TNF α e IL-6 encontraram-se significativamente elevados (TORNQUIST e CRAWFORD, 1997; SELLON et al 1999), podendo induzir respostas febris com o aumento da produção de prostaglandina E2. Além do que, estas citocinas liberadas em resposta à infecção também podem causar trombocitopenia (TORNQUIST E CRAWFORD, 1997).

3.4 Fases clínicas da doença

A AIE surge com uma progressão vigorosa que passa por três fases: aguda, crônica e inaparente. A fase aguda e crônica de EIA são definidas por episódios de doença clínica que são acionados por ondas de viremia com presença de febre, hemorragia (MCCLURE et al., 1982), anemia, trombocitopenia, leucopenia (NEWMAN et al., 1991) edema, diarreia, letargia e aumentos significativos nos níveis das enzimas hepáticas (PALOMBA et al., 1976). Sinais neurológicos e lesões do sistema nervoso central têm sido associados à doença. Sinais clínicos, como perda de peso, depressão, desorientação, andar em círculos e hipertermia, têm sido observados (MCILWRAITH e KITCHEN, 1978; MCCLURE et al., 1982). Entre oito e 12 meses pós-infecção, os cavalos infectados normalmente avançam para uma fase de longa duração, geralmente sem sintomas, presumivelmente devido ao desenvolvimento de imunidade do hospedeiro (CRAIGO e MONTELARO, 2008). Estes portadores inaparentes, porém, permanecem infectados por toda vida com a manutenção de níveis muito diferentes de replicação do vírus no estado estacionário em reservatórios monócitos rico tecido (HAMMOND et al., 2000; MONTELARO et al., 1993). Estresse ou imunossupressão dos portadores do VAIE inaparentes podem induzir um aumento da replicação viral e, potencialmente, um recrudescimento da doença (KONO et al., 1976).

O desenvolvimento da sintomatologia do animal infectado varia na maioria das vezes, a depender da dose viral aplicada (no caso de infecção experimental), do potencial de virulência da linhagem viral e do *score* corpóreo do animal e de seu *status* imunológico (TIMONEY et al., 1988; FENNER et al., 1993; MURPHY et al., 1999).

A forma aguda da doença costuma acontecer durante o início da infecção e termina frequentemente com a morte do cavalo no espaço de 3 a 14 dias. Caracteriza-se por um início súbito, febre alta de 40 a 42°C, depressão grave, perda de apetite e rápida deterioração da condição física. Uma profunda fraqueza podendo resultar em incoordenação ou prostração. Icterícia e edema do abdômen, com ou sem hemorragias petequiais das membranas das mucosas na base da língua e na conjuntiva. A frequência e a intensidade dos sons cardíacos aumentam consideravelmente, especialmente com exercício moderado. Secreção nasal amarelada ou sanguinolenta pode estar presente. Um aumento do baço pode ser verificado no exame retal. A forma aguda é caracterizada por uma baixa do hematócrito, hemoglobina baixa, baixa contagem de células vermelhas do sangue, e uma taxa de sedimentação elevada. A morte está usualmente

relacionada com a gravidade da anemia (MCCLURE et al., 1982; COOK et al., 1996; ETTINGER e FELDMAN, 1997).

A forma crônica da doença pode seguir-se à forma aguda ou subaguda podendo voltar a estas a qualquer momento (SELLON, 1992; CRAWFORD et al., 1996;). A maioria dos animais com diagnóstico de AIE encontra-se com a forma crônica da doença apresentando ciclos recorrentes de febre, perda de peso, anorexia, edema, leucopenia, anemia e trombocitopenia resultando em hemorragias, letargia e ataxia. Os episódios têm duração média de três a cinco dias com intervalos de semanas ou meses entre eles. A frequência e a severidade da doença diminuem com o tempo, após 6 a 8 episódios que acontecem nos primeiros 12 meses após a infecção, a maioria dos animais torna-se portador assintomático (HIRSH e ZEE, 2003).

Com isso a maior parte dos animais infectados com o vírus da AIE encontra-se na forma inaparente da doença. Estes animais não apresentam sinais clínicos, mesmo possuindo níveis detectáveis de anticorpos. Depois de muitos anos assintomáticos, alguns cavalos infectados cronicamente sofrem recaídas após estresse imunológicos associados a outras doenças graves (ISSEL e COGGINS, 1979). Muitos destes animais só serão diagnosticados como portadores quando submetidos a testes sorológicos com o objetivo de transitar entre estados, enquanto isso constituem fonte de transmissão da doença servindo como um reservatório de infecção por toda vida.

Uma hipótese para a recorrência cíclica e persistência viral é que o sistema imune age sobre a população viral existente durante a infecção clínica (febre alta) na tentativa de eliminá-la. Quando o organismo consegue controlar esta infecção algumas variantes, que têm alterações confinadas ao envelope são selecionadas. Com o passar do tempo os episódios febris recorrentes e a forma aguda da doença vão se tornando menos frequentes e o animal atinge o estado de portador assintomático (BOTTON e WEIBLEN, 1995).

3.5 Genoma do VAIE

As retroviroses são causadas por uma grande família de RNA vírus envelopados com similaridades taxonômicas que incluem a estrutura, composição e propriedades replicativas. O VAIE pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus*; a principal característica da família é a estratégia de replicação que

inclui como passos essenciais a transcrição reversa do RNA do vírion em DNA dupla fita e sua subsequente integração no DNA genômico da célula hospedeira (COFFIN, 1996). Os vírions possuem de 80-100 nm de diâmetro, e seu envelope lipídico exterior incorpora e exhibe as glicoproteínas virais. O RNA do vírion possui entre sete e 12 kb em tamanho, é linear, de cadeia simples, não segmentado e de polaridade positiva (MURPHY et al., 1994).

O VAIE replica-se predominantemente em macrófagos (CLEMENTS e ZINK, 1996), pertence à família *Retroviridae* e sub-família *Lentivirinae*, possui como material genético duas fitas positivas de RNA, seu genoma possui tamanho de 8,2 kb, sendo o menor e o mais simples de todos os lentivírus. As partículas virais do VAIE são pleomórficas esféricas e com diâmetro entre 90-140 nm (BERNE, 2001), possui núcleo com forma cônica e a simetria capsidial é icosaédrica (CLEMENTS e ZINK, 1996).

Possui os genes *gag*, *pol* e *env*, responsáveis pela formação de proteínas estruturais, polimerases, proteases e glicoproteínas do envelope, respectivamente; o gene *gag* (antígeno associado a grupo), codifica as principais proteínas internas: p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* (polimerase), designando a enzima transcriptase reversa, ribonuclease “H” e uma integrase, enzima de ligação ao DNA para auxiliar na integração ao genoma da célula do hospedeiro; já o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope, gp90 (superfície externa) e gp45 (transmembrana) (HENDERSON, 1987; HUSSAIN, 1988; LEROUX, 2004). A seguir, na figura 1, a estrutura do vírion de Vaie.

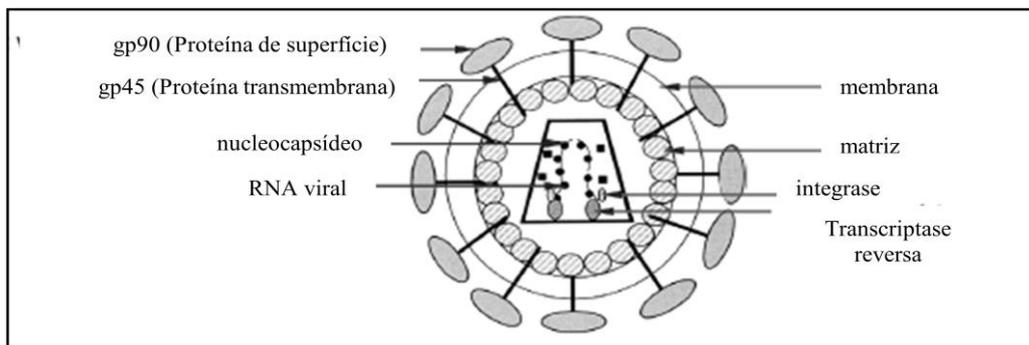


Figura1 . Estrutura do vírion do VAIE. Fonte: adaptado de Leroux, 2004.

O genoma viral possui também três fases de leitura aberta (*Open reading frames*) (ORFs); denominadas *tat*, *rev* e *s2*, responsáveis pela síntese de proteínas regulatórias, respectivamente cada ORF codifica: proteínas acessórias para ativação transcricional; regulação de splicing e de transporte do RNAm; e ação na replicação

viral e virulência (CLEMENTS e ZINK, 1996; LEROUX, 2004). Possuem ainda longos terminais de repetição (*Long Terminal Repeats*) (LTR), cujo papel é servir como local de início da transcrição, eles contêm três segmentos denominados U3 (sequência única, na extremidade 3'), R (sequencia em repetição) e U5 (sequência única, na extremidade final 5'). A região U3 contém vários elementos importantes para a transcrição viral (CARVALHO e DERSE, 1993). A seguir, na figura 2, a organização do genoma pró-viral do VAIE.

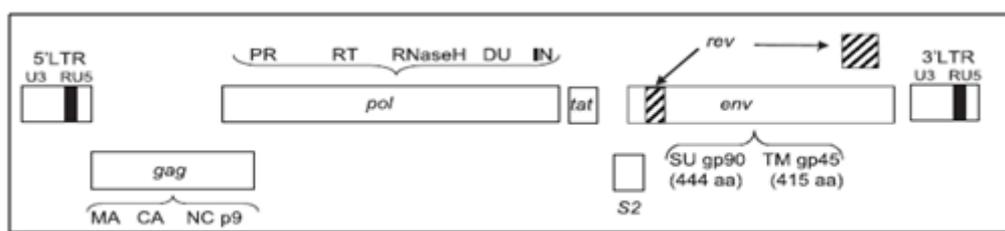


Figura 2. Organização do genoma pró-viral . LTR: Repetições de Terminais Longos; MA: matriz; CA: capsídeo; NC: nucleocapsídeo; PR: protease, RT: transcriptase reversa; DU: dUTPase; IN: integrase; SU: superfície; TM: transmembrana. Fonte: adaptado de Leroux, 2004.

As proteínas do gene gag, proteínas estruturais não glicosiladas, são menos predispostas à variação antigênica do que as glicoproteínas de superfície, que estão envolvidas no mecanismo de escape viral do VAIE. A principal proteína do núcleo, a p26, Além de ser antigenicamente conservada nos vários isolados do VAIE, induz uma forte resposta imune humoral na maioria dos cavalos infectados, sendo utilizada como base da maioria dos testes de diagnóstico sorológicos para o vírus (TRAUB-DARGATZ, 1993).

3.6 Mecanismos de replicação viral

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus se utilizam da maquinaria celular hospedeira para transporte através da membrana, transcrição, *splicing*, transporte intracelular e síntese proteica. Qualquer ciclo viral pode ser dividido nas seguintes fases: Adsorção à membrana celular hospedeira, penetração no citoplasma, desnudamento do material genômico com liberação do complexo nucleoprotéico ou capsídeo, síntese de proteínas de fase precoce, replicação do genoma, síntese de proteínas de fase tardia, montagem viral e maturação e finalmente a liberação da nova partícula viral. Os vírions, partículas subvirais ou complexos nucleoprotéicos são

transportados durante as três primeiras fases, a partir da superfície da célula hospedeira até o sítio de transcrição e replicação, assim como são transportados do sítio de síntese para o local de montagem e de volta à membrana celular hospedeira para a liberação da partícula viral (Figura 3) (CUDMORE et al., 1997; SODEIK, 2000; PLOUBIDOU e WAY, 2001; SMITH e ENQUIST, 2002; FLORES, 2007).

Devido ao trânsito de partículas maiores que 500 kDa ser restrito dentro do citoplasma, diferentemente de partículas menores cujo trânsito é mais livre, os vírus assim como as organelas celulares empregam energia para transporte direcionado. Os vírus utilizam dois tipos de estratégia para transporte dentro da célula: se apropriam do mecanismo de transporte membranar ou interagem diretamente com a maquinaria de transporte do citoesqueleto (DÖHNER, NAGEL e SODEIK, 2005).

A Transcrição reversa é uma característica do ciclo de replicação retroviral. O termo retrovírus passou a ser utilizado em relação à designação anterior, "vírus tumorais de RNA", reconhecendo que a transcrição reversa é a característica principal desta classe de vírus. A sugestão de que alguns vírus de RNA podem replicar por meio de um intermediário de DNA, sendo subsequentemente incorporada ao genoma hospedeiro foi primeiramente feita por Temin e Mizutani (1970), concomitante aos estudos de Baltimore (1970). A capacidade dos retrovírus em fazer uma cópia de DNA do genoma e inseri-lo no genoma do hospedeiro explica muito da biologia destes vírus: sua capacidade de estabelecer infecções persistentes e a produção de células cronicamente infectadas (TELESNITSKY e GOFF, 1993; BEBENEK e KUNKEL, 1993).

A replicação do VAIE acontece em macrófagos de diferentes tecidos como baço, fígado, pulmão, linfonodos e medula óssea (SELLON et al., 1992). Os monócitos do sangue periférico permitem a entrada do vírus e a transcrição reversa do RNA viral, porém não permitem a replicação viral; a diferenciação destes em macrófagos é um passo essencial para a replicação dos vírus e a expressão de proteínas virais (SELLON et al., 1992; MAURY, 1994).

Os retrovírus, dentre eles o VAIE, penetram na célula por fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira. A primeira fase de entrada do vírus no macrófago dá-se através do co-receptor lentivírus equino 1 (ELR1), pertencente a família de receptores da classe do fator de necrose tumoral (TNFR). Para a definição das interações funcionais entre a proteína de superfície do VAIE (gp90) e seu receptor ELR1, estudos realizados por Zhang et al. (2005) revelam como determinante a ligação da gp90 ao ELR1. Mutações de aminoácidos individuais do segmento de CRD1 ELR1

indicaram o resíduo de aminoácido Leu70 no CRD1 como essencial para a ligação funcional da EIAV gp90 e para a infecção pelo vírus das células alvo.

Durante a passagem pelo citoplasma, o genoma composto de RNA do vírus é reversamente transcrito em DNA pelo complexo da transcriptase reversa. O trânsito intracelular dos elementos virais requer o uso de energia, assim como a montagem dos componentes virais e a liberação dos vírions; o que acontece do citoplasma até a membrana celular hospedeira para haver então a liberação dos vírions (GREENE e PETERLIN, 2002).

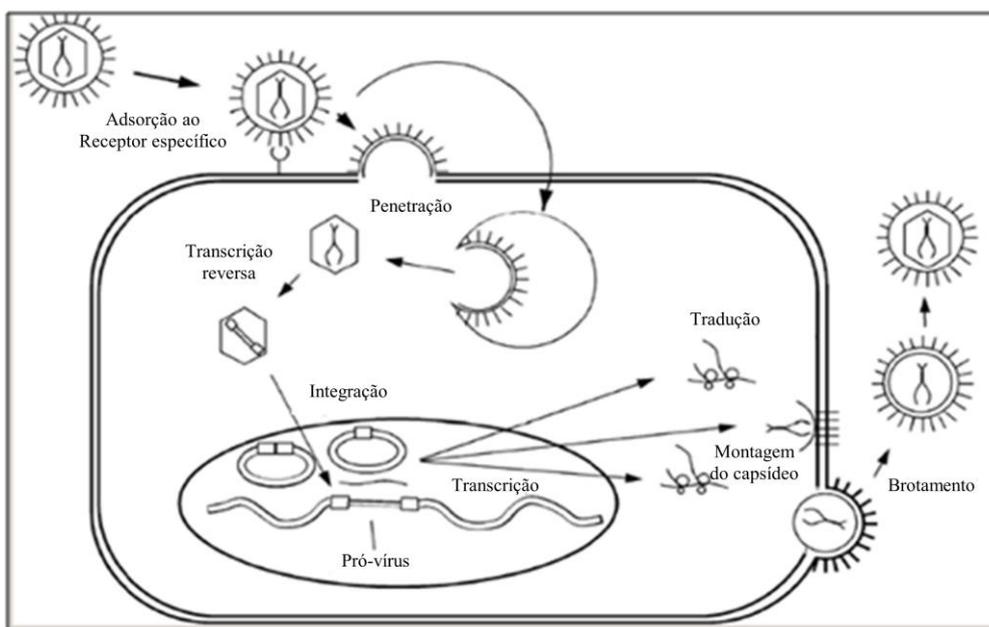


Figura 3. Ciclo retroviral, representação esquemática do ciclo viral do VAIE nas células hospedeiras. Fonte: Fields, 2001.

Um dos mecanismos fundamentais de persistência pelo VAIE, tal como observado com outros lentivírus, incluindo o HIV-1, é a variação genômica dinâmica resultante de alterações na antigenicidade do envelope devido a mutações nos genes que codificam as proteínas de membrana do vírus (BRINDLEY e MAURY et al., 2005), alguns estudos também indicam a LTR viral, como um segundo gene variável do VAIE, sendo designada como região hipervariável (PAYNE et al., 2004). A variação genética é uma marca registrada dos retrovírus que se acredita ser uma consequência da baixa atividade de revisão da transcriptase reversa 3'-5' codificada pelo próprio vírus (OVERBAUGH e BANGHAM, 2001). As regiões LTR do VAIE são as mais variáveis do genoma viral em isolados de cultura de tecidos e em diferentes isolados de

campo (LICHTENSTEIN, 1999; PAYNE et al., 1999). Um estudo examinou sete isolados *in vivo* e demonstrou que 45% das posições dos nucleotídeos dentro das LTRs variou entre os isolados (MAURY et al., 1997). Níveis semelhantes de variação foram também encontrados em diferentes isolados de cultura de tecidos, estas alterações incluem mutações pontuais, inserções e deleções na região de cerca de 90 pb encontrada nas LTRs (MAURY et al., 2005).

3.7 A proteína p26 do VAIE

A principal proteína do núcleo de EIAV, a p26, é uma dos principais proteínas imunogênicas estruturais persistentes durante todas as fases da infecção e também é altamente conservada antigenicamente entre isolados virais (SALINOVICH et al., 1986; HUSSAIN et al., 1988). Por estas razões, a detecção de anticorpos para p26 serve como base para os procedimentos de diagnóstico sorológicos para VAIE em cavalos (COGGINS, NORCROSS e NUSBAUN, 1972; SHANE et al., 1984). Os primeiros e predominantes anticorpos produzidos por um animal infectado são contra a glicoproteína gp90, detectáveis entre sete e 10 dias após a infecção. Porém, como as mutações relacionadas com esta proteína são determinantes ao escape viral (MONTELARO et al., 1984), muitos testes não a utilizam para o diagnóstico da AIE. O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína p26, observados entre 10 e 14 dias após a infecção, atingindo um pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90 (MONTELARO, BALL e RUSHLOW, 1993).

A p26 é uma proteína estrutural interna do vírus, codificada pelo gene gag; antigenicamente mais estável entre as linhagens do VAIE que as glicoproteínas gp45 e gp90 (MONTELARO et al., 1984), devido a sua sequência gênica ser conservada, a p26 é a proteína mais utilizada para a realização dos testes de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e ELISA, preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008).

A proteína p26 do VAIE foi obtida por Birkett et al. (1997) a partir de soro infectado pelo vírus como proteína solúvel produzida em *E. coli*. Quando analisada por SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras, a proteína purificada migrou como um monômero de 26 kDa, evidenciando que a proteína não contém ligações

dissulfeto intermolecular. Mesmo apresentando três resíduos de cisteína, a marcação dos grupos sulfidris livres com iodoacetamida sugere que nenhum dos três resíduos de cisteína de RP26 está envolvido em ligações dissulfureto intramoleculares. A Cromatografia por filtração em gel indicou que a proteína mostra-se como um monômero em solução. Analisando o espectro de dicroísmo circular da proteína verifica-se a seguinte composição estrutural: 51% α -hélice, 15% β -folha, e 34% mostra-se de forma aperiódica. Espectroscopia de fluorescência revelou que os três resíduos de triptofano em RP26 ocupar dois ambientes diferentes. Estes dados apoiam a conclusão de que a proteína encontra-se em sua conformação nativa.

3.8 Epidemiologia

A transmissão pode ser vertical (intra-uterina) ou horizontal, por meio de fômites contaminados (agulhas, freios, esporas e outros), leite materno, sêmen ou por insetos hematófagos. Majoritariamente acontece de modo horizontal através destes últimos (CRAIGO e MONTELARO, 2008).

A transmissão do vírus está principalmente relacionada com a transferência de sangue de um cavalo infectado a um sadio. Os animais hematófagos desempenham o papel mais importante na cadeia de transmissão, atuando como vetores, implicados na transmissão mecânica de agentes patogênicos, como exemplo, insetos hematófagos da ordem Diptera: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybromitra* spp, sendo os *Tabanus* sp, os principais responsáveis pela transmissão (FOIL et al., 1983; ISSEL et al., 1985; TIMONEY et al., 1988; MURPHY et al., 1999).



Figura4. Insetos hematófagos da família *Tabanidae*. Fonte:http://www.cirrusimage.com/fly_horse_Tabanus.htm

O risco de transmissão entre animais positivos para AIE e animais saudáveis aumenta com a prevalência da doença na propriedade, a diversidade e abundância dos vetores associados à proximidade entre os animais (SILVA, 2001). Outras questões relacionadas com a transmissão da doença são: os hábitos alimentares dos insetos, a densidade populacional de animais, a quantidade de sangue transferida e a viremia do animal infectado (BEER, 1999).

No Pantanal, foram encontradas 23 espécies de tabanídeos, dos quais a grande maioria ataca equídeos. Variações na umidade, pluviosidade e temperatura influenciam tanto a fauna silvestre e a flora, como também as populações de vetores e o consequente surgimento de doenças relacionadas. Em geral picos populacionais foram observados próximos ao início do período chuvoso (setembro-outubro), sendo o período até janeiro o de maior abundância de tabanídeos na região (BARROS e FOIL, 1999). A maioria das espécies de mutucas ocorre durante todo o ano, porém sua maior abundância dá-se na primeira metade da época chuvosa sugerindo este período como o de maior risco para transmissão do VAIE aos equídeos (BARROS e FOIL, 2000).

O mais recente mapa de distribuição da doença no mundo segundo a OIE, correspondente ao ano de 2012, mostrou que o Canadá, Colômbia, Equador, Bolívia, Rússia e Mongólia apresentavam a forma clínica da doença. Não existindo dados oficiais para o ano de 2012 para o Brasil, Groelândia, China e vários países africanos. Continuam a nunca ter tido relatos da doença o Egito, o Sudão, a Etiópia, Botswana, Iraque, Madagascar e os países do norte da Oceania (Figura 5).

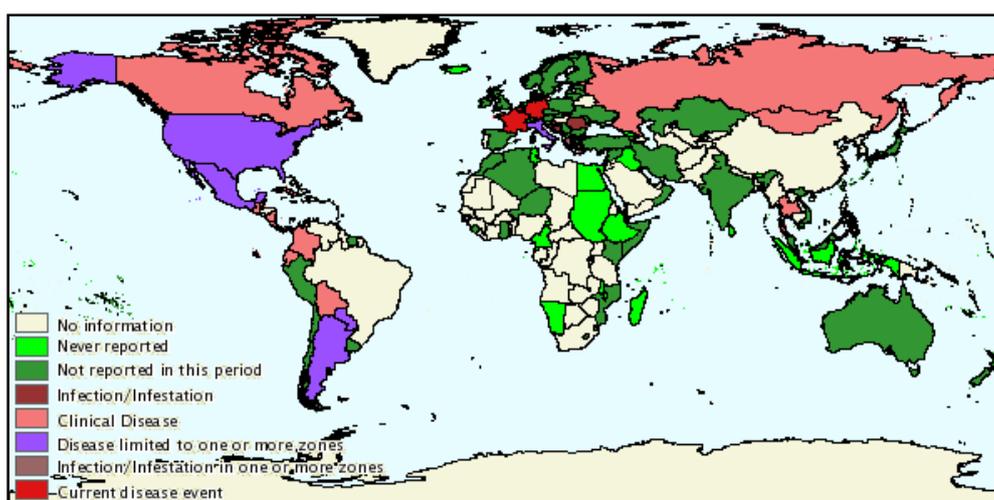


Figura 5. Mapa de distribuição da AIE no mundo, período de JAN-JUN do ano de 2012, segundo dados da OIE. Fonte: <http://www.oie.int>

significativamente mais baixa, ao sul da primeira. As mais altas prevalências para rebanhos de serviço foram encontradas na região Norte/Nordeste (14,9%) e na região do Vale do Mucuri/Jequitinhonha (12,5%) e as mais baixas com 5,3% para rebanhos e 3,1% para animais.

Em Cuiabá, no estado do Mato Grosso, Nociti et al. (2007) verificaram a ocorrência da AIE uma prevalência de 11,8% de casos positivos em equinos de tração . Essa alta prevalência demonstra que muitos proprietários de cavalos têm mantido animais positivos, o que pode está relacionado ao fato deles não apresentarem qualquer sinal clínico associado à AIE.

Entre os anos 2002 a 2008, Karam et al. (2010) observaram um aumento significativo no número de focos no Rio de Janeiro e atribuíram este aumento à intensificação das medidas de defesa sanitária realizadas em todo o estado, diminuindo com isso a subnotificação.

Fiorillo (2011) estimou a prevalência em sete regiões do Estado de Minas Gerais, foram amostrados 7742 equídeos pertencentes a 717 haras, distribuídos em sete estratos regionais. A prevalência encontrada foi de 0,44% haras positivos e de 0,07% animais positivos para a AIE. Os animais de haras apresentaram menor prevalência de AIE do que a que foi previamente estimada para animais de serviço, porque provavelmente o valor zootécnico e a necessidade de emissão de guia de trânsito para participação em eventos controlados levam à maior preocupação em promover o saneamento da propriedade com exames periódicos e sacrifício dos animais positivos. As maiores prevalências foram encontradas nos estratos das mesorregiões Norte/Nordeste de Minas, com 0,34% e do Vale do Mucuri/Jequitinhonha com 0,72%; demonstrando que a prevalência da AIE em haras de Minas Gerais é muito baixa e que o risco de ocorrência da doença na região norte é mais alto que no centro e sul do estado.

A falta de dados substanciais sobre a doença em todos os estados do Brasil e no mundo, isto é, a subnotificação, faz com que o controle e erradicação se tornem difíceis pois os animais infectados continuam como reservatório do vírus contribuindo para a disseminação (CAVALCANTE, 2009).

3.9 Técnicas de diagnóstico

Os testes de imunodifusão em gel de agar (AGID) (COGGINS e NORCROSS, 1970) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (SUZUKI et al., 1982) são os testes escolhidos pela OIE para a detecção da AIE em cavalos (OIE,2008). Embora os ELISA detectem anticorpos mais precocemente e em títulos mais baixos do que a IDGA, os resultados positivos nos ELISA devem ser confirmados na IDGA, pois resultados falso-positivos têm sido registrados nos ELISA. Além disso, como a leitura da IDGA é feita com base na comparação das linhas de identidade do soro teste com um soro controle positivo, apresenta a vantagem de poder distinguir as reações inespecíficas das específicas (OIE, 2012). Por isto, a IDGA é recomendada como teste oficial para trânsito internacional de equídeos e ELISA como teste alternativo (OIE, 2012). No Brasil o teste oficial para diagnóstico da AIE é a IDGA (BRASIL, 2004).

A IDGA baseia-se na detecção de anticorpos contra a principal proteína nuclear viral, a p26. Essa detecção ocorre pela visualização de uma linha de precipitação que ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo na região de equivalência dos mesmos. Anticorpos precipitantes específicos podem ser detectados entre 14 e 45 dias pós-infecção (COGGINS, NORCROSS e NUSBAUM, 1972; ISSEL e COGGINS, 1979). Os testes IDGA e ELISA podem ser feitos com a utilização de antígenos tanto de cultivo celular (BOUILLANT et al., 1986; COGGINS, NORCROSS e KEMEN, 1973; MALMQUIST et al., 1973) como de antígenos recombinantes (ALVAREZ et al., 2007; BIRKETT et al., 1997; PIZA et al., 2007; REIS et al., 1994, 2012; COUTINHO, 2012).



Figura 7. Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) mostrando linhas de precipitação, com a formação do complexo antígeno/anticorpo. 1,3 e 5- soro controle positivo; 2 e 4- soro de referência OIE sem diluição e na diluição 1:2 respectivamente; 6- Soro de kit comercial 1 (Laboratório Bruch, Brasil) e 7- Proteína recombinante p26. Fonte: arquivo pessoal.

Os antígenos do VAIE produzidos em bactérias, baculovírus ou em leveduras encontram aplicação prática como antígenos de alta qualidade para diagnóstico. Para uso como controle positivo no diagnóstico da AIE, pode ser utilizado o soro de um cavalo previamente infectado com o VAIE. Este soro deve produzir uma única linha de precipitação que é específico para o vírus. É essencial para o aparecimento da linha identidade de precipitação o equilíbrio entre as concentrações de antígeno e de anticorpo, a fim de assegurar a sensibilidade do teste. As concentrações dos reagentes devem ser ajustadas de modo a formar uma estreita linha de precipitação aproximadamente equidistante entre os poços contendo antígeno e soro (OIE, 2012).

Usualmente não é necessário o isolamento do vírus para fazer um diagnóstico devido a dificuldade em cultivá-lo em leucócitos. Mas caso seja necessário, pode ser realizado a partir do sangue de cavalos suspeitos adicionado a culturas de leucócitos preparados a partir de cavalos livres de infecção. A produção de vírus em culturas pode ser confirmada através de detecção de antígeno específico do VEIA por ELISA (SHANE, ISSEL e MONTELARO, 1984), teste de imunofluorescência (WEILAND, MATHEKA e BOHM, 1982) ou por meio de ensaios moleculares.

Entre os métodos moleculares está a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que tem sido descrita para a identificação do agente viral. Através da *nested* PCR consegue-se detectar o DNA proviral do VAIE a partir do sangue periférico de cavalos (NAGARAJAN e SIMARD, 2001). O método de PCR *nested* tem-se provado ser uma técnica sensível para detectar linhagens de VAIE em células brancas do sangue de cavalos infectados; o limite inferior de detecção é de tipicamente cerca de 10 cópias de DNA do genoma alvo (NAGARAJAN e SIMARD, 2001; NAGARAJAN e SIMARD, 2007).

Também foram descritas reações de transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) para identificação do vírus (COOK et al., 2002). Os ensaios de PCR podem auxiliar na detecção da infecção por VAIE em algumas situações: em resultados conflitantes de testes sorológicos; na suspeita de infecção com resultados sorológicos negativos; como teste complementar à sorologia para confirmação de casos positivos; para o diagnóstico de infecções precoces e na confirmação do status de potros de éguas infectadas (SANTOS et al., 2011), sendo este teste limitado pelo custo.

3.10 Controle Oficial

As medidas de controle preconizadas pelo MAPA estão presentes na legislação brasileira, pode-se destacar os principais marcos legais, como:

Portaria n° 200, de 18 de agosto de 1981, que inclui a AIE na relação de doenças passíveis de aplicação de medidas de defesa sanitária animal (Decreto n° 24.548, de 3 de julho de 1934), sendo obrigatório o sacrifício dos animais doentes, uma vez que não existe cura ou tratamento. Um equídeo sorologicamente positivo deve ser sacrificado ou abatido, sem indenização, sendo que o isolamento somente será permitido para animais portadores localizados em áreas onde seria inviável o sacrifício de todos os animais positivos, devido a grande perda econômica, como é o caso do Pantanal;

Portaria n° 84, de 19 de outubro de 1992, que aprova as normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de AIE;

Instrução Normativa n° 45, de 15 de junho de 2004, que aprova as normas para a prevenção e o controle da AIE, neste documento, determina-se que para o diagnóstico da AIE seja utilizada a prova sorológica da IDGA com o antígeno p26 (COGGINS e NORCROSS, 1970), ou outra oficialmente reconhecida, porém ainda não houve o reconhecimento oficial de outra prova sorológica;

Instrução Normativa n° 17, de 8 de maio de 2008 a qual institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), no âmbito do MAPA e a lei 13.467 de 15 de junho de 2010, que dispõe sobre a adoção de medidas de defesa sanitária animal no âmbito do Estado. O PNSE possui como objetivos: Elaborar e propor atualizações da legislação relativa às normas e procedimentos técnicos; propor e acompanhar estudos epidemiológicos; realizar vigilância epidemiológica e sanitária das principais doenças dos equídeos, tais como o Mormo e a AIE, visando a profilaxia, o controle e a erradicação destas doenças em todos os Estados da Federação dentre outros.



Figura 8. Sacrifício de equinos portadores de AIE em São João da Serra, Teresina. Os animais passaram por exames laboratoriais e foi constatada a doença, e por essa razão, o sacrifício foi obrigatório, seguindo as Leis sanitárias. Fonte: <http://www.adapi.pi.gov.br/noticias/113>.

3.11 Sistemas utilizados para a produção de proteínas recombinantes

Com o advento da engenharia genética, as proteínas recombinantes entraram no mercado, mudando o cenário da indústria farmacêutica. Através do uso de DNA recombinante, genes importantes, especialmente genes de mamíferos, podem ser amplificados e clonados em diferentes organismos (DEMAIN, 2007).

Quantidades elevadas de uma proteína específica dificilmente são obtidas a partir de células hospedeiras naturais. Assim, para uma produção elevada de uma proteína utiliza-se frequentemente a tecnologia do DNA recombinante em sistemas de expressão heterólogos. A maquinaria ribossomal, localizada no citoplasma é um excelente catalisador da biossíntese da proteína recombinante. O sistema de expressão baseado em *E. coli* é um dos mais utilizados devido a sua relativa simplicidade, baixo custo e facilidade de cultivo em alta densidade, possuindo também uma genética bem conhecida e o grande número de ferramentas disponíveis compatíveis para a biotecnologia, além da grande variedade de plasmídeos disponíveis, elementos utilizados para a fusão dos genes das proteínas e estirpes mutantes de *E. coli*, que têm avançado as possibilidades do uso da bactéria (MAKRIDES, 1996; SWARTZ, 1996; SØRENSEN E MORTENSEN, 2005).

Um grande número de proteínas recombinantes é produzido por meio de engenharia genética, movimentando cerca de 50 a 60 bilhões de dólares (SCHMIDT,

2004); com esta estratégia consegue-se produzir proteínas alvo em larga escala para atender as demandas das indústrias biofarmacêuticas. Para a produção de uma proteína recombinante deve-se escolher o melhor sistema de expressão, onde devem ser levados em conta certos pontos como a qualidade da proteína produzida, sua funcionalidade, a velocidade de produção e o rendimento obtido com cada sistema, ou seja, deve ser uma escolha caso a caso. As proteínas podem ser produzidas em culturas de células de bactérias, leveduras, fungos, mamíferos, plantas ou insetos (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

Geralmente, as proteínas que são maiores do que 100 kD são expressos num sistema eucariótico, enquanto aqueles inferior a 30 kD são expressos num sistema procariótico (RADER, 2008).

Proteínas não glicosiladas são geralmente feitas em *E. coli* ou leveduras e constituem 40% do mercado de proteínas terapêuticas. Proteínas glicosiladas humanas são normalmente feitas em células de mamíferos, pois possuem um sistema de glicosilação semelhante à glicosilação de proteínas humana. Leveduras, fungos e células de inseto são geralmente incapazes de oferecer uma típica glicosilação de mamífero. No entanto, a levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, tem sido geneticamente modificada para produzir um padrão de glicosilação semelhante ao humano (WALSH, 2003).

O sistema de produção de proteínas recombinantes baseado em *E. coli* é um dos mais antigos e utilizados (TERPE, 2006). Apresenta-se como um excelente sistema de produção de proteínas não-glicosiladas, sendo utilizado para a produção em larga escala de várias proteínas comercializadas. Além de tudo a *E. coli* recombinante pode acumular proteínas em um total de até 80% de seu peso seco e sobrevive bem em várias condições ambientais. Porém como todos os sistemas, este apresenta algumas desvantagens, como é o caso de seu crescimento em alta densidade celular que pode resultar em aumento da toxicidade devido à formação de acetato; algumas proteínas podem ser produzidas na forma de corpúsculos de inclusão, o que leva a alteração de solubilidade, perda de funcionalidade e dobramento errado (*fold*ing); o sistema não consegue produzir com eficiência pontes dissulfeto intramoleculares, além de não realizar glicosilação proteica (TERPE, 2006; SWARTZ, 1996).

Para tentar ultrapassar as limitações do sistema de produção proteica em *E. coli* podemos: utilizar diferentes promotores gênicos para regular a produção proteica, usar diferentes linhagens de *E. coli*, diminuir a temperatura de produção em busca da não

formação dos corpúsculos de inclusão, mudar o meio de cultivo, entre outros (CHOU, 2007; WONG et al., 2008).

Cultivos da bactéria com alta densidade celular leva a produção aumentada de acetato, que é tóxico para célula, este problema pode ser resolvido através da adição exponencial de glicose durante a fase de crescimento celular (FIESHKO, 1989).

Proteínas heterólogas produzidas na forma de corpúsculos de inclusão são inativas, insolúveis, às vezes possuem pontes dissulfeto e radicais livres de cisteína extras, além de possuírem *foldings* incorreto (FISCHER, 1993). Para realizar a recuperação da proteína pode-se utilizar agentes desnaturantes e redutores, seguidos da eliminação destes agentes e com acréscimo de uma etapa de oxidação; ainda para driblar os corpúsculos pode-se utilizar uma proteína de fusão (LAVALLIE et al., 1993).

Quando os sistemas de produção proteica baseados em *E. coli* não são capazes de atender à produção da proteína alvo, muitas vezes escolhe-se a produção em leveduras, organismos eucarióticos unicelulares. As vantagens principais dos sistemas de expressão baseados em leveduras são: alto rendimento, linhagens estáveis para produção, crescimento com alta densidade celular, processamento da proteína semelhante para células de mamíferos, consegue produzir proteínas ricas em pontes dissulfeto, é capaz de glicosilar proteínas, cepas bem caracterizados geneticamente, realiza muitas modificações pós-traducionais, além de serem mais fáceis e menos dispendiosos do que trabalhar com células de insetos ou de mamíferos. As duas espécies mais utilizadas são *Saccharomyces cerevisiae* e a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

A *S. cerevisiae* oferece certas vantagens em relação à produção em *E. coli* (GELLISON et al., 1992): possui longa história como microorganismo na indústria da fermentação, consegue secretar proteínas heterólogas para o meio extracelular quando sequências sinais adequadas são anexadas à composição dos genes estruturais e realiza glicosilação proteica. No entanto, a glicosilação por *S. cerevisiae* muitas vezes acontece de forma errônea em proteínas de mamíferos, devido à hiperglicosilação realizada apenas com resíduos de manose. A glicosilação é um fator importante, pois influencia na solubilidade, na estabilidade térmica, na sua atividade *in vivo*, na imunogenicidade e na ligação com seus receptores celulares (WAREEN, 1990).

As leveduras metilotróficas mostram-se como excelentes hospedeiros para expressão heteróloga, pois seus promotores gênicos estão dentre os mais fortes e os que são mais estreitamente regulados nas leveduras. O crescimento celular consegue atingir

uma alta densidade e o nível de expressão pode ser controlado pela simples manipulação do meio de cultivo, sendo a levedura mais utilizada a *Pichia pastoris* (GELLISON et al., 1992). Algumas vantagens são: a capacidade de realizar a formação de pontes dissulfeto, glicosila proteínas sem que haja hiperglicosilação, além de secretar proteínas para o meio extracelular o que facilita o processo de purificação posterior da proteína alvo (CHOI et al., 2003). Uma das desvantagens em se trabalhar com a *P. pastoris* é que determinada proteínas para que tenha seu folding correto necessita da adição de chaperonas, proteínas que auxiliam no enovelamento das mesmas que previnem a sua agregação (HAMILTON, 2006; DA SILVA e BORGES, 2011).

As células de inseto utilizadas para produção de proteínas são capazes de realizar modificações pós-traducionais mais complexas que as leveduras. Elas também possuem uma das melhores maquinarias para realização do *folding* de proteínas de mamíferos, sendo muito adequadas para sua produção de forma solúvel (AGATHOS, 1991).

O sistema baculovírus para expressão em células de insetos, é baseado na adição de genes exógenos no seu genoma no lugar de um gene não-essencial para a replicação, sob o comando de um forte promotor (MILLER, 1997; SMITH et al., 1983). Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*, são capazes de infectar uma gama de hospedeiros artrópodes, dentre eles insetos da ordem díptera, lepidóptera e himenóptera (HERNIOU et al., 2004).

Algumas vantagens desse sistema são: grande potencial para produção de proteínas heterólogas, em média de 10 a 100 mg de proteína por litro de cultura; realiza modificações pós-traducionais de maneira semelhante à que ocorre em células de mamíferos (CASTRO et al., 1999) e mostra-se capaz de acomodar genomas maiores que o próprio genoma selvagem, mais ou menos 100 kb de genes a mais (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

A expressão heteróloga em células de mamífero é muito utilizada para proteínas que requeiram modificações pós-traducionais (acetilação, metilação, fosforilação, sulfonação, glicosilação, etc) específicas de mamíferos, são também úteis para adição de cadeias de ácidos gordos (QIU, 1998). Este sistema de expressão começou a ser impulsionado na década de 70, o primeiro produto recombinante produzido em escala industrial em células de mamífero foi o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), proteína utilizada na solubilização de coágulos (WALSH, 2003).

Em 2006, a produção terapêutica utilizando o sistema de mamíferos alcançou a casa dos 20 bilhões (GRIFFIN et al., 2007). As células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) constituem o sistema mais usado para a produção de proteínas recombinantes, outros tipos de células incluem: células de mieloma murino, as células NS0 (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002), células de rim de macaco verde (WROTNOWSKI, 1998), linhagens de células humanas, tais como de rim de embrião humano (HEK), dentre outras. Algumas desvantagens desse sistema são: a secreção deficiente das proteínas, os processos de produção em mamíferos são caros, acrescentado a isto um custo enorme para conseguir a aprovação da FDA, incluindo a prova de desempenho consistente, a produção de um produto bioativo, e ausência de contaminação por vírus e DNA; ensaios clínicos e aprovação do produto recombinante requerem pelo menos de 4 a 5 anos, a um custo de 60 a 100 milhões de dólares além do processo de produção possuir um potencial para a contaminação do produto por vírus (BISBEE, 1993).

A escolha de um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes depende de muitos fatores, tais como crescimento celular, nível de expressão gênica, modificações pós-traducionais, atividade biológica da proteína de interesse, dentre outros (GOEDDEL, 1990; HODGSON, 1993).

Foi o primeiro hospedeiro utilizado para a expressão de genes recombinantes há quase 40 anos atrás (COHEN, 1973). Nos últimos 15 anos, o uso de *E. coli* como sistema de expressão manteve-se constante, tendo sido utilizado em aproximadamente 60% dos genes recombinantes desenvolvidos segundo pesquisa de periódicos indexados no PubMed. A situação ideal para a maioria dos fins de pesquisa e de produção em escala seria a obtenção da proteína recombinante expressa como produto solúvel e funcionalmente ativa e com alto rendimento (BANEYX, 1999; SØRENSEN e MORTENSEN, 2005).

E. coli oferece um meio para a produção rápida e econômica de proteínas recombinantes. Essas vantagens, juntamente com alto conhecimento da bioquímica e genética deste microrganismo, permitiram nos últimos anos, elevada produção de proteínas recombinantes produzidas neste sistema, o que ocasiona o desenvolvimento de estratégias para alcançar alto nível de expressão protéica, envolvendo aspectos como o design de vetores de expressão, a força do promotor (regulação da transcrição), estabilidade do mRNA, início e término da tradução, as considerações de host de design, codon usage e fatores de fermentação disponíveis para manipulação das

condições de expressão; estes apresentam-se como desafios para obtenção de alto rendimento proteico com custo otimizado (JANA e DEB, 2005).

Existem numerosos trabalhos com a obtenção da proteína alvo com diferenças significativas em termos de rendimento proteico, a depender de fatores variados como a proteína alvo, se ela está fusionada ou não, a temperatura de indução gênica, entre outros. O gene BbgIV, um derivado galactosídeo, foi produzido em *E. coli* DH5 α , em um biorreator, com um rendimento entre 71 e 75 mg por g de peso celular seco, o que representa 20 - 25% do total solúvel proteínas nas células (OSMAN, 2013); Lee et al. obtiveram 270 mg/L da proteína alvo ; Spiridonova et al. com 3 mg de IL6/L; em Lehmann et al, 2003, o rendimento médio de proteína de fusão recuperada foi de cerca de 46 mg /L de cultura; Trabbic-Carlson et al., em 2004, conseguiram rendimentos de 25–30 mg/L da proteína - elastin like polypeptides (ELPs); ainda Sivashanmugam et al., 2009, conseguiram um rendimento de aproximadamente 40 mg/L de cultura.

3.12 Uso preferencial de códons - *Codon usage*

Genes expressos tanto em sistemas procariontas como eucariontas apresentam uma utilização não-aleatória de códons sinônimos (GUTMAN e HATFIELD, 1989; GOUY e GAUTIER, 1982), cada organismo possui um uso preferencial de códons para a formação da proteína.

A análise sistemática dos padrões de uso de códons em *E. coli* levou a algumas observações: há uma tendência de uso de um ou dois códons para quase todas as famílias de códons degenerados; alguns códons são frequentemente utilizados em todos os genes, por exemplo, CCG é a codificação mais utilizada para síntese de prolina; genes com alta taxa de expressão apresentam um maior grau de preferência de códons do que os de baixa expressão; a frequência de uso de códons sinônimos geralmente reflete a abundância de seus respectivos tRNAs. Estas observações sugerem que genes heterólogos com códons que raramente são utilizados por *E. coli* podem não expressar proteínas de forma eficiente em *E. coli*. (IKEMURA, 1985; DE BOER e KASTELEIN, 1986).

Os níveis de expressão gênica dependem de alguns fatores, tais como as sequências dos genes promotores e dos elementos reguladores, porém um dos principais fatores é a adaptação dos códons do gene a ser produzido ao sistema de expressão escolhido para produção da proteína (LITHWICK e MARGALIT, 2003). No processo

de criação de uma sequência de ácido nucleico que vai ser inserido em um novo hospedeiro para expressar certa proteína em grandes quantidades, a otimização de códons com relação ao uso preferencial é geralmente um dos primeiros passos (VALLEJO e RINAS, 2004).

Um grande número de genes sintéticos têm sido re-projetados, ou otimizados para aumentar o seu nível de expressão (WU et al., 2007). A avaliação da utilização de códons nos genes de *E. coli* revela um certo número de códons que são raramente utilizados, dentre eles estão: AGA, AGG, CGA e CGG (Arg); AUA (Ile) ; CUA (Leu); CCC (pro); UCG (ser) (SHARP e DEVINE, 1989; NAKAMURA et al., 2000).

3.13 Proteínas de fusão

Uma grande variedade de proteínas de fusão tem sido desenvolvida de forma a simplificar a purificação e expressão de proteínas recombinantes (STEVENS, 2000). As proteínas de fusão ou proteínas quiméricas ligam-se às proteínas alvo por um sítio de reconhecimento de uma protease específica. A maioria das proteínas de fusão é explorada em estratégias de purificação por afinidade específicas, também são vantajosas para proteger as proteínas alvo contra proteólise intracelular (JACQUET et al., 1999; MARTINEZ et al., 1995) e aumentar a solubilidade (DAVIS et al., 1999; KAPUST e WAUGH, 1999; SØRENSEN, SPERLING-PETERSEN e MORTENSEN, 2003; AUSTIN et al., 2009). Marcadores de afinidade comuns são a marca de polihistidina (His-tag), que é compatível com a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) e a glutationa S-transferase tag (GST) para a purificação em resinas à base de glutationa (TERPE, 2003).

Proteínas de fusão de grande interesse com relação à otimização da produção de proteínas recombinantes incluem a proteína de ligação à maltose (MBP) com 40 kDa, atuando em parceria com a proteína de interesse e ajudando na solubilização do agregado proteico, sendo especialmente adequada para a expressão de proteínas que tendem a formar, em *E. coli*, corpúsculos de inclusão (KAPUST e WAUGH, 1999).

Tipicamente, é desejável separar a proteína recombinante da proteína de fusão, isto é conseguido através de proteólise sítio específica. Duas serina proteases presentes na cascata de coagulação do sangue em organismos eucarióticos, o factor Xa e trombina são amplamente utilizados na proteólise (JENNY et al., 2003). Embora estas enzimas sejam altamente eficientes para a clivagem da sequência no sítio específico, a proteólise

frequentemente ocorre em outros locais da proteína alvo, diminuindo o rendimento na obtenção da proteína alvo (WALKER et al., 1994).

4. REFERÊNCIAS

- AGATHOS, S.N. Production scale insect cell culture. **Biotechnol Adv**, 9: 51–68, 1991.
- ALMEIDA, V. M. A.; GONCALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet e Zoo**, 58(2): 141-148, 2006.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A.; RODRIGUEZ, S.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. **Veterinary Microbiology**, 121 : 344–351, 2007.
- ANDERSEN, D.C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Curr Opin Biotechnol**, 13: 117–123, 2002.
- AUSTIN, B.P.; NALLAMSETTY, S.; WAUGH, D. Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Methods Mol Biol**, 498:15, 2009.
- BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. **Nature**, 226(5252):1209-1211, 1970.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 10(5):411-421, 1999.
- BARROS, A.T.M.; FOIL, L.D. Influência da distância na transferência de tabanídeos (Diptera: Tabanidae) entre equínos. **Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal**, corumbá. resumos. corumbá: embrapa pantanal,p.155-156, 2000.
- BARROS, T.; FOIL, L. Seasonal occurrence and relative abundance of Tabanidae (Diptera) from the Pantanal region, Brazil. **Memoirs Entomology International**, Gainesville, 14: 387-396, 1999.
- BATISTA JÚNIOR, J. A.; FONSECA, V. O. Anemia Infecciosa Equina. **Arq. Esc. Vet.**, 23: 281-290,1971.
- BEBENEK, K.; KUNKEL, T.A. The fidelity of retroviral reverse transcriptases. In: Reverse transcriptase (ed. A.M. Skalka and S.P. Goff). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 85–102,1993.
- BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 2 ed. São Paulo: Editora Rocca, 1999.
- BERNE, M.E.A. Doenças Parasitárias. Parasitoses Gastrintestinais de Equínos. IN: RIET-CORREA. F., et al. Doenças de ruminantes e equinos. 2ªed, , São Paulo: Livraria Varela, 1: 49-55, 2001.
- BIRKETT, A.J.; YÉAMOS, B.; CRESPO, I. R.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning expression purification, and characterization of the major core protein (p26)

from equine infectious anemia virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1339: 62-72, 1997.

BISBEE, C.A. Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. **Gen Eng News**, 13: 8–10, 1993.

BOER, H. A., DE; KASTELEIN, R. A. Biased codon usage: an exploration of its role in optimization of translation. In: *From Gene to Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene Expression* (eds J. Davis, B. Reznikoff, and L. Gold). Butterworths, New York. (In press.), 1986.

BOTTON, S.A.; WEIBLEN, R. Doenças Víricas. Material didático: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- RS, 1995.

BOUILLANT, A.M.P.; NELSON, K.; RUCKERBAUER, C.M.; SAMAGH, B.S.; HARE W.C.D. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. **J Virol Methods**, 13: 309–321, 1986.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Portaria n° 200, de 18 de agosto de 1981.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Portaria n° 84, de 19 de outubro de 1992. Diário Oficial da União de 22/10/1992, Seção 1, Página 14874. 1992.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Instrução Normativa n° 45, de 15 de junho de 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, Instrução Normativa n° 15, 02.04.2008. Diário Oficial da União, n° 65, Seção 1, p. 2,04.04.2008.

BRINDLEY, M. A.; MAURY W. Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. **J. Virol.** 79:14482-14488, 2005.

BYRNE, R. J. Equine infectious anemia. *Md Vet.*, p.6-8, 1960. Resumo in *Progress equine practice. American Veterinary Publications*, 595, 1966.

CARVALHO, M.; DERSE, D. Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the equine infectious anemia virus promoter, **J. Virol.**, 67: 2064– 2074, 1993.

CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B.M. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 34:1733-176, 1999.

CAVALCANTE, P. H. 2009. Risco de transmissão do vírus da anemia infecciosa equina por equídeos errantes no Município de Mossoró – RN. Dissertação (mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró. 36p.

CHOI, B.K.; BOBROWICZ, P.; DAVIDSON, R.C.; HAMILTON, S.R.; KUNG, D.H.; LI, H.; MIELE, R.G.; NETT, J.H.; WILDT, S.; GERNGROSS, T.U. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100: 5022–5027, 2003.

CHOU, C.P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 76:521–32, 2007.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infectious. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.

CNA. Comissão Nacional de Equinocultura na Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/noticias/>. Acesso em: 18.02.2013

COFFIN, J. M. Retroviridae: the virus their of replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. Fields Virology, Philadelphia, Lippincoh-Raven, p.1767-1847, 1996.

COGGINS, L.; NORCROSS, N.L.; NUSBAUM S.R. Diagnosis of equine Infectious anaemia by immunodiffusion test. **Am. J. Vet. Res.**, 33: 11–18, 1972.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Vet.**,60(2): 330-335, 1970.

COGGINS, L., NORCROSS, N.L., KEMEN, M.J. The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. **Equine Infect. Dis.**, III, 177–186, 1973.

COHEN, S.N.; CHANG, A.C.; BOYER, H.W.; HELLING, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci**, 70(11):3240-3244, 1973.

COOK, R.F.; COOK, S.J.; BERGER, S.L.; LEROUX, C.; GHABRIAL, N.N.; GANTZ, M.; BOLIN, P.S.; MOUSEL, M.R.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. **Virology**, 313: 588-603, 2003.

COOK, R.F.; COOK, S.J.; LI, F.L.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). **Virol Methods**, 105: 171–179, 2002.

COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M.J. (Ed.), **Virus Infections of Equines**. Elsevier, Amsterdam, 297–323, 1996.

COUTINHO, L.C.A. 2011. Produção da proteína p26 do vírus da anemia infecciosa equina em levedura *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 96p.

CRAIGO, J.K.; LEROUX, C.; HOWE, L.; STECKBECK, J.D.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. **J Gen Virol**, 83: 1353-1359, 2002.

CRAIGO, J.K.; MONTELARO, R.C. Equine Infectious Anemia Virus (Retroviridae). In: **Encyclopedia of Virology**, 2: 167-174, 2008.

CRAWFORD, T.B.; WARDROP, K.J.; TORNQUIST, S.J.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; MCGUIRE, T.C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **J Virol.**, 70:7842–7850, 1996.

CUDMORE, S.; RECKMANN, I.; WAY, M. Viral manipulations of the actin cytoskeleton. **Trends in Microbiology**, 5, 142-148, 1997.

DA SILVA, K.P.; BORGES, J.C. The Molecular Chaperone Hsp70 Family Members Function by a Bidirectional Heterotropic Allosteric Mechanism. **Protein & Peptide Letters**, 18(2): 132-142, 2011.

DAVIS, G.D.; ELISEE, C.; NEWHAM, D.M.; HARRISON, R.G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.** 65: 382–388, 1999.

DEMAIN, A.L. The business of biotechnology. **Industrial biotechnology**, 3(3): 269-283, 2007.

DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, 27: 297–306, 2009.

DÖHNER, K.; NAGEL, C.H.; SODEIK, B. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. **Trends Microbiol.** Jul;13(7):320-327, 2005.

DUPONT, O. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 11. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1, 1968, Niterói. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 160-161, 1968.

ETTINGER, S. J; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Veterinária**. 4ª ed. Vol 1 e 2, São Paulo: 1997.

FENNER, F.J., et al. *Veterinary Virology*. 2ª ed. Academic Press, Inc. San Diego, p.666, 1993.

FIESHKO, J.C. In: Rehm, H.J.; Reed, G., editors. Fermentation technology using recombinant organisms. **Biotechnology Weinheim**, 117–140, 1989.

FIORILLO, K. S. Prevalência de anemia infecciosa equina em haras de Minas Gerais. 2011. Dissertação (Programa de Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

FISCHER, B.; SUMMER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. **Biotechnol Bioeng**, 41: 3-13, 1993.

FLORES, E.F. (Org.). Virologia Veterinária. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. Y.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). **American Journal of Veterinary Research**, 44: 155-156, 1983.

GELLISON, G.; JANOWICZ, Z.A.; WEYDEMANN, U.; MELBER, K.; STRASSER, A.W.M.; HOLLENBERG, C.P. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha* *Biotech Adv*, 10: 179–189, 1992.

GOEDDEL, D.V. Systems for heterologous gene expression. **Methods Enzymol**. 185: 3–7, 1990.

GOUY, M.; GAUTIER, C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. **Nucleic Acids Res**, 10: 7055-7074, 1982.

GREENE, W.C.; PETERLIN, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. **Nature Medicine**, 8: 673 – 680, 2002.

GRIFFIN, T.J.; SETH, G.; XIE, H.; BANDHAKAVI, S.; HU, W-S. Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. **Trends Biotechnol**, 25:401–408, 2007.

GUERREIRO, M.G.; BAUER, A. G.; GLOSS, R. M. et al. Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, 2: 3-4, 1968.

GUTMAN, G.A.; HATFIELD, G.W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86, 3699-3703, 1989.

HAMILTON, S.R.; BOBROWICZ, P.; BOBROWICZ, B.; DAVIDSON, R.C.; LI, H.; MITCHELL, T.; NETT, J.H.; RAUSCH, S.; STADHEIM, T.A.; WISCHNEWSKY, H.; WILDT, S.; GERNGROSS, T.U. Production of complex human glycoproteins in yeast. **Science**, 301: 1244–1246, 2006.

HAMMOND S.A.; LI, F.; MCKEON; B.M.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. **J Virol**, 74: 5968-5981, 2000.

HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; SOUZA, M.C.C.; GOTTI, T.; FERREIRA, F.; HOMEM, V.S.F.; FERREIRA NETO, J.S.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; CUNHA, E.M.S.; RICHTZENHAIN, J.L. Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos equinos e do aborto equino a vírus no município de Uruará, PA,

Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 39(1): 50-53, 2002.

HENDERSON, L.E.; SOWDER, R.C.; SMYTHERS, G.W.; OROSZLAN, S. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. **J. Virol.**, 61:1116–1124, 1987.

HERNIOU, E.A.; OLSZEWSKI, J.A.; O'-REILLY, D.R.; CORY, J.S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**, 78: 3244-3251, 2004.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. 2ªed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 424-425, 2003.

HODGSON, J. Expression systems: a user's guide. **Bio/Technology** 11:887–893, 1993.

HUSSAIN, K.A.; ISSEL, C.J.; RWAMBO, P.M.; ARNIZAUT, A.B.; BALL, J.M.; SCHMORR, K.L; MONTELARO, R.C. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26. **J. Gen. Virol.** 69: 1719–1724, 1988.

IKEMURA, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. **Mol Biol Evol.**, 2, 13-34, 1985.

ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; FOIL, L.D. Prospective study of the progeny of inapparent carriers of equine infectious anemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, 46: 1114-1116, 1985.

ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 174: 727–733, 1979.

JACQUET, A.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; CHAUDOIR, S.; BOLLEN, A.; BIEMANS, R. Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii*ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. **Protein Expr. Purif.**, 17: 392-400, 1999.

JANA, S.; DEB, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 67: 289-298, 2005.

JENNY, R.J.; MANN, K.G.; LUNDBLAD, R.L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Protein Expr Purif.**, 31: 1-11, 2003.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W.; *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2004.

KAPUST, R.B.; WAUGH, D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. **Protein Sci.** 8: 1668–1674, 1999.

KARAM, C.H.V.; ROLIM, M.F.; GRAÇA, F.A.Z.; ARAGÃO, A.P. Anemia infecciosa equina no estado do rio de janeiro: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

Revista Eletrônica Novo Enfoque, 9(9): 1-13, 2010.

KONEMAN, E. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. **Nat Inst Anim Hlth Quart**, 16: 8-15, 1976.

LAVALLIE, E.R.; DIBLASIO, E.A.; KOVACIC, S.; GRANT, K.L.; SCHENDEL, P.F.; MCCOY, J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Bio Technology**, 11: 187–193, 1993.

LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H.F.; DOBBELAERE, D.A.; PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **J Virol**, 71: 7488-7497, 1997.

LEHMANN, J., DA SILVA, J.R.; JP, STEINER C, et al. Nutrient availability and leaching in an archaeological anthrosol and a ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant Soil**, 343–357, 2003.

LEROUX, C.; CADORÉ J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, 35: 485-512, 2004.

LICHTENSTEIN, D.L.; CRAIGO, J.K.; LEROUX, C.; RUSHLOW, K.E.; COOK, R.F.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Effects of long terminal repeat sequence variation on equine infectious anemia virus replication in vitro and in vivo. **Virology**, 263: 408-417, 1999.

LICHTENSTEIN, D.L.; RUSHLOW, K.E.; COOK, R.F.; RAABE, M.L.; SWARDSON, C.J.; KOCIBA, G.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity, **J. Virol.**, 69:2881–2888, 1995.

LIGNÉ, M. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydroémie, cachexie acquise Du cheval, **Rev Med Vet Ec Alfort.**, 30–44, 1843.

LIM, W.S.; PAYNE, S.L.; EDWARDS, J.F.; KIM, I.; BALL, J.M. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. **Virology**, 332: 295-306, 2005.

LITHWICK, G.; MARGALIT, H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. **Genome Res.**, 13:2665–2673, 2003.

MAKRIDES SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol Rev.**, 60(3): 512-538, 1996.

MALMQUIST, W.A.; BARNETT, D.; BECVAR, C.S. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. **Arch Gesamte Virusforsch.**, 42: 361–370, 1973.

MANENTE, B. Comunicação Pessoal. In: Reunião Anual de Medicina Veterinária, 08. São Paulo, 1952.

MARTINEZ, A.; KNAPPSKOG, P.M.; OLAFSDOTTIR, S.; DOSKELAND, A.P.; EIKEN, H.G.; SVEBAK, R.M.; BOZZINI, M.; APOLD, J.; FLATMARK, T. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. **Biochem. J.** 306: 589–597, 1995.

MAURY, W.; THOMPSON, R.J.; JONES, Q.; BRADLEY, S.; DENKE, T.; BACCAM, P.; SMAZIK, M.; OAKS, J.L. Evolution of the equine infectious anemia virus long terminal repeat during the alteration of cell tropism. **J Virol.**, 79 (9): 5653-5664, 2005.

MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus, **J Virol.**, 68: 6270–6279, 1994.

MAURY, W.; PERRYMAN, S.; OAKS, J.L.; SEID, B.K.; CRAWFORD, T.; MCGUIRE, T.; CARPENTER, S. Localized sequence heterogeneity in the long terminal repeats of in vivo isolates of equine infectious anemia virus. **J Virol.**, 71: 4929-4937, 1997.

MAURY, W.J.; CARPENTER, S.; GRAVES, K.; CHESEBRO, B. Cellular and viral specificity of equine infectious anemia virus Tat transactivation. **Virology**, 200:632-642, 1994.

MCCLURE J.J., LINDSAY W.A., TAYLOR W., OCHOA R., ISSEL C.J., COULTER S.J. Ataxia in four horses with equine infectious anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 180 (3): 279-283, 1982.

MCILWRAITH, C.W.; KITCHEN, D. N. Neurologic signs and neuropathology associated with a case of equine infectious anemia. **The Cornell Veterinarian**, 68: 238–249, 1978.

MILLER, L.K. The baculoviroses. New York; Plenum Press, 447, 1997.

MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K. Equine retroviruses. In: **The Retroviridae**, 257-360, 1993.

MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. **Journal of Biological Chemistry**, 259: 10539-10544, 1984.

MURPHY F.A., et al. *Veterinary Virology*. 3rd Academic Press, Inc. San Diego, p.629, 1999.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses, **Retroviridae Springer-Verlag**, 1994.

NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, 94: 97–109, 2001.

NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Gag genomic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada: implication on EIA diagnosis and peptide-based vaccine development. **Virus Res.**, 129: 228–235, 2007.

NAKAMURA, Y.; GOJOBORI, T.; IKEMURA, T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. **Nucleic Acids Res**, 29: 292, 2000.

NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV). **Virology**, 184 (1): 55-66, 1991.

NOCITI, D.L.P.; SENNA, D.; REGO, C.L. P.; HOFMEISTER, K. S.; MUTZENBERG, E. R.; NOCITI, R. P. Anemia Infecçiosa Equina em Equídeos de tração no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, p. 165-167, 2007.

OIE 2013. Listed diseases, infections and infestations in force in 2013. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013>

OIE, 2008. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. p.866-870 (Chapter 2.5.6).http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf.

OIE, 2012. World Organization for Animal Health Terrestrial Animal Health. Code Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed disease (Chapter 1.3). http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.1.3.htm

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. New York, Oxford University Press, 1994.

OSMAN A, TZORTZIS G, RASTALL RA, CHARALAMPOPOULOS D. High Yield Production of a Soluble Bifidobacterial β -Galactosidase (BbgIV) in E. coli DH5 α with Improved Catalytic Efficiency for the Synthesis of Prebiotic Galactooligosaccharides. **J Agric Food Chem.**, 2013 Feb 20. [Epub ahead of print]

OVERBAUGH, J. & BANGHAM, C. R. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**, 292: 1106–1109, 2001.

PALOMBA, E.; MARTONE, F.; MEDURI, A.; VACCARO, A.; DAMIANI, N. Folia Veterinaria Latina, Milano, 6 (3): 275-288, 1976.

PAYNE, S.L.; PEI, X-F.; JIA, B.; FAGERNESS, A.; FULLER, F.J. Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia 2004. PAYNE, S.L.; LA CELLE, K.; PEI, X.F.; QI, X.M.; SHAO, H.; STEAGALL, W.K.; PERRY, S.; FULLER, F. Long terminal repeat sequences of equine infectious anaemia virus are a major determinant of cell tropism. **J. Gen. Virol.**, 80 (3):755-759, 1999.

PIZA, A.S.T.; PEREIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. **Preventive Veterinary Medicine**, 78: 239-245, 2007.

PLOUBIDOU A, WAY M. Viral transport and the cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol.**, 13(1): 97-105, 2001.

QIU, J. Protein expression systems. **Gen Eng News**, 18: 17–40,1998.

RADER, R.A. Expression systems for process and product improvement. **BioProcess Int**, 6 (Suppl 4), 4–9, 2008.

REIS, J.K.P., LEITE, R.C.,. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. **Prev Vet Med.**, 20: 261–267, 1994.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; LEMOS R.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo, Varela, 2003.

SALINOVICH, O., PAYNE, S. L., MONTELARO, R. C., HUSSAIN, K. A., ISSEL, C. J. & SCHNORR, K. L. Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine infectious anemia virus during persistent infection. **Journal of Virology**, 57: 71-80, 1986.

SANTOS, E.M.; MOTTA, P.M.C.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.63 n° 2, Belo Horizonte Apr., 2011.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 65(4): 363-72, 2004.

SELLON, D.C.; RUSSELL, K.E.; MONROE, V.L.; WALKER, K.M. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. **Res Vet Sci**, 66: 77-80, 1999.

SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSEL, K. E. Equine Infectious Anemia Virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. **J Virol.**, 70: 590-594, 1996.

SELLON, D.C.; PERRY, S.T.; COGGINS, L.; FULLER, F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. **J Virol.**, 66: 5906–5913, 1992.

SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. **J Clin Microbiol.**, 19: 351–355, 1984.

SHARP, P.M.; DEVINE, K.M. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do 'prefer' optimal codons. **Nucleic Acids Res**, 17: 5029–5039, 1989.

SILVA, R. A. et al.; Ocorrência da anemia infecciosa no Estado do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1. Niterói, 1968. Anais... Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 173-182, 1968.

SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, **Prevenção e Controle no Pantanal**. Circular Técnica nº 29. Embrapa pantanal, 2001.

SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P.; DÁVILA, A.M.R.; RAMIREZ, L. Swamp Fever in wild horses from the Pantanal, Brazil. *Revue D'Élevage et Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, Paris, 52: 99-101, 1999b.

SILVA, R.A.M.S.; DÁVILA, A.M.R.; IVERSSON, ABREU, U.G.P. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil. Studies carried out from 1990 to 1995. **Revue D'Élevage et Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, 52: 9-12, 1999a.

SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight protein. **J Gen Virol**, 45:215-225, 1983.

SMITH, G.A.; ENQUIST, L.W. Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, 18:135-161, 2002.

SODEIK B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. **Trends Microbiol.**, 8(10): 465-472, 2000.

SØRENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, 115(2):113-128, 2005.

SØRENSEN, H.P.; SPERLING-PETERSEN, H.U.; MORTENSEN, K.K. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. **Protein Expr. Purif.**, 32: 252–259, 2003.

SPIRIDONOVA, V.A.; LYGINA, A.S.; ANOHINA, M.M.; TUPITSYN, N.N. Preparation of functionally active recombinant human interleukin-6. **Biochemistry Moscow**, 72: 424–429, 2007.

STEVENS, R.C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. **Struct Fold Des.**, 8: 177–185, 2000.

SUZUKI, T.; UEDA, S.; SAMEJINA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. **Vet. Microbiol.**, 7: 307–316, 1982.

SWARTZ, J. R. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C. 1693-1711, 1996.

TELESNITSKY, A.; GOFF, S.P. RNase H domain mutations affect the interaction between Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and its primer-template. 1993.

TEMIN, H.M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. **Nature**, 226(5252): 1211-1213, 1970.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72: 211–223, 2006.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 60: 523–533, 2003.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8 ed. Cornell University Press. Ithaca., p. 951, 1988.

TORNQUIST, S.J.; CRAWFORD, T.B. Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. **Blood**, 90: 2357-2363, 1997.

TRABBIC-CARLSON, K., MEYER, D.E., LIU, L., PIERVINCENZI, R., NATH, N., LABEAN, T., AND CHILKOTI, A. Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: A role for surface hydrophobicity? **Protein Eng Des Sel.**, 17: 57–66, 2004.

TRAUB-DARGATZ, D.C. Equine Infectious Anemia. In: Sellon, D.C. The Veterinary Clinics of North America- Equine Practice. 1ed. W.B. **Saunders Company Philadelphia**, 321-336, 1993.

TUMAS, D.B., et al. Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses, **J Gen Virol.**,75: 959-968, 1994.

VALLÉ, H.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. **Compt. Rend. Acad. Sci.**, 139: 1239, 1904.

VALLEJO, L.F.; RINAS, U. **Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact*, 3: 11, 2004.**

virus. **J. Virol.** 78, 2478.

WALKER, P.A.; LEONG, L.E.; NG, P.W.; TAN, S.H.; WALLER, S.; MURPHY, D.; PORTER, A.G. Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. **Biotechnology**, 12: 601–605, 1994.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. **Nature Biotechnology**, 21(8): 865-870, 2003.

WARREN, C.E. Glycosylation-considerations for protein engineering. *Biofutur Eur*, 7: 392–394, 1990.

WEIBLEN, R. **Anemia Infeciosa Equina**. In: RIET-CORREA, F. et al. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Santa Maria: Pallotti, 62-71, 2007.

WEIBLEN, R. *Doenças Víricas. Anemia Infeciosa Equina*. IN: RIET-CORREA F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A. *Doenças de Ruminantes e equinos*. 2 ed. São Paulo: Editora Varela. Vol.1, p.49-55, 2001.

WEILAND, F.; MATHEKA, H.D.; BOHM, H.O. Equine infectious anaemia: detection of antibodies using an immunofluorescence test. **Res. Vet. Sci.**, 33: 347–350, 1982.

WONG, M.S.; WU, S.; CAUSEY, T.B.; BENNETT, G.N.; SAN, K-Y. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. **Metab Eng**, 10: 97-108, 2008.

WROTNOWSKI, C. Animal cell culture; novel systems for research and production. **Gen Eng News**, 18 (3): 13–37, 1998.

WU,G.; ZHENG, Y.;QURESHI, I.; ZIN, H.TH.; BECK, T.; BULKA, B.; FREELAND, S.J. SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. **Nucleic Acids Res**. January; 35(Database issue): D76–D79, 2007.

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J.; LI, F.; MONTELARO, R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102: 9918–9923, 2005.

5- ARTIGO

Expressão do gene sintético códon-otimizado da proteína p26 do vírus da anemia infecciosa equina em *Escherichia coli*.

Karin Florencio Lins de Paiva Fontes¹, Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho¹, André Luiz Santos de Jesus², Felipe Colaço Mariz², Antonio Carlos de Freitas², Rita de Cássia Carvalho Maia¹, Roberto Soares de Castro¹.

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE, Brasil.

²Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Roberto Soares de Castro

UFRPE: Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Fone: (55)(81) 33206426

E-mail: rscastro@dmv.ufrpe.br

Expressão do gene sintético códon-otimizado da proteína p26 de anemia infecciosa equina em *Escherichia coli*

(Expression of p26 protein synthetic gene codon optimized of equine infectious anemia virus in *Escherichia coli*)

Karin Florencio Lins de Paiva Fontes¹, André Luiz Santos de Jesus², Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho¹, Filipe Colaço Mariz², Antonio Carlos de Freitas², Rita de Cássia Carvalho Maia¹, Roberto Soares de Castro¹.

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE, Brasil.

²Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE, Brasil.

Abstract

Equine Infectious Anemia (EIA) considered one of the most important viruses in horses in the world, is caused by a lentivirus of the *Retroviridae* family. It is a chronic infection without treatment, mainly prevalent in regions with hot and humid climate, favorable for transmission by blood-sucking insects. According to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), the restriction of the transit and slaughter of infected animals are the strategies for the control of EIA in Brazil, which causes losses in equine breeding. The official diagnosis of the disease is carried out by detection of circulating antibodies by Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and ELISA. The p26 protein from EIAV is highly conserved and used in most diagnostic tests, since it induces a strong humoral response. The aim of this work was the production of a p26 recombinant protein in *Escherichia coli* for use in serologic tests. The p26 gene sequence was optimized with respect to *E. coli* codon usage, in order to maximize protein production, and was added with a marker sequence of six histidine residues (6xHis-tag) for later protein detection and purification. The sequence was synthesized and cloned downstream of the gene of a maltose binding protein (MBP2*) on the pMAL-c4X expression vector. The *E. coli* gene induction was performed by Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside and the resulting protein (MBP2*.p26mod) was detected by SDS-PAGE gel and Western blot with monoclonal anti-HIS. The MBP2*.p26mod was visualized as a 68.5 kDa band, the recombinant fusion protein was cleaved with factor Xa resulting in two bands of 42.5 and 26 KDa, corresponding to MBP2* and p26mod respectively. The MBP2*.p26mod Purification was performed by affinity

chromatography by nickel resin and yielded 78.12 mg/L of bacterial culture. The MBP2*.p26mod protein was intensely Immunoreactive at AGID test where precipitation lines were observed only among the positive sera, including reference OIE serum, and the protein MBP2*.p26mod, showing high analytical sensitivity and specificity of the recombinant protein.

Keywords: Heterologous expression system, recombinant antigen, core protein, horse industry.

Resumo

A Anemia Infecciosa Equina (AIE), considerada uma das viroses mais importantes em equinos no mundo, é causada por um lentivírus da família *Retroviridae*. É uma infecção crônica, sem tratamento, prevalente principalmente em regiões de clima quente e úmido, favorável à transmissão por insetos hematófagos. Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), a restrição do trânsito e abate de animais infectados são as estratégias para o controle da AIE no Brasil, o que ocasiona perdas na equinocultura. O diagnóstico oficial da doença é realizado pela detecção de anticorpos circulantes através da imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e de ELISA. A proteína p26 do vírus da AIE é altamente conservada e utilizada na maioria dos testes de diagnóstico, uma vez que induz uma forte resposta humoral. O objetivo com este trabalho foi a produção de uma proteína p26 recombinante em *Escherichia coli* para uso em testes diagnóstico sorológico. A sequência do gene p26 foi otimizada com relação aos códons preferenciais e ao conteúdo GC para uso em *E. coli*, a fim de maximizar a produção de proteínas, e foi adicionado à sequência um marcador de seis resíduos de histidina (6xHis-tag) para posterior detecção e purificação protéica. A sequência foi sintetizada e clonada a jusante do gene de uma proteína ligante de maltose (MBP2*) no vetor de expressão pMAL-c4X. A indução gênica da *E. coli* transformada foi realizada com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo e a proteína resultante (MBP2*.p26mod) foi detectada por SDS-PAGE em gel e Western blot com anticorpo monoclonal anti-HIS. A MBP2*.p26mod foi visualizada como uma banda de 68,5 kDa, a qual foi clivada com fator Xa resultando em duas bandas de 42,5 e 26 kDa, correspondentes à MBP2* e à p26mod respectivamente. A purificação MBP2*.p26mod foi realizada por cromatografia de afinidade com resina de níquel e foi obtido um rendimento de 78,12

mg/L de cultura bacteriana. A proteína MBP2*.p26mod foi intensamente imunoreativa no teste de IDGA, onde foram observadas linhas de precipitação únicas entre os soros positivos, inclusive o soro de referência OIE, e a proteína MBP2*.p26mod, demonstrando altas especificidade e sensibilidade analíticas da proteína recombinante.

Palavras-chave: Sistema de expressão heterólogo, antígeno recombinante, proteína nuclear, equideocultura.

1. Introdução

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma virose caracterizada por anemia hemolítica do tipo imune em equídeos. Segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2012) o vírus da AIE (VAIE) está classificado como *Equine infectious anemia vírus*, gênero *Lentivirus*, Subfamília *Orthoretrovirinae*, Família *Retroviridae*. O VAIE compartilha características morfológicas, antigênicas e genéticas com outros retrovírus, como os vírus da imunodeficiência humana, bovina e felina (LEROUX et al., 2004; WEIBLEN, 2007).

A AIE tem distribuição mundial e faz parte da Lista de Doenças da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (OIE, 2013). A principal forma de transmissão do VAIE ocorre por insetos hematófagos, mas podem ocorrer ainda de maneira iatrogênica, transplacentária, e via colostro e sêmen (MURPHY et al., 1999; TIMONEY et al., 1988). Esta enfermidade constitui em grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, acarretando prejuízos aos criadores, além de dificultar o acesso ao mercado internacional. No Brasil, a infecção pelo VAIE apresenta prevalências variadas, chegando a mais de 50% no Brasil Central, Roraima e Minas Gerais (ALMEIDA et al., 2006).

O vírus da AIE tem basicamente a mesma composição genética de outros lentivírus, com os genes gag, env e pol. O gene gag codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9; o gene pol codifica a transcriptase reversa, integrase e protease; e o gene env codifica as glicoproteínas gp90 (superfície externa) e gp45 (transmembrana). O gene regulador tat controla a transcrição viral e o rev, o transporte e tradução do RNA; vif e vpu regulam a produção das partículas virais infecciosas; e vpr e nef estão envolvidos nas manifestações clínicas da doença (CLEMENTS e ZINK, 1996; LEROUX, 2004). As elevadas taxas de mutações nos genomas dos lentivirus permitem seu escape ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas (LEROUX, 2004).

Os primeiros e predominantes anticorpos produzidos por um animal infectado pelo VAIE são contra a glicoproteína gp90, detectáveis entre sete e 10 dias após a infecção. Porém, como as mutações relacionadas com esta proteína são frequentes e determinantes ao escape viral (MONTELARO et al., 1984), muitos testes não a utilizam para o diagnóstico da AIE. O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína p26 (principal proteína nuclear viral), observados entre 10 e 14 dias após a

infecção, atingindo pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90 (MONTELARO et al., 1993).

Os testes sorológicos mais empregados no diagnóstico da AIE são a imunodifusão em gel de agar (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Embora os ELISA detectem anticorpos mais precocemente e em títulos mais baixos do que a IDGA, os resultados positivos nos ELISA devem ser confirmados na IDGA, pois resultados falso-positivos têm sido registrados nos ELISA. Além disso, como a leitura da IDGA é feita com base na comparação das linhas de identidade do soro teste com um soro controle positivo, apresenta a vantagem de poder distinguir as reações inespecíficas das específicas (OIE, 2012). Por isto, a IDGA é recomendada como teste oficial para trânsito internacional de equídeos e ELISA como teste alternativo (OIE, 2012). No Brasil o teste oficial para diagnóstico da AIE é a IDGA (BRASIL, 2004).

Devido a sua sequência gênica ser conservada, a p26 é a proteína mais utilizada para a realização dos testes sorológicos, que pode ser obtida a partir do VAIE multiplicado em cultivo celular (COGGINS et al., 1973; MALMQUIST et al., 1973; BOUILLANT et al., 1986) ou como antígenos recombinantes (BIRKETT et al., 1997; ALVAREZ et al, 2007; PIZA et al., 2007). Os antígenos produzidos para o diagnóstico da AIE no Brasil são obtidos por purificação de partículas virais de culturas celulares infectadas com o VAIE, constituindo-se de técnica dispendiosa e de baixo rendimento.

Com os avanços da engenharia genética a produção de proteínas recombinantes em diversos sistemas de expressão eucariotos e procariotos vem sendo empregada de forma eficiente e econômica para diversas finalidades. Dentre eles o mais utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, que apresenta várias vantagens: rápida expressão, alto rendimento, fácil cultivo e manipulação genética, e baixo custo para produção (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Entretanto, algumas proteínas não são expressas nesse sistema, são expressas fragmentadas, insolúveis ou pouco solúveis, ou são expressas em altos níveis, porém inativas devido à formação de corpúsculos de inclusão (TERPE, 2006; DEMAIN e VAISHNAV, 2009; PACHECO et al., 2012). Parte desses problemas é resultado da incompatibilidade entre os códons da sequência a ser clonada e os códons preferenciais do genoma da *E. coli* (TERPE, 2006). Atualmente, com as facilidades da bioinformática e da síntese de genes é possível a otimização de códons da sequência gênica alvo através da substituição de códons raros, de modo a aumentar a produção proteica sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína codificada (WU et al., 2007)

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aprimorar a produção da proteína p26 do VAIE em *E. coli* através da clonagem de gene sintético códon otimizado para utilização no diagnóstico sorológico da AIE.

2. Material e métodos

2.1. Síntese do gene p26 códon-otimizado para expressão em *E. coli*

A sequência do gene p26 do VAIE foi desenhada de forma a otimizar os códons preferenciais utilizados por *E.coli* e seu conteúdo GC, teve ainda um acréscimo de um resíduo de seis histidinas (6HIS-tag) na porção C-terminal para posterior detecção e purificação, A sequência do gene selvagem utilizada para otimização foi a da cepa viral Wyoming (GeneBank – N° de acesso NC_001450). O gene foi sintetizado e clonado no plasmídeo pBluescript II SK(-), gerando o plasmídeo pBSKp26 EIAV.*E.coli*, pela Epoch Biolabs (Texas, EUA);

2.2. Construção do cassete de expressão

O plasmídeo pBSKp26 EIAV.*E.coli* foi adaptado para uso no vetor pMALTM-c4X da New England Biolabs®, pela inversão dos sítios das enzimas de restrição que flaqueavam a sequência gênica otimizada, através da técnica de PCR, ficando na ordem EcoR I e BamH I. As reações foram realizadas com polimerase de alta fidelidade (FideliTaqTM DNA Polymerase, USB®). O volume total de reação foi de 50 µl, contendo 1 µL (200 ng) de DNA extraído do plasmídeo pBSKp26 AIEV.*E.coli*, 250 µM da mistura de dNTPs (desoxirribonucleotídeos), 0,1 µM de primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl e 1,5 mM de MgCl₂. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 64,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1% e um fragmento de tamanho aproximado de 750 pb foi visualizado.

Para realização do ensaio de ligação do fragmento obtido por PCR com o vetor de expressão, o vetor pMAL-C4X® New England Biolabs® teve que ser previamente digerido com as enzimas EcoR I e BamH I (PROMEGA®); a reação foi realizada utilizando-se 4 µl do vetor (2 µg), 1 µl de cada enzima, 1 µl de seus respectivos

tampões, 0,2 µl de albumina sérica bovina (BSA) e 14 µl H₂O, a reação foi colocada em bloco térmico a 37° C por 8 horas. A reação foi purificada com QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). O vetor digerido foi utilizado para o ensaio de ligação, utilizando 5 µl do fragmento do gene da proteína p26 obtido por PCR (+- 190 ng), 2 µl do vetor pMAL-C4X® digerido (+- 100 ng), 1 µl de enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), 2 µl do tampão da ligase e 5 µl de H₂O, a reação foi colocada em bloco térmico a 4° C por 16 horas. Para o ensaio de transformação foram utilizados 10 µl da reação de ligação em 50 µl de células competentes *E.coli* DH5-α, a reação foi incubada por 30 minutos em banho de gelo com posterior choque térmico a 42°C por 5 minutos. Após 1 minuto no gelo foi acrescentado 950 µl de meio LB para recuperação das células por 1 hora a 37°C. As células assim transformadas foram posteriormente semeadas em placas de meio de cultura sólido Luria-Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5%; Peptona de caseína 1%; NaCl 1%; Água destilada, Ágar 2%) acrescido de ampicilina 50 mg/ml e deixadas a 37°C, por 16 horas para crescimento dos transformantes. As colônias que se mostraram resistentes ao antibiótico caracterizaram os possíveis clones.

2.3 Análise das colônias transformantes

Foram escolhidas 30 colônias transformantes para extração do DNA plasmidial, conforme protocolo de Sambrook (1989). Os recombinantes foram analisados quanto à presença da construção pMAL-c4X.p26mod através de digestão enzimática com as enzimas *EcoR I* e *BamH I*. Das colônias transformantes que liberaram um fragmento de aproximadamente 750 pb foram escolhidas duas para sequenciamento, o qual foi realizado com o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1. As sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade e montadas utilizando o pacote Staden (STADEN, 1994). A identidade das sequências foi determinada utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). O alinhamento de sequências múltiplas foi realizado utilizando o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994).

2.4 Transformação, cultivo e indução dos clones selecionados

A partir do resultado do sequenciamento, dois clones (5 e 17) transformados com a construção pMAL-c4X.p26mod foram utilizados para transformar células de *E.coli* BL-21 Star (INVITROGEN) mais indicadas para experimentos de produção

protéica que as da linhagem DH5- α . As colônias recombinantes foram selecionadas através da marca de seleção de resistência à ampicilina e estriadas em placa com meio sólido LB acrescido de ampicilina 50 mg/ml (LB amp).

Para a indução foi utilizada uma colônia de cada clone em um pré-inóculo de 2 ml de meio LB amp, sob agitação de 150 rpm, a 37°C por 16 horas. Deste material foram retirados 100 μ l e adicionados a 2 ml de meio LB amp, após duas horas de crescimento foi adicionado IPTG na concentração 0,1 Mm, a 25°C por 4 horas. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 5 minutos. O pellet foi ressuscitado em 80 μ l de tampão de corrida laemmli 2x (LAEMMLI, 1970) e usadas em gel SDS-PAGE para verificação da expressão gênica.

2.5 SDS-PAGE e Western blot

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com o método de O'Farrell (1975). As amostras protéicas foram acrescidas de tampão de amostra Laemmly 2X (0,125 mM tampão tris-HCl, pH 6,7; 3% SDS, glicerol 20% e 2-mercaptoetanol 30%). As amostras foram então fervidas por 8 minutos e então aplicadas no gel. O gel de empilhamento foi de acrilamida a 4% e o gel de corrida a 15%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Para o Western blot, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com leite em pó desnatado a 5%, durante 1 hora, em Tampão PBS pH 7.6. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-HIS na diluição de 1:10.000 em PBS, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) durante 1 hora, lavada com PBS-Tween por 10 minutos por 3 vezes, seguido da adição do substrato quimioluminescente VISIGLO HRP PLUS e revelação da reação com Hiperfilme fotográfico com exposição do cassete de revelação durante 5 minutos.

2.6 Purificação da MBP2*.p26mod

Confirmada a expressão gênica, foi feita nova indução em 500 ml de meio LB amp com o clone 5, que demonstrou bandas um pouco mais intensas que às do clone 17. Para o ensaio foi feito um pré-inóculo de 20 mL, que ficou sob agitação de 150 rpm, à 37° C durante 16 horas; a seguir todo o volume do pré-inóculo foi adicionado à 480 mL de meio LB com ampicilina 50 mg/mL, o qual foi deixado novamente sob as mesmas

condições de crescimento até atingir uma densidade ótica (D.O.) de 0.5, para indução do gene foi utilizado o Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) numa concentração final de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 4 horas a 25° C. O cultivo foi centrifugado a 5.500 g durante 20 minutos à 4°C, o pellet foi ressuscitado em 25 mL do tampão de coluna, segundo protocolo do manual do kit pMAL™ Protein Fusion and Purification System. A amostra foi então sonicada por seis ciclos de 30 segundos com intervalos no gelo de 1 minuto, seguido da adição de 200 μL de Triton X-100™ (SIGMA). A seguir houve uma nova centrifugação a 11.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então utilizado na cromatografia de afinidade.

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade utilizando resina de Níquel (Ni) adicionada de Ácido Nitrilo-Tri-Acético (NTA) do kit QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System (QIAGEN). O sobrenadante foi incubado em resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN) durante uma hora em câmara fria sob agitação orbital. Foram utilizados 300 μL da resina lavada duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) em tubo falcon 50 mL. A amostra foi centrifugada a 5.500 g por 1 minuto à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 1 mL de PBS gelado e transferido para microtubo de 1,5 mL. A resina então foi lavada 3 vezes com 1 mL de PBS centrifugando à 5.500 g por 1 minuto a 4°C. Seguindo-se novo ciclo de três lavagens com tampão de lavagem (manual QIAexpress® Detection and Assay Handbook (Quiagen®) com igual centrifugação anterior. Foram realizados três ciclos de eluição por incubação com 500 μL do tampão indicado pelo fabricante, sob agitação orbital durante 1 hora a 4°C, seguida do mesmo esquema de centrifugação anterior. Os eluatos, contendo a MBP2*.p26mod purificada, foram corridos em gel SDS-PAGE e corados por Azul de Coomassie (Sigma®).

2.7 Clivagem da MBP2*.p26mod

A clivagem da proteína MBP2*.p26mod foi realizada utilizando o fator Xa (New England Biolabs®) como protease, na proporção de 1% w/w, de Fator Xa / proteína recombinante. A reação foi realizada em câmara fria a 4°C com agitação orbital por 72 horas. As digestões foram verificadas em gel de poliacrilamida 12,5% e as proteínas coradas por Azul de Coomassie (Sigma®).

2.8 Imunodifusão em gel de Agar com a MBP2*.p26mod

A MBP2*.p26mod purificada por cromatografia em resina de níquel foi utilizada em teste IDGA, na concentração de 2 unidades precipitantes (diluição em PBS), frente ao soro de referência da OIE, soros de dois kits comerciais (Laboratório Bruch, Brasil e Ourofino - VMRD, USA) e soro controle positivo, constituído por imunoglobulinas de equinos naturalmente infectados pelo VAIE precipitadas pelo ácido caprílico (SANTOS et al., 1989). O teste foi realizado conforme a Portaria 84/1992 do MAPA (BRASIL, 1992).

3. Resultados

A PCR para mudança na ordem dos sítios de restrição da sequência do gene da proteína p26 resultou em fragmento de aproximadamente 750 pb (figura 1A). Após a clonagem, a análise das colônias recombinantes realizada por digestão do DNA plasmidial extraído dos clones 5 e 17 (transformados com a construção pMAL-c4X.p26mod) com as enzimas de restrição *EcoR I* e *BamH I* resultou na liberação do inserto, correspondente a uma banda de aproximadamente 750 pb (figura 1B). O Sequenciamento do DNA plasmidial recombinante (pMAL-c4X.p26mod) presente nos clones revelou 100% de similaridade com a sequência otimizada do gene da proteína p26.

A análise da proteína de fusão MBP2*.p26mod realizada através de gel SDS-PAGE de cinco réplicas dos clones 5 e 17 usados na indução, revelou a presença de bandas de 68,5 kDa, exceto no controle negativo (figura 2). No ensaio de *Western blot* essas bandas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-HIS, cuja sequência foi inserida na sequência do gene sintético (figura 3).

No SDS-PAGE (figura 4) foram observadas bandas com cerca 68,5 kDa, correspondentes à proteína de fusão MBP2*.p26mod. O extrato bruto e os eluatos da resina de níquel apresentaram bandas de forte intensidade (linhas 1, 3 e 4), Observou-se, ainda, bandas correspondentes a proteína não adsorvida na resina (linha 2) e não aderida à resina após a eluição (linha 5). A quantificação da proteína purificada pela resina de níquel demonstrou rendimento de 78,12 mg/L de cultura. A clivagem da proteína de fusão MBP2*.p26mod do eluato apresentou em gel SDS-PAGE duas bandas mais

intensas correspondentes às proteínas p26mod com 26 kDa separada da MBP* com 42,5 kDa (figura 5).

A proteína MBP2*.p26mod se mostrou solúvel em PBS e ao teste de IDGA apresentou linhas de precipitação únicas frente aos soros positivos (figura 6). A reação com o soro de referência da OIE foi caracterizada por uma ligeira curvatura da linha, correspondente a uma reação fraco-positiva; já a reação com os soros comerciais e com o controle positivo foram intensas, correspondentes a reações forte-positivas.

4. Discussão

A construção pMAL-c4X.p26mod, contendo gene sintético da proteína p26 do VAIE códon otimizado, foi utilizada para transformação de células de *E. coli*, linhagem BL-21. A *E. coli* foi o primeiro microorganismo utilizado para a expressão de genes recombinantes há quase 40 anos (COHEN et al., 1973). As proteínas recombinantes em uma situação ideal a maioria das pesquisas científicas e para produção em escala industrial devem ser produzidas em sua forma solúvel e biologicamente ativa, de preferência com alta taxa de rendimento (SØRENSEN e MORTENSEN, 2005). Proteínas eucariotas são propensas à formação de corpúsculos de inclusão e a apresentarem baixos rendimentos. As vantagens do uso do sistema de expressão heterólogo *E. coli* são o vasto conhecimento da sua genética e fisiologia, grande quantidade de vetores de clonagem e de expressão gênica, fácil cultivo e crescimento, além de elevadas taxas de produção proteica, o que pode ser explicado pelo fato da taxa de tradução do gene em *E. coli* ser de 4 a 10 vezes maior que em sistemas eucariotos (WIDMANN e CHRISTEN, 2000). Uma das desvantagens do uso da *E. coli*, bem como de qualquer outro sistema procarioto de expressão, é o fato de não serem feitas modificações pós-traducionais (fosforilação, acetilação, metilação e formação de pontes dissulfeto) nas moléculas produzidas. Constituem alterações na estrutura proteica, podendo resultar em mudança no dobramento, na função biológica ou na determinação da localização da molécula no ambiente celular (SØRENSEN, 2010). Visto que a p26 não necessita destas modificações, o uso da *E. coli* torna-se oportuno.

Alguns autores utilizaram *E. coli* para produção da proteína p26 do VAIE (BIRKETT et al., 1997; ALVAREZ et al., 2007; PIZA et al., 2007). Entretanto, neste trabalho foi utilizada uma nova estratégia, clonagem de gene sintético códon otimizado, que apresenta importantes vantagens em relação à estratégia convencional, que usa

genes obtidos por PCR. O gene sintético é recebido clonado em vetor de passagem, com a sequência nucleotídica alvo otimizada para os códons preferenciais da *E. coli* e acrescida de sítios de restrição e de cauda de polihistidina. O uso dessa estratégia facilita o processo de clonagem, diminui o risco de contaminação com o manuseio de material infectado, evita os erros decorrentes da construção de sequências por PCR, melhora a taxa de tradução e, conseqüentemente, aumenta a produtividade da proteína recombinante. Isso implica em menor custo para o desenvolvimento e para a produção da proteína recombinante.

O vetor de expressão pMAL-c4X™ utilizado neste trabalho, é específico para produção e purificação de proteínas em *E. coli*, permitindo uma produção de 20 a 40% da proteína recombinante em relação ao conteúdo proteico total produzido pela bactéria. Possui sua região de inserção de genes heterólogos a jusante do gene *malE* de *E. coli*, a qual codifica uma Proteína Ligante de Maltose (PLM) a MBP2*, resultando na expressão de uma proteína de fusão ligada à PLM (GUAN et al., 1987; MAINA et al., 1988). Este vetor utiliza o forte promotor tac e os sinais de iniciação de tradução do gene *malE* para maximizar o nível de expressão das seqüências clonadas (AMANN, et al., 1985; DUPLAY et al., 1984). O vetor apresenta purificação de etapa única da proteína de fusão MBP usando afinidade pela maltose (KELLERMAN et al., 1982). O pMAL-c4X™ é portador do gene *lacI^q*, que codifica o repressor Lac, mantendo a expressão baixa do gene na ausência do indutor Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), além de possuir a seqüência de codificação para o sítio de reconhecimento da protease Fator Xa (NAGAI et al., 1984), responsável pela quebra da proteína de fusão.

A análise da proteína de fusão MBP2*.p26mod realizada através de gel SDS-PAGE revelou a presença de bandas de 68,5 kDa, que, no ensaio de *Western blot*, foram marcadas com anticorpos anti-HIS, cuja sequência foi inserida na sequência do gene sintético. A clivagem dessa proteína de fusão apresentou, em gel SDS-PAGE, duas bandas de 26 kDa e 42,5 kDa, correspondentes, respectivamente, às proteínas p26 recombinante e à MBP* do gene *malE* de *E. coli* (GUAN et al., 1987; MAINA et al., 1988). Em conjunto esses achados confirmam que a proteína p26 do VAIE foi clonada em *E. coli* e está sendo expressa em forma de proteína de fusão, conforme planejado.

Com base no SDS-PAGE, os eluatos da coluna de níquel apresentaram bandas correspondentes à proteína de fusão MBP2*.p26, com 68,5 kDa, com rendimento de 78,12 mg/L de cultura, compatível com outros registrados na literatura, entre 1 e 100

mg/L de cultura, para proteínas de fusão ligantes de maltose purificadas por cromatografia de afinidade (RIGGS, 1990).

É necessário destacar que no SDS-PAGE do lavado da resina a proteína MBP2*.p26 ainda há presença de banda relativa à proteína recombinante, demonstrando que houve uma saturação da resina de níquel e, com isso, o valor do rendimento proteico foi subestimado.

A MBP2*.p26mod foi engenheirada para permitir a purificação por cromatografia de afinidade através das colunas de amilose, que tem afinidade pela MBP2*, ou de níquel (resina Ni-NTA), que tem afinidade pelos 6 resíduos de histidina inseridos na p26. Em ensaios preliminares obteve-se baixo rendimento com a coluna de amilose (dados não apresentados). A resina Ni-NTA contém uma marca de afinidade (tag) para proteínas com seis resíduos consecutivos de histidina. O NTA possui quatro sítios de quelação para íons níquel, funcionando como forte ligante para íons níquel e impedindo a lixiviação do complexo entre o níquel e a proteína que possui seis resíduos de histidina, o que resulta em maior capacidade de ligação proteica com a matriz de afinidade.

A proteína MBP2*.p26mod foi facilmente diluída em PBS, sem formação de precipitados. É conhecido que o uso do vetor de expressão pMAL-c4X™, com consequente expressão da proteína fusionada com MBP, permite aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes e prevenir a formação de corpúsculos de inclusão (SAHDEV et al., 2008). Além disso, a proteína MBP2*.p26mod foi intensamente imunoreativa *in vitro*, pois no teste de IDGA foram observadas linhas de precipitação únicas entre os soros positivos e a proteína MBP2*.p26mod, demonstrando a especificidade analítica da proteína recombinante. Adicionalmente, a IDGA realizada com a proteína MBP2*.p26mod apresentou alta sensibilidade analítica, pois a reação observada frente ao soro de referência OIE correspondeu a uma reação fraco-positiva. Por definição da OIE esse soro contém a quantidade mínima de anticorpos anti-VAIE que pode ser detectada na IDGA (OIE, 2008).

Em resumo, o sistema de expressão heteróloga em *E. coli* demonstrou uma produção com elevado rendimento da proteína de fusão MBP2*.p26 em forma imunoreativa no teste de IDGA. É necessário avaliar a IDGA com a proteína MBP2*.p26mod como teste sorológico para diagnóstico da AIE, em comparação com os testes disponíveis no Brasil, com base na sensibilidade e na especificidade diagnósticas.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (PAPPE - 2008; Proc APS 0338-5.05/08), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Biovetech. Os autores agradecem ao Dr. Hans Aymeric do laboratório de doenças equinas (Maisons-Alfort, France) por fornecer gentilmente o soro de referência da OIE anti-VAIE e ao MAPA pela permissão de importação. Parte dos experimentos foi realizada no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia experimentais (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Figuras

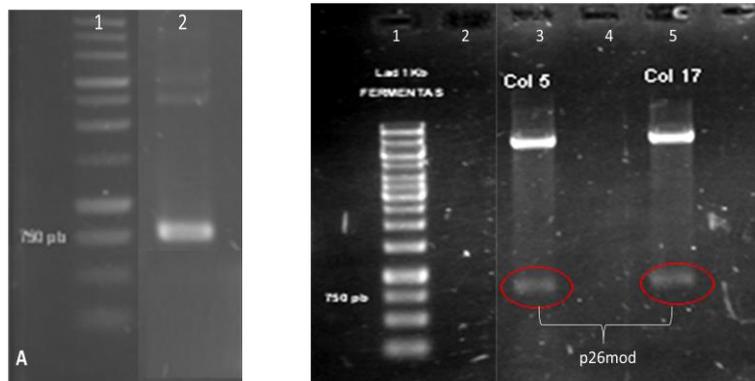


Figura 1. (A) PCR do gene p26 para mudança de sítios de restrição. Nota: 1 – MPM: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas®); 2 – gene da proteína p26 com modificação dos sítios de restrição. (B) Digestão do DNA plasmidial dos clones 5 e 17 para confirmação da clonagem do gene p26mod no vetor pMAL-c4X. Nota: 1 – MPM: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas®); 3- digestão do clone 5 com *EcoR I* e *BamH I* 5 – Digestão do clone 17 com *EcoR I* e *BamH I*; 2 e 4 – Poços vazios. Análises feitas em gel de agarose 0,8%.

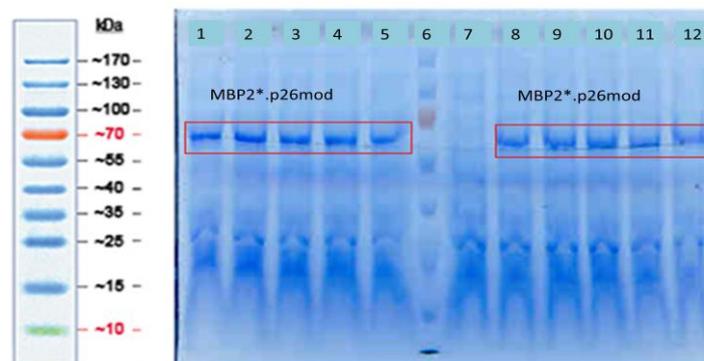


Figura 2. SDS-PAGE do ensaio de indução gênica dos clones 5 e 17. Nota: 1, 2, 3, 4, e 5 – Clones pMAL-c4X.p26mod 5; 6- MPM- marcador de peso para proteínas - PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 7- controle negativo (*E. coli* BL-21 STAR sem plasmídeo); 8, 9, 10, 11 e 12 - Clones pMAL-c4X.p26mod 17.

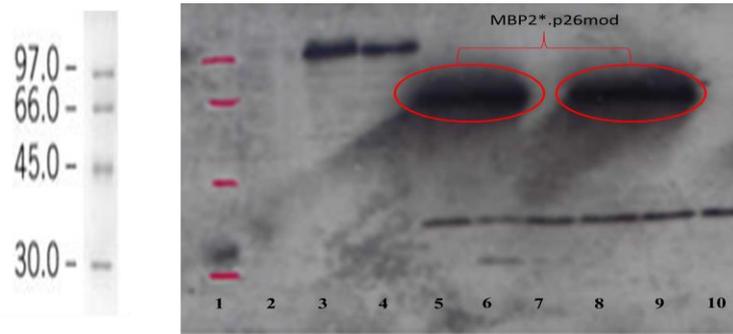


Figura 3. Western blot da proteína de fusão MBP2*.p26mod do VAIE utilizando anticorpo anti-HIS. Nota: 1- MPM- marcador de peso molecular LMW-SDS Marker Kit da Amersham Biosciences; 2 - vazio; 3 e 4 - controle positivo para o anti-HIS (L1BPV1); 5 - clone pMAL-c4X.p26mod 17; 6- clone pMAL-c4X.p26mod 5; 7- controle negativo para o anti-HIS (*E. coli* BL-21 sem plasmídeo); 8 - clone pMALp26mod 5; 9- clone pMALp26mod 5; 10- controle negativo (BL-21 sem plasmídeo).

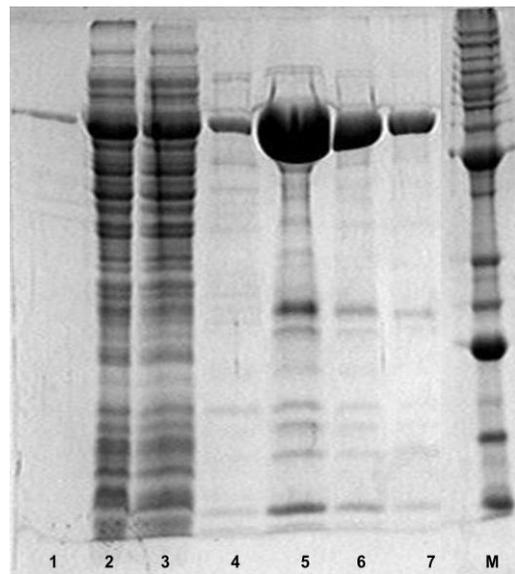


Figura 4. SDS-PAGE das frações da purificação da proteína p26.MBP2 por cromatografia de afinidade por resina de Níquel. 1- Eluato da coluna de amilose (MBP2*.p26); 2- Fração que não se ligou na coluna de Amilose (Flowthrough); 3- Fração que não se ligou na coluna de Níquel; 4- Fração não aderida após lavagem da coluna de Níquel; 5 e 6- Eluatos da coluna de níquel ; 7 - Resina de Níquel; M- marcador de peso molecular para proteínas (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen)

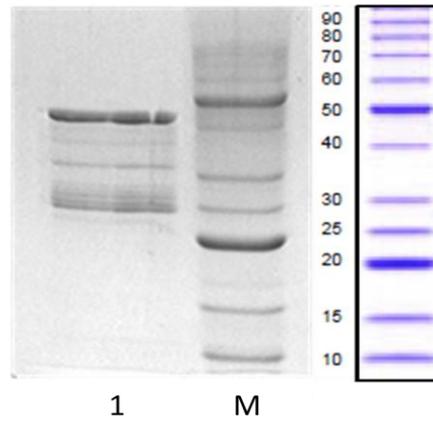


Figura 5. SDS-PAGE da clivagem da proteína MBP2*.p26mod utilizando o Fator Xa . 1- Eluato da resina de níquel (MBP2*.p26mod) digerido; M- marcador de peso molecular para proteínas (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen).

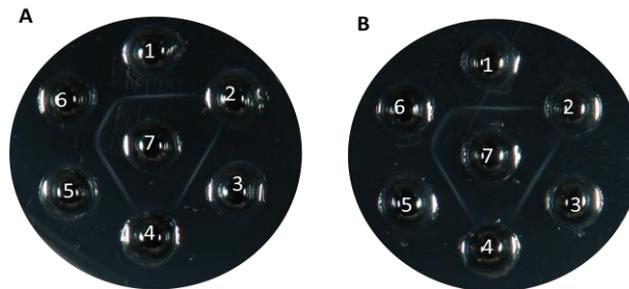


Figura 6. Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) da proteína de fusão MBP2*.p26mod. 1,3 e 5 (A e B)- soro controle positivo (Igs precipitadas por ácido caprílico); 2 e 4 (A e B)- soro de referência OIE sem diluição e na diluição 1:2 respectivamente; 6(A)- Soro de kit comercial 1 (Laboratório Bruch, Brasil); 6(B)- Soro de kit comercial 2 (Ourofino - VMRD, USA) e 7(A e B)- Proteína recombinante MBP2*.p26mod.

Referências

- ALMEIDA, V.M.A.; GONÇALVES, V.S.P.; MARTINS, M.F.; HADDAD, J.P.A.; DIAS, R.A.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte 2006, v. 58, n. 2, p. 141-148.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, 215:403–410.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A.; RODRIGUEZ, S.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Veterinary Microbiology* 2007, 121 : 344–351.
- AMANN, E.; BROSIUS, J.; 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 1985,40(2-3):183–190.
- BIRKETT, A.J.; YÉLAMOS, B.; RODRÍGUEZ-CRESPO, I.; GAVILANES, F.; PETERSON, D.L. Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochim Biophys Acta* Apr 1997, 25;1339(1):62-72.
- BRASIL. Instrução Normativa Número 45, de 15 de junho de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>.
- BRASIL. Portaria número 84 de 19 de outubro de 1992, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infectious. ***Clinical Microbiology Reviews***, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N.L.; KEMEN, M.J. The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. ***Equine Infect. Dis.***, III, 177–186, 1973.
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.; BOYER, H.W.; HELLING, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, 70(11):3240-3244.
- DE MARCO, A. Minimal information: an urgent need to assess the functional reliability of recombinant proteins used in biological experiments. *Microb Cell Fact* 2008, 7:20.
- DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. ***Biotechnology Advances***, 27: 297–306, 2009.
- DUPLAY P, BEDOUELLE H, FOWLER A, ZABIN I, SAURIN W, HOFNUNG M. Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 1984, 259:10606-10613.
- GUAN C, LI P, RIGGS PD, INOUE H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose binding protein. *Gene* 1987, 67: 21-30.
- ICTV, 2012. International Committee On Taxonomy Of Viruses Virus Taxonomy: 2012 Release (current). <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>.
- ISSEL CJ.; FOIL LD. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J Am Vet Med Assoc.* Feb 1984,184(3):293-297.

- KELLERMAN OK & FERENCI T. Maltose-binding protein from *E. coli*. *Methods in Enzymology* 1982, 90:459 – 463.
- LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680–685.
- LEROUX, C.; CADORÉ J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research* 2004, v. 35, p. 485-512.
- MAINA CV, RIGGS PD , GRANDEA AGI , SLATKO BE, MORAN LS, TAGLIAMONTE JA, McREYNOLDS LA, GUAN C. (A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from maltose-binding protein. *Gene* 1988,74: 365-373.
- MALMQUIST, W.A.; BARNETT, D.; BECVAR, C.S. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. **Arch Gesamte Virusforsch.**, 42: 361–370, 1973.
- MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K. Equine retroviruses. In: **The Retroviridae**, 257-360, 1993.
- MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. **Journal of Biological Chemistry**, 259: 10539-10544, 1984.
- MURPHY FA, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, STUDDERT MJ. *Veterinary Virology*. 3^o ed. San Diego: Academic Press, 1999. 629 p.
- NAGAI K & THØGERSEN Hc. Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 1984, 309: 810–812.
- O'FARRELL PH. High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem* 1975, 4007–4021.
- OIE 2013. Listed diseases, infections and infestations in force in 2013. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013>
- OIE, 2008. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. p.866-870 (Chapter 2.5.6).http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf.
- OIE, 2012. World Organization for Animal Health Terrestrial Animal Health. Code Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed disease (Chapter 1.3). http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.1.3.htm
- PACHECO, B.; CROMBET, L.; LOPPNAU, P.; COSSAR, D. A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Protein Expr Purif.** 2012;81:33–41.
- PIZA, A.S.T; PEREIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Preventive Veterinary Medicine* 2007, v.78, p. 239-245.
- RIGGS, P.D. (1990). Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions. In F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (Ed.), **Current Protocols in Molecular Biology**. 16.6.1-16.6.12. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K.; SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem.** 2008;307:249–264.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) (pp. 18. 60–18. 75. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Winston, S. E. et al. (1989) In F. M. Ausubel et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* 1989, pp. 10.8.1–10.8.6.
- SANTOS, M.C.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; FURTADO, G.C.; COLLETO, G.M.; KIPNIS, T.L.; DIAS DA SILVA, W. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon.* 1989, 27(3):297-303.
- SØRENSEN, H.P. Towards universal systems for recombinant gene expression *Microbial Cell Factories*, 2010, 9:27.
- SØRENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2005, 4(1):1.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 1996, 5:233–241.
- SWARTZ, J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 2001, 12 (2):195-201.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W, Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994, 22:4673–4680.
- TIMONEY, J. F. et al. Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals* 1988, p. 951. 8^o ed. Ithaca: Cornell University.
- TRAUB-DARGATZ, D.C. Equine Infectious Anemia. In: Sellon, D.C. *The Veterinary Clinics of North America- Equine Practice* 1993, p.321-336.
- WEIBLEN, R. **Anemia Infeciosa Equina.** In: RIET-CORREA, F. et al. *Doenças de Ruminantes e Equídeos.* Santa Maria: Pallotti, 62-71, 2007.
- WIDMANN, M.; CHRISTEN, P. Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins. *J Biol Chem* 2000, 275(25):18619-18622.
- WU, G.; ZHENG, Y.; QURESHI, I.; ZIN, H. TH.; BECK, T.; BULKA, B.; FREELAND, S.J. SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. **Nucleic Acids Res.** January; 35(Database issue): D76–D79, 2007.