

**Luiz Cosme da Silva Júnior**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA “E” DO  
VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM SISTEMA DE EXPRESSÃO**

*Pichia pastoris*

RECIFE

2013

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

**Luiz Cosme da Silva Júnior**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA “E” DO  
VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM SISTEMA DE EXPRESSÃO**

*Pichia pastoris*

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 de título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

**Prof. Dr. Roberto Soares de Castro**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas**

RECIFE

2013

*A meus pais Luís e Maria, a quem amo tanto e fizeram tudo isso ser possível.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, vontade e ânimo que me fizeram alcançar mais esta conquista.

A Jesus por mostrar que qualquer coisa é supérflua diante da Salvação concedida por Ele.

Ao Espírito Santo por Sua amizade inestimável.

A meus pais Luís e Maria e a minha irmã Elizabete, que são a base que me dá segurança e confiança para focar em meus objetivos e alcançá-los.

A minha sobrinha Izabella, que sempre me alegra quando chego em casa cansado depois de um dia de muito trabalho e estudo.

Ao Professor Roberto Soares de Castro, pela confiança, confiança, ensino e inspiração que fazem valer a pena amar minha profissão e não desistir dos meus objetivos.

Ao Professor Antonio Carlos de Freitas, pela co-orientação e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Ana Lisa do Vale Gomes, pela fundamental colaboração e, não menos importante, por sua amizade e disponibilidade.

Ao PPGCV pelo desempenho e excelência de seu trabalho.

A FACEPE, pelo apoio financeiro fundamental.

Aos meus companheiros, que se tornaram amigos, Marcelo Nazário, Filipe Mariz e André de Jesus, que se doaram para que este trabalho acontecesse.

A meus grandes amigos do LaViAn, Professora Rita de Cássia, Karin, Luciana, Sérgio, Daniela Campinho, Ana Campos, Camila, Cecília e Inês, que juntos trabalharam e trabalham na formação do meu caráter.

A todos os meus colegas e amigos do setor de Medicina Veterinária Preventiva e da UFRPE.

A Guiomar pela água tão necessária, pelo cafezinho maravilhoso e pelas brincadeiras nas minhas pausas.

A todos os meus amigos que, forçadamente, abdicaram de momentos de descontração comigo para me apoiarem com palavras de conforto e muita compreensão.

## RESUMO

A Doença de Aujeszky (DA) é causada pelo Herpesvírus Suino 1 (SHV1), que acomete uma ampla variedade de animais, sendo o suíno o hospedeiro principal. A DA tem causado consideráveis perdas econômicas diretas e indiretas à indústria suinícola mundial, decorrentes do impacto na produção. O emprego de medidas de controle utilizando teste diagnóstico capaz de diferenciar os animais infectados dos animais vacinados e a retirada dos animais positivos do plantel é fundamental para controlar a disseminação do vírus. O uso de vacinas deletadas para o gene gE do SHV1 tem sido utilizada para diminuir os sinais clínicos e a transmissão do vírus. Apesar de alguns epítomos do gene gE já terem sido clonados no sistema de expressão *Pichia pastoris*, a porção referente aos epítomos extramembranares, utilizando sequência sintética (gEs) códon otimizada para esta levedura, ainda não foi clonada neste sistema. Neste trabalho essa sequência foi clonada e expressa em *P. pastoris*, que produziu o antígeno recombinante gEr. O gEs foi clonado nas linhagens X-33 e KM71H dessa levedura. As duas linhagens clonadas foram induzidas a expressar gEr. A proteína recombinante foi identificada em ambos os clones por *colloning blot* e visibilizada em gel SDS-PAGE, revelando uma proteína de aproximadamente 50 kDa.

## ABSTRACT

Aujeszky's disease (AD) is caused by Suid Herpesvirus 1 (SHV1) and affects a wide variety of animals, the pig being the most important host. The DA has caused considerable direct and indirect economic losses to the pig industry worldwide, from the impact on production. The use of control measures using diagnostic test able to differentiate infected animals from vaccinated animals and removal of positive animals in the squad is key to controlling the spread of the virus. The use of vaccines for the gE gene deleted of SHV1 has been used to decrease clinical signs and virus transmission. Although some epitopes gE gene has already been cloned into the *Pichia pastoris* expression system, relative to the portion extramembranares epitopes using synthetic sequence (gEs) yeast codon optimized for this has not yet been cloned in this system. In this work this sequence was cloned and expressed in *P. pastoris*, which produced the recombinant antigen gEr. The gEs was cloned in strains X-33 and KM71H this yeast. The two strains were induced to express cloned gEr. The recombinant protein was detected in both clones by colony blot and visualized on SDS-PAGE gel, revealing a protein of approximately 50 kDa.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Partícula viral dos Herpesvirus.

**Figura 2.** Neurônio com a presença de vírus em forma de depósitos granulares marrons no citoplasma.

**Figura 3.** Possíveis vias de transporte da partícula viral em gânglio do SNC.

**Figura 4.** Aborto e mortalidade neonatal presentes na ocorrência de surto de DA.

**Figura 5.** Cão se alimentando com carne de suíno descartado em região com surto da DA.

**Figura 6.** Diferente resposta imunológica e, conseqüentemente, diferente resposta ao exame diagnóstico.

**Figura 7.** Esquema didático do SHV1 demonstrando algumas de suas glicoproteínas e ilustração do genoma viral.

**Figura 8.** Vetor de clonagem pPICZ $\alpha$ .

**Figura 9.** Regiões do gene gE.

**Figura 10.** Esquema da construção do gene gEs.

**Figura 11.** Alinhamento das sequências peptídicas do gene gE nativo e do gene gE sintético.

**Figura 12.** Eletroforese revelando o produto da digestão do DNA plasmidial de oito clones com as enzimas Xho I e Not I.

**Figura 13.** Análise comparativa do sequenciamento da construção pPICZ $\alpha$ AgEs com a sequência gEs otimizada.

**Figura 14.** Digestão com *Sac I* de duas construções pPICZ $\alpha$ AgEs.

**Figura 15.** Resultado do colony blot identificando a calda de histidina na gEr.

**Figura 16.** Gel de SDS-PAGE de clones pPICZ $\alpha$ AgEs.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>Lista de Figuras</b>	7
<b>Introdução e Justificativa</b>	9
<b>Objetivos</b>	11
<b>Revisão de Literatura</b>	12
Suinocultura	12
Doença de Aujeszky	13
SHV1	14
Sinais Clínicos	17
Transmissão	18
Controle	19
Diagnóstico	22
Glicoproteína gE	24
Sistemas de Expressão	26
Sistema de Expressão em <i>Pichia pastoris</i>	29
<i>Codon Usage</i>	31
<b>Material e Métodos</b>	33
Construção da sequência do gene gEs	33
Transformação de <i>E. coli</i>	34
Transformação da Levedura <i>P. pastoris</i>	35
Seleção dos clones com múltiplas cópias	36
Imunodeteção da gEr	37
Indução e Expressão da gEr	38
<b>Resultados</b>	39
<b>Discussão</b>	45
<b>Conclusão</b>	48
<b>Referências</b>	49



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Doença de Aujeszky (DA), causada pelo Herpesvírus Suíno 1 (*Suid herpesvirus 1* – SHV1), pode levar a consideráveis perdas econômicas diretas e indiretas à indústria suinícola mundial, decorrentes do impacto negativo na produção, restrição ao comércio internacional de produtos suínos, eliminação dos animais infectados dos rebanhos e custo com as medidas de controle. A DA é uma doença de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (OIE, 2011), o que pode levar à criação de barreiras sanitárias que impossibilitem o comércio no mercado internacional ou diminuam o valor da carne suína originária de países afetados.

O Brasil está no quarto lugar no ranking mundial de exportação de carne suína. Com o terceiro maior rebanho do mundo e em franca expansão para novos mercados como a China e o Japão, fica evidente a necessidade de controlar a DA. Este setor apresenta demanda crescente por insumos, como kits de diagnóstico, necessários às medidas de controle da DA.

No Brasil, não há estudo detalhado do impacto negativo da DA em todas as regiões produtoras de suínos. No estado de Santa Catarina estima-se em quase um milhão de reais as perdas causada pela DA (ZANELLA e MORÉS, 2001). Em 2003, 5.075 animais foram destruídos e 29.350 foram abatidos devido às medidas de controle da doença. Diversos países adotam programas de controle ou erradicação da DA. Dentre as medidas de controle adotadas estão a vacinação dos suínos com vacina deletada para o gene gE do SHV1, sem que haja comprometimento da replicação viral; paralelamente é feito o monitoramento dos rebanhos por teste de diagnóstico para detecção de anticorpos específicos para a proteína gE (OIE, 2012).

Baseado nas legislações do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) e nas recomendações da OIE, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elabora as diretrizes para a saúde animal e define requisitos sanitários e ações de combate às doenças. Segundo o Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), coordenado pelo MAPA, no caso da DA, a estratégia do Brasil é a regionalização das ações (BRASIL, IN 08 de 2007), contudo a adesão dos Estados da Federação é voluntária. Além disso, considerando a importância econômica da suinocultura e visando evitar a disseminação de doenças e assegurar níveis desejáveis de produtividade, foi estabelecida a certificação de granjas de reprodutores suídeos (GRSCs) livres de importantes enfermidades, como a DA (BRASIL, IN 19 de 2002).

Assim, a comercialização e distribuição, no território nacional, de suínos destinados à reprodução, assim como a sua participação em exposições, feiras e leilões, são permitidas somente àqueles provenientes de GRSCs, que são monitoradas semestralmente para DA, através de testes sorológicos (BRASIL, 2011).

Dentre as proteínas existentes no SHV1 destacam-se duas, pela capacidade de induzir imunidade, a glicoproteína gB, que é a mais conservada entre as proteínas do SHV1 e é essencial para o desenvolvimento do vírus; e a glicoproteína gE, que não é essencial para o desenvolvimento do vírus, porém a sua ausência reduz a capacidade do vírus causar a doença. Por isto a gE é deletada nas vacinas atenuadas de SHV1 empregadas no Brasil (FONSECA JÚNIOR, 2008). Como consequência, suínos infectados produzem anticorpos contra todas as proteínas virais (gB, gE etc), enquanto que os vacinados, com vacina deletada, não produzem anticorpos contra gE. Os testes sorológicos convencionais não distinguem se o animal é positivo porque foi vacinado ou porque está infectado, o que impede o uso conjunto dessas medidas.

Por induzir boa resposta imunológica e ser bem preservada nas amostras virais de campo, inclusive amostras brasileiras, a proteína gE do SHV1 pode ser usada em testes diagnósticos para diferenciação de animais naturalmente infectados dos vacinados com vacinas deletadas para esse gene, permitindo assim a adoção conjunta da vacinação, teste e eliminação dos portadores de anticorpos específicos para a proteína gE (VAN OIRSCHOT, 1986; MENGELING et al., 1997; FONSECA JÚNIOR, 2008).

A proteína gE do SHV1 é glicosilada. Assim, através da engenharia genética só pode ser produzida usando-se sistemas que realizem a glicosilação para que a proteína recombinante se assemelhe à nativa de origem viral. No Brasil foi desenvolvido um protocolo para expressão da proteína gE recombinante em baculovírus (DAMBROS et al., 2007). O uso de baculovírus e de outros sistemas de expressão baseados em células de mamíferos são capazes de produzir proteínas muito parecidas com as nativas, no entanto, apresentam baixa expressão, alto custo com o cultivo celular e difícil processo de purificação (SHULER e KARGI, 2001). Por outro lado, leveduras como *Sacharomices cerevisiae* e *Pichia pastoris*, realizam a maioria das modificações das células animais, inclusive modificações pós-traducionais como a glicosilação, e têm a melhor relação benefício/custo para produção em alta escala (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Apesar de alguns epítomos da gE já terem sido clonados em *Pichia pastoris* esse sistema ainda não foi empregado para expressão da proteína gE do SHV1 utilizando códons otimizados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Produzir glicoproteína gE do SHV1 recombinante (gEr) e imunoreativa em *Pichia pastoris* transformada com o gene gE sintético (gEs).

### **2.2 Específicos**

- Obter clones de *P. pastoris* transformados com um gene sintético (gEs) códon otimizado construído a partir da sequência do gene gE do SHV1;
- Expressar o gEr em cultivo de clones de *P. pastoris* transformados com o gene gEs;
- Produzir gEr imunoreativa de fácil concentração a partir dos sobrenadantes de cultivos.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Suinocultura**


A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo, oferecendo vários benefícios à saúde. Além de fonte proteica é rica em vitaminas e minerais que garantem uma alimentação saudável e balanceada. A gordura da carne suína encontra-se, em grande parte, localizada abaixo da pele e apenas 20 a 22% encontra-se entremeada no músculo. Esta característica permite ao consumidor maior controle na ingestão de gordura, pois possibilita a remoção de grande parte do tecido adiposo e o preparo de pratos menos calóricos (SARCINELLI, VENTURINI e SILVA, 2007; ABIPECS, 2013).

A restrição médica à utilização sem restrições da gordura animal na dieta humana e a substituição desta pela gordura vegetal provocou mudanças no perfil da produção de suínos no mundo. Nos últimos anos houve a progressiva substituição do suíno tipo banha (grande produtor de gordura) pelo suíno tipo carne (menor produção de gordura), onde neste houve a redução de 31% da gordura, 10% do colesterol e 14% das calorias, atendendo assim as novas exigências do mercado (BRASIL, 2013).

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, representando 10% do volume exportado no mundo, ficando atrás apenas da China, União Européia e EUA. O Brasil produziu 580 mil toneladas desta carne em 2012, chegando a lucrar mais de US\$ 1,3 bilhão, e a estimativa de aumento na produção em 2013 é de quase 13%, podendo chegar a 21% em 2018 e 2019. Os preços desses produtos projetam uma elevação de até 10% para 2013, o que pode gerar aumento na receita com exportação de 20% no mesmo ano. Esse crescimento observado no setor está estimulando o aumento dos investimentos na suinocultura industrial (BRASIL, 2013; ABIPECS, 2013).

O grande fator que implica no volume de exportação de carne suína e influencia no surgimento de barreiras econômicas no Brasil é a situação sanitária atual do país. Países como Coréia do Sul, Índia, África do Sul, México e alguns outros, que são potenciais consumidores deste produto, não importam a carne brasileira principalmente pela situação sanitária dos nossos rebanhos em relação à Febre Aftosa, onde o Brasil é considerado livre apenas no Estado de

Santa Catarina, e nos demais Estados é livre com vacinação. (ABIPECS, 2013).

 <b>EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE CARNE SUÍNA</b> JAN / NOV 2012 X JAN / NOV 2011									
	TONELADA			US\$ MIL			PREÇO MÉDIO		
	2012	2011	%	2012	2011	%	2012	2011	%
JANEIRO	38.177	34.809	9,68	97.413	93.029	4,71	2.552	2.673	-4,53
FEVEREIRO	37.768	39.060	-3,31	96.392	100.582	-4,17	2.552	2.575	-0,89
MARÇO	47.787	44.299	7,87	121.552	117.466	3,48	2.544	2.652	-4,07
ABRIL	47.734	50.944	-6,30	125.216	145.410	-13,89	2.623	2.854	-8,10
MAIO	53.404	44.988	18,71	138.382	126.645	9,27	2.591	2.815	-7,95
JUNHO	43.913	52.752	-16,76	108.397	152.134	-28,75	2.468	2.884	-14,41
JULHO	44.243	36.104	22,54	108.275	93.854	15,37	2.447	2.600	-5,86
AGOSTO	54.717	45.887	19,24	134.425	122.093	10,10	2.457	2.661	-7,67
SETEMBRO	60.442	41.405	45,98	157.648	113.852	38,47	2.608	2.750	-5,14
OUTUBRO	61.742	46.200	33,64	166.388	135.236	23,04	2.695	2.927	-7,94
NOVEMBRO	51.094	43.039	18,72	137.319	130.623	5,13	2.688	3.035	-11,45
DEZEMBRO									
<b>TOTAL</b>	<b>541.021</b>	<b>479.487</b>	<b>12,83</b>	<b>1.391.407</b>	<b>1.330.924</b>	<b>4,54</b>	<b>2.572</b>	<b>2.776</b>	<b>-7,35</b>

Fonte: ABIPECS, 2013.

O suíno, assim como qualquer animal, está sujeito a infecções que podem interferir em sua produtividade ou até mesmo resultar em morte. Doenças geram perdas tanto na produção como na comercialização de animais e produtos derivados, sendo necessário o emprego de medidas profiláticas para o controle de tais infecções. A instituição de programas adequados de vacinação e manejo sanitário permite o controle da disseminação de patógenos no plantel, e diminui a taxa de animais infectados (BRASIL, 2011; ABIPECS, 2013; PUSIC et al., 2011).

São diversos os agentes patogênicos que acometem suídeos. Podem ser bactérias, parasitas, protozoários ou vírus. Brucelose, Leptospirose, Tuberculose, Salmonelose, Meningite Estreptocócica, Colibacilose, Clostridiose, Rinite Atrófica, Doença de Glässer, Cistecercose, Toxoplasmose, Coccidiose, Sarna, Peste Suína Clássica, Parvovirose Suína, Circovirose Suína, Rotavirose Suína e Doença de Aujeszky são exemplos de enfermidades frequentes em rebanhos suínos. Dentre essas enfermidades a Peste Suína Clássica e a DA possuem programas próprios de fiscalização no Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), para controle e erradicação das mesmas (BRASIL, 2011).

### 3.2 Doença de Aujeszky (DA)

A DA foi descoberta por Aladar Aujeszky, médico veterinário húngaro que conseguiu

reproduzir a enfermidade no ano de 1902 (AUJESZKY, 1902). A doença foi observada inicialmente em bovino e no cão, e mais tarde em felino e em outras espécies. Nos EUA a DA foi identificada como a doença "mad-itch" em 1931, só depois que foi confirmada como sendo a DA, e ficou conhecida como pseudorraiva (PRV) pela semelhança clínica apresentada com a raiva (HIPÓLITO, FREITAS e FIGUEIREDO, 1965; LEE e WILSON, 1979).

O primeiro caso observado da DA no Brasil ocorreu em São Paulo em 1912, e a doença foi disseminada por vários outros Estados. No final da década de 40 o país ficou conhecido como o maior foco da DA no mundo, onde ocorreram 111 surtos (HIPÓLITO, FREITAS e FIGUEIREDO, 1965).

A DA está na lista de Infecções e Infestações da OIE que exige notificação do surgimento de casos e surtos (OIE, 2013), e é responsável por consideráveis perdas econômicas diretas e indiretas à indústria suinícola mundial, decorrentes do impacto na produção, havendo a eliminação dos animais infectados dos rebanhos e restrição ao comércio internacional de seus produtos.

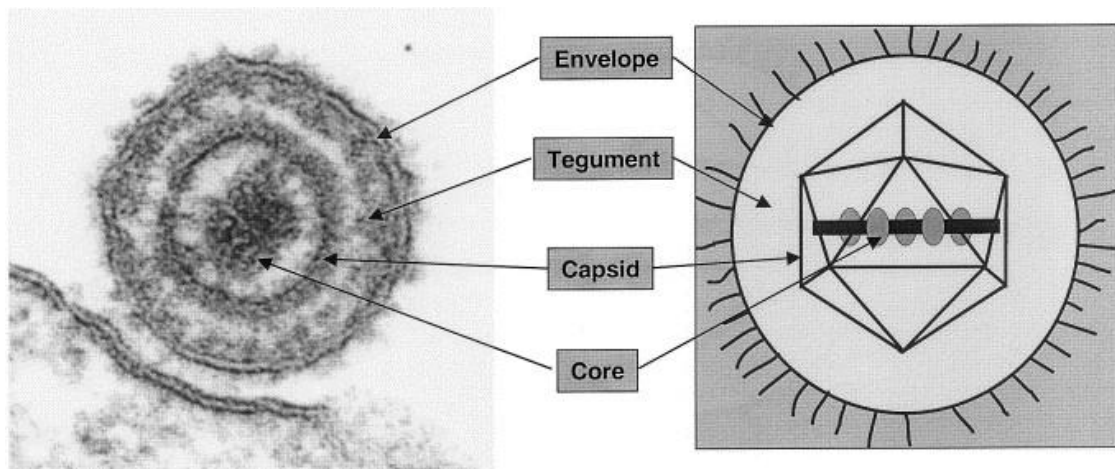
O agente causador da DA é o Hespervírus Suino 1 (*Suid herpesvirus 1* – SHV1), que acomete várias espécies de mamíferos. Na maioria das espécies a infecção apresenta taxa de mortalidade de 100%, inclusive nos suínos jovens. Primatas, inclusive o homem, e animais de sangue frio são refratários, enquanto que equinos apresentam relativa resistência à infecção pelo SHV1 (METTENLEITER, LUKÀCS e RIZHA, 1985; METTENLEITER, 1996; PUSIC et al., 2011).

### 3.3 SHV1

O SHV1 é um DNA vírus, também conhecido por vírus da pseudorraiva ou vírus da DA, pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Baseado na similaridade genômica, quatro gêneros compõem os Alphaherpesvírus: *Varicella-Zoster virus* (VZV), *Herpes Simplex virus* tipo 1 (HSV1), *Infectious Laryngotracheitis virus* (ILTV) e Vírus da Doença de Marek (VDM) (METTENLEITER, 1996; ICTV, 2011).

O SHV1 possui tamanho entre 200 e 250 nm, é composto por capsídeo icosaédrico

simétrico formado por nucleoproteínas; tegumento, que é uma estrutura proteinácea amorfa, envolta por uma bicamada lipídica, o envelope; seu material genético é composto por uma fita dupla de DNA (METTENLEITER, 1996; KLUPP et al., 2004; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005). O genoma é formado por duas regiões, um segmento único longo (*Unique long* – UL) e um segmento único curto (*Unique short* - Us), que juntas contêm 70 genes, com tamanho de aproximadamente 150 kbp. Várias são as proteínas sintetizadas a partir dessa estrutura gênica. As glicoproteínas estão envolvidas em importantes interações vírus-hospedeiro, sendo imprescindível a presença de algumas (gB, gH, gD, gL e gK) para que ocorra a replicação viral. Já as proteínas gC, gE, gG, gI e gM são consideradas não essenciais para a replicação do vírus, onde seus respectivos genes podem ser deletados para formar novas cepas possíveis de serem usadas como vacinas por não apresentarem virulência (Fig. 1) (METTENLEITER, 1996; MENGELING et al., 1997; MORENKOV et al., 1997a; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005).



**Figura 1.** Partícula viral dos Herpesvirus com quatro estruturas morfolologicamente diferenciáveis: O núcleo interno contendo o genoma de DNA linear de cadeia dupla é localizado no interior de um capsídeo icosaédrico, que é rodeado por uma camada de mais de 15 proteínas diferentes, que constituem o tegumento. A partícula é envolvida pelo envelope, camada lipídica contendo proteínas, principalmente as glicosiladas (METTENLEITER, 2003, adaptado).

O SHV1 é um vírus multitrópico. Na infecção do Sistema Nervoso Periférico (SNP) o vírus migra célula-célula através das sinapses, até o Sistema Nervoso Central (SNC) causando encefalite letal (Fig. 2). A atividade deubiquitinase da proteína pUL36 garante ao vírus

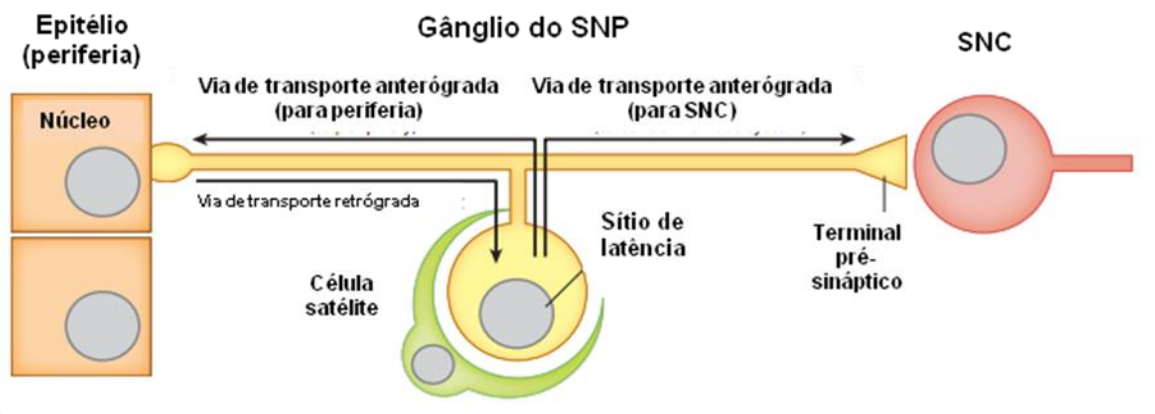
capacidade de quebrar a barreira neuronal na sinapse do neurônio epitelial, permitindo sua transmissão pelo sistema nervoso e garantido a replicação viral. Em um neurônio infectado o vírus pode apresentar três vias de transporte: uma anterógrada para a periferia, na qual ele pode retornar ao epitélio; uma anterógrada para o SNC; e uma via retrógrada, onde o vírus retorna do epitélio para o sítio de latência (Fig. 3) (SMITH, 2012).



**Figura 2.** Neurônio com a presença de vírus em forma de depósitos granulares marrons no citoplasma dos axônios e dendritos, marcados por técnica de imunoperoxidase utilizando anticorpo anti-SHV1 (José María Nieto, <<http://www.ecvpath.org/february-2008/>> acesso em 31/01/2013).

O SHV1 tem a capacidade de infectar células nervosas vizinhas à célula infectada inicialmente, garantindo assim a disseminação lateral do vírus. Além do Sistema Nervoso e epitelial o SHV1 também infecta o sistema respiratório, e outras células como os monócitos, assim, através da viremia pode ser disseminado por via transplacentária e também infectar órgãos como o baço, fígado, testículo e medula óssea, podendo levar o animal a morte antes mesmo de chegar ao cérebro (HIPÓLITO, FREITAS e FIGUEIREDO, 1965; SMITH, 2012).





**Figura 3.** Possíveis vias de transporte da partícula viral em gânglio do SNC (Adaptado, SMITH, 2012).

### 3.4 Sinais Clínicos

O período de incubação do SHV1 é de três a 10 dias e o prurido intenso é o sinal clínico presente na maioria das espécies acometidas, podendo ocorrer no início da infecção ou mais tarde. O suíno pode não apresentar prurido e outros sinais, por isso a DA pode passar despercebida no plantel (HIPÓLITO, FREITAS e FIGUEIREDO, 1965).

Clinicamente a DA se assemelha a outras doenças frequentes em suínos, porém, a ocorrência de problemas reprodutivos em fêmeas, acompanhados de sinais neurológicos em leitões durante o crescimento, é altamente sugestiva da DA (LEE & WILSON, 1979).

Suínos adultos infectados podem sobreviver à infecção e tornarem-se portadores latentes do SHV1. Esses animais são os principais responsáveis pela disseminação do vírus, porque não desenvolvem os sinais clínicos da DA e permanecem imperceptíveis no rebanho, transmitindo o vírus através do contato direto com animais saudáveis e entre animais de diferentes espécies. Os animais com infecção latente podem apresentar redução da resposta humoral, e por isso serem de difícil identificação em imunodiagnóstico (METTENLEITER, LUKÀCS, RIZHA, 1985; McCAW, 1997; GROFF, 2005; MORES et al., 2007; PUSIC et al., 2011).

Os sinais clínicos observados são dependentes da idade do animal infectado, sendo letal em leitões abaixo de duas semanas. Eles podem apresentar hipertermia, tremores, incoordenação, ataxia, nistágmo, opstótomo e convulsões. Em suínos acima de dois meses os sinais respiratórios são mais evidentes, apresentando rinite com espirros e descarga nasal que podem evoluir para pneumonia. Sinais respiratórios são os primeiros observados em animais

adultos, e problemas reprodutivos como aborto e mumificação são comuns em matrizes (Fig. 4). A frequência de infecções secundárias é alta, e quando ocorrem podem elevar a morbidade a 100% (METTENLEITER, 1996; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005; OIE, 2012).



**Figura 4.** Na ocorrência de surto de DA pode ocorrer aborto em qualquer fase da gestação (A). A mortalidade entre leitões é sempre alta (B). (BARCELLOS, D. E. <[http://suinotec.com.br/suinofotos\\_dados\\_indices.php?id=31](http://suinotec.com.br/suinofotos_dados_indices.php?id=31)> Acesso em 24/01/2013).

### 3.5 Transmissão

A transmissão do SHV1 é feita principalmente através da secreção nasal pelo contato direto entre animais infectados e sadios. Por isto, a grande densidade populacional nos rebanhos suínos facilita a disseminação do vírus. Além disso, o vírus pode ser deslocado por grandes distâncias na forma de aerossóis, podendo chegar a rebanhos próximos sem precisar de vetores para isso. Morcegos hematófagos podem transportar o sangue infectado e inocular em outros animais através da mordida (HIPÓLITO, FREITAS e FIGUEIREDO, 1965; PUSIC et al., 2011).

A propagação entre os rebanhos ocorre pela introdução de animais infectados pelo SHV1 no rebanho. Na aquisição de animais, principalmente matrizes e reprodutores, deve-se preconizar a realização de teste diagnóstico e respeitar o período de quarentena, mesmo que esses animais sejam oriundos de granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSCs). A

introdução de um reprodutor infectado no rebanho possibilita a rápida disseminação do vírus por contato entre o reprodutor e as matrizes, e das matrizes para a leitegada (MORES et al., 2007; PUSIC et al., 2011).

A alimentação de porcos com restos alimentares humanos facilita a disseminação do SHV1 no rebanho e entre rebanhos. Já os carnívoros têm como principal fonte de infecção a ingestão de carne ou ossos de suínos mortos pela DA ou infectados de forma latente (PUSIC et al., 2011).

A capacidade do SHV1 de infectar várias espécies animais facilita sua manutenção na natureza. Caninos, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, macacos e roedores, em contato com suínos infectados podem adquirir o vírus e, uma vez infectados, podem transmitir o SHV1 para áreas livres da doença (Fig. 5) (PUSIC et al., 2011).



**Figura 5.** Cão se alimentando com carne de suíno descartado em região com surto da DA (BARCELLOS, D. E. <[http://suinotec.com.br/suinofotos\\_dados\\_indices.php?id=31](http://suinotec.com.br/suinofotos_dados_indices.php?id=31)> Acesso em 24/01/2013).

### 3.6 Controle

Algumas medidas podem ser aplicadas na tentativa de controlar e erradicar a DA. O sacrifício de todos os animais de um rebanho onde tenha sido identificada a presença do vírus, respeitar o período do vazio sanitário, e a substituição destes por animais oriundos de rebanho livre do SHV1 é uma medida radical e dispendiosa, porém eficaz, de eliminar o vírus do rebanho (GROFF, 2005).

Outras medidas menos radicais e menos onerosas, e realizadas na maioria dos programas de controle e erradicação da DA, são a vacinação do rebanho; a realização de testes sorológicos nos animais do plantel; e a retirada dos animais positivos, repetindo o teste periodicamente. A separação de recém-nascidos de fêmeas infectadas antes que eles mamem o colostro permite que a leitegada seja infectada (VAN OIRSCHOT, 1986; McCAW, 1997; MENGELING et al., 1997).

Contudo, se o rebanho apresentar alta prevalência da infecção (>10%) é indicado o despovoamento da granja, realização de vazios sanitários e repovoamento com animais oriundos de GRSCs (MORES et al., 2007).

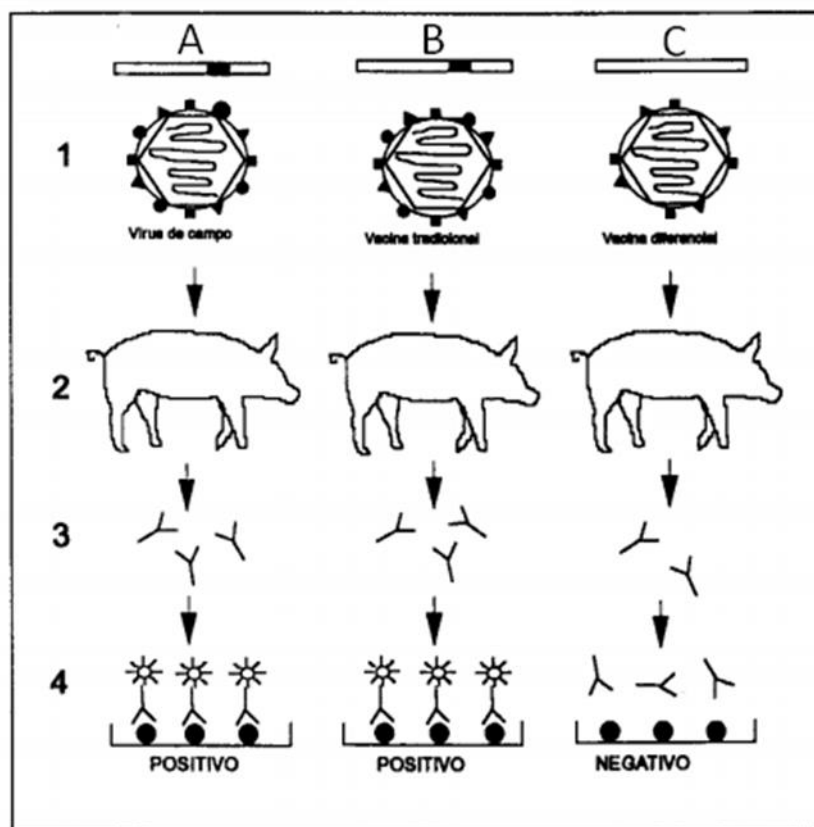
Apesar de a vacinação ter demonstrado eficácia na proteção do rebanho e na diminuição da disseminação da DA, a maioria, se não todos, os pequenos criadores de suínos ainda não adotaram essa medida de controle em suas criações. Assim, a ausência de manejo tecnificado e a ausência de medidas de controle desses pequenos rebanhos, distribuídos por todas as regiões, os tornam potenciais reservatórios e disseminadores do SHV1 (PUSIC et al., 2011).

A vacinação diminui consideravelmente os efeitos dos sinais clínicos, porém, não previne totalmente o animal contra a infecção ou o estabelecimento da latência, sendo assim, insuficiente como única medida de controle para impedir a circulação do vírus no rebanho (VAN OIRSCHOT, 1986). No entanto, quando a vacinação é utilizada adicionalmente ao teste diagnóstico periódico, realizando o descarte dos animais positivos e aquisição apenas de animais testados e negativos para o SHV1, a DA pode ser controlada e até erradicada do rebanho (MENGELING et al., 1997; PUSIC et al., 2011).

Baseado nas legislações do SUASA e da OIE, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elabora as diretrizes para a saúde animal e define requisitos sanitários e ações de combate às doenças. Segundo o SUASA, coordenado pelo MAPA, no caso da DA a estratégia do Brasil é a regionalização das ações (BRASIL, IN 08 de 2007), contudo a adesão dos Estados da Federação é voluntária. Além disso, considerando a importância econômica da suinocultura e visando evitar a disseminação de doenças e assegurar níveis desejáveis de produtividade, foram estabelecidas as GRSCs, livres de importantes enfermidades como a DA (BRASIL, IN 19 de 2002). Assim, a comercialização e distribuição, no território nacional, de suínos destinados à reprodução, assim como a sua participação em exposições, feiras e leilões, são permitidas somente àqueles provenientes de GRSCs, que são monitoradas semestralmente para DA, através de testes sorológicos (BRASIL, 2011).

Atualmente, só o Estado de Santa Catarina é considerado oficialmente livre sem vacinação (CIACCI-ZANELLA et al., 2008). Segundo o SUASA, para a certificação e monitoramento de GRSCs é necessário o teste semestral para DA (BRASIL, 2011).

O sucesso de um programa de controle da DA, que use vacina com gene deletado, depende do uso de teste diagnóstico capaz de diferenciar animais infectados de animais vacinados (Fig. 6), e que apresente baixo custo e confiáveis sensibilidade e especificidade. A sensibilidade do teste deve ser suficiente para identificar resposta humoral no início da infecção e no período de latência, onde o título de anticorpos diminui (VAN OIRSCHOT, 1986; MENGELING et al., 1997; KINKER, 1997; McCAW, 1997).

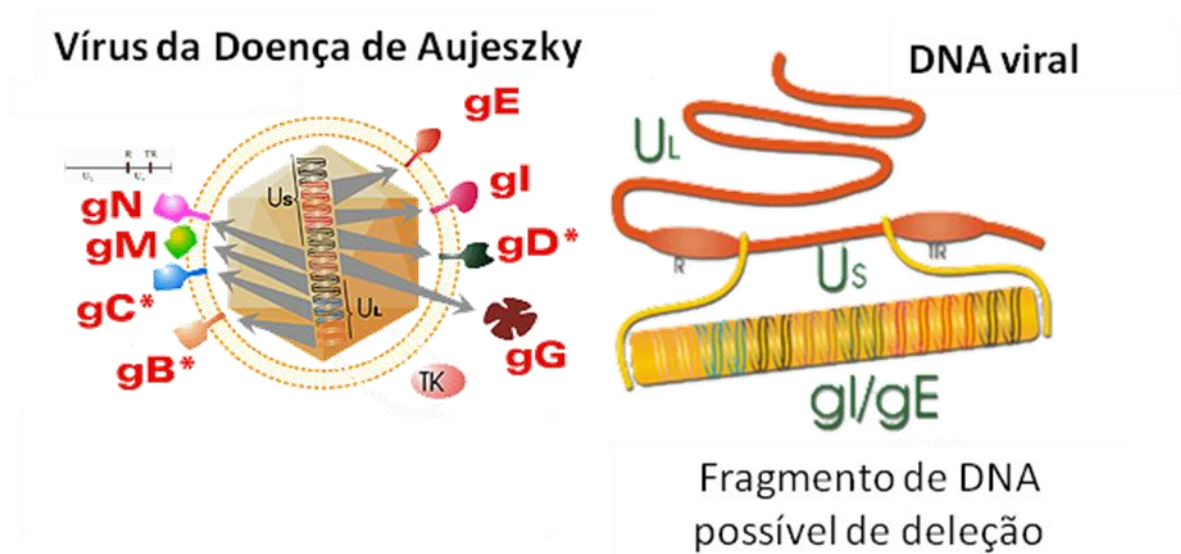


**Figura 6.** Diferente resposta imunológica obtida a partir de diferentes estratégias de vacinação e, conseqüentemente, diferente resposta ao exame diagnóstico. Resposta obtida quando o animal está infectado com vírus selvagem (A), vacinado com vírus sem genes deletados (B) e vacinado com vírus com gene deletado (C) (CIACCI-ZANELLA e FLORES, 1995)

No território nacional é permitido o uso de vacinas vivas e atenuadas que sejam deletadas pelo menos para o gene gE, assim como o uso de testes diagnósticos que permitam a detecção de

anticorpos contra a proteína gE, permitindo a identificação e diferenciação de animais infectados e vacinados (BRASIL, IN 08 de 2007).

Em estudos realizados com a substituição da região Us do genoma de cepas virulentas, onde está localizado o gene gE, pela mesma região de cepas não virulentas, verificou-se que o vírus permanecia imunogênico porém não apresentava mais virulência. Sendo assim, vírus recombinante com essa engenharia genética usado na formulação de vacinas garante resposta humoral contra o SHV1 e diminui o risco de ocorrência de sinais clínicos e disseminação do vírus (Fig. 7) (METTENLEITER, LUKÀCS e RIZHA, 1985).



**Figura 7.** Esquema didático do SHV1 demonstrando suas glicoproteínas gN, gM, gC, gB, gE, gI, gD, gG e a TK (esquerda), e ilustração do genoma viral destacando as duas regiões UL e Us, destacando a presença da glicoproteína gE localizada na região Us (direita). (<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/noveno2.htm>) Acessado em 24/01/2013.

Comparando a proteção conferida por duas vacinas comerciais, uma com os genes gG e TK deletados, e outra com os genes gG, TK e gE deletados, observou-se que houve 62,5% de morte após a vacinação com a primeira, e apenas 25% dos animais vacinados apresentaram anticorpos anti-SHV1. Já os animais vacinados com a segunda vacina apresentaram anticorpos contra o vírus, e houve 50% de sobrevivência quando expostos ao vírus selvagem. Contudo, mesmo com a deleção do gene gE os animais vacinados apresentaram resposta imune aceitável e risco de mortalidade muito inferior (WEIGEL, HAHN, e SCHERBA, 2003).

### 3.7 Diagnóstico

No Brasil os testes sorológicos autorizados para o diagnóstico da DA são o ELISA e a virusneutralização. Podendo também ser utilizadas as técnicas de isolamento viral e a PCR no diagnóstico direto, pesquisando a presença do SHV1 em amostras de cérebro, baço, linfonodos, pulmão, secreção nasal e fetos abortados (BRASIL, IN 08 de 2007). Segundo a OIE a pesquisa indireta pode ser também realizada por aglutinação em látex, mas o ELISA tem sido extensivamente usado e atualmente existem vários kits comerciais (OIE, 2012).

A PCR tem sido testada como meio diagnóstico para detecção do SHV1 em suínos infectados, e demonstra boa especificidade. Porém, apesar desta técnica ser capaz de detectar animais infectados ainda no período pré soroconversão, quando ela é usada para diferenciar animais infectados de animais vacinados sua sensibilidade diminui consideravelmente, o que é atribuído a variação gênicas que pode existir no gene gE das cepas virulentas (MA, 2008). A PCR duplex também demonstra eficácia, contudo, a adição de dois pares de *primers* na mesma reação diminui a sensibilidade do teste (FONSECA JR, 2010).

Existem algumas contradições no uso da PCR para diagnóstico do SHV1. O tipo e a quantidade da amostra coletada e a forma de armazenamento e transporte dessa amostra podem resultar na diminuição da carga viral e do seu material genético pela presença de DNase celular, que, somando com a possível incompatibilidade dos *primers* ou sondas, podem impossibilitar a detecção do agente (MA, 2008).

Um grande desafio para o imunodiagnóstico é possuir sensibilidade capaz de detectar animais infectados no período de latência, em animais senis, e no início da infecção, onde o título de anticorpos anti-SHV1 diminui naturalmente (McCAW, 1997).

Estudo comparando a capacidade de identificação de animais infectados no início da infecção, demonstrou que o ELISA foi superior a virusneutralização, detectando anticorpos anti-SHV1 nesses animais a partir do 5º dia pós infecção, e ao 7º dia pós infecção já foi capaz de identificar  $\geq 95\%$  dos animais positivos, enquanto que para a virusneutralização essa detecção ocorreu no 8º e o 21º dias, respectivamente. A superior sensibilidade do ELISA em detectar animais recém-infectados, quando comparado à virusneutralização, reforça seu uso como teste diagnóstico confiável para a DA (OREN et al., 1993).

Em leitões, o contato com cepa virulenta do SHV1, somado a presença de anticorpo anti-

SHV1 transmitido passivamente pelo colostro, pode resultar em animais infectados de forma latente. Esses animais apresentam naturalmente resposta humoral baixa, o que pode resultar em falso-negativos. Comparando a sensibilidade de dois ELISAs, um utilizando a proteína gG e o outro utilizando a gE do SHV1, observou-se que o último ELISA foi capaz de identificar todos os leitões infectados experimentalmente, enquanto que o primeiro não. Com esses resultados verifica-se maior resposta humoral contra a gE do que contra a gG e maior sensibilidade do ELISA utilizando gE (McCAW, 1997).

As análises realizadas com a utilização do teste de ELISA com gE recombinante, além de serem obrigatórias são importantes para o rastreamento epidemiológico da doença. Somado ao baixo custo e a capacidade de diferenciar os animais infectados dos vacinados, os resultados obtidos são importantes para o reforço da vigilância epidemiológica e a criação de novas estratégias de controle da DA (SILVA et al., 2005).

ELISA em *sandwich* utilizando a proteína gE e a proteína gB ou gD demonstrou alta especificidade, onde, com a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos não ocorreu reação cruzada para nenhuma proteína. Não houve competição entre o conjugado específico para gE e para os mAbs contra gB e gD e vice versa, o que sugere o uso dessas proteínas em ELISA para diagnosticar a DA (MORENKOV et al., 1997a).

Estudo comparativo entre dois ELISAs indiretos, um utilizando a proteína gE recombinante expressa em *E. coli*, e outro utilizando a mesma proteína purificada a partir de partículas virais, demonstrou sensibilidades de 80% e 97%, respectivamente. Essa grande diferença pode ser atribuída a perda da conformação-dependente de epítomos imunodominantes da gE expressada em *E. coli* (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1997b).

Devido a característica da gE em garantir a virulência do vírus e não participar na replicação viral de forma essencial, seu respectivo gene pode ser deletado sem que haja interrupção no ciclo viral. Assim, é possível desenvolver vacinas atenuadas ou inativadas a partir da construção de cepas não virulentas com a gE ausente, e todas as vacinas comercialmente disponíveis foram desenvolvidas desta forma. Essa proteína é bastante conservada em cepas de campo, sendo identifica sua expressão em centenas de cepas circulantes no mundo, e por ser muito imunogênica a gE pode ser usada em testes diagnósticos para identificação de animais naturalmente infectados e animais vacinados (VAN OIRSCHOT, 1986; MENGELING et al., 1997; MA, 2008).



### 3.8 Glicoproteína gE

A glicoproteína gE, também denominada gI (algarismo um romano), é uma proteína de membrana tipo 1 que está complexada com a glicoproteína gI (letra i maiúscula), e sua porção C terminal interage com a proteína VP22 (UL49). Seu gene (US8) está localizado entre os nucleotídeos 123.502 e 125.235, com tamanho de 1.733 nucleotídeos, e sua forma peptídica possui 577 aminoácidos e peso molecular de 62,4 kDa. A gE tem papel fundamental na virulência do SHV1 por auxiliar a disseminação viral que ocorre célula-célula no hospedeiro (METTENLEITER, 1996; KLUPP et al., 2004; POMERANZ, REYNOLDS E HENGARTNER, 2005).

Em estudo de mapeamento genético da proteína gE, utilizando 17 mAbs específicos para gE, foram identificados cinco grupos principais de epítomos. Esses epítomos foram classificados como domínio A, subdividido em A1 e A2, domínio B, domínio C, subdividido em C1, C2, C3 e C4, domínio D e domínio E. Além desses, outros três epítomos também foram observados na gE (MORENKOV et al., 1997a).

Desses epítomos encontrados, oito são conformacionais, sendo esta conformação a característica principal na imunogenicidade da gE. Em experimento onde se avaliou comparativamente a resposta humoral provocada pelos diferentes epítomos da gE, animais infectados com epítomos lineares apresentaram resposta humoral fraca, enquanto animais infectados com os epítomos conformacionais apresentaram maior produção de anticorpos (MORENKOV et al., 1997a).

Apesar de serem identificados os epítomos da gE, estudo utilizando anticorpo contra apenas um epítomo, localizado no domínio C, para identificar animais infectados com SHV1 através de ELISA direto, demonstrou ser insuficiente. Com a possibilidade de haver perda ou variação da conformação de epítomos, a sensibilidade de teste diagnóstico baseado em apenas um epítomo pode diminuir. Portanto, quanto maior a variação de anticorpos anti-gE ou mais próximo que uma proteína recombinante for da gE nativa maior a possibilidade de identificar antígeno ou anticorpo, respectivamente, em animais infectados através de testes diagnósticos (VAN OIRSCHOT, 1986; MORENKOV et al., 1997).

Uma proteína recombinante constituída dos epítomos imunodominantes A, B e D da gE, e expressos em baculovírus, foi utilizada em ELISA recombinante para diagnosticar animais

infectados e diferencia-los dos vacinados. Utilizando a virusneutralização como teste ouro observou-se correlação de 77% entre os testes, com especificidade de 86,7% e sensibilidade de 69,7% para o ELISA recombinante. Dos 109 animais positivos na virusneutralização apenas 76 foram detectados no ELISA, demonstrando que esta estratégia não é eficaz para um programa de erradicação da DA (SERENA, et al., 2011).

Um fragmento correspondente a região amino-terminal da gE foi clonado e expresso com sucesso em sistema eucarioto utilizando *E. coli*, e a proteína recombinante manteve a antigenicidade da gE. Apesar da gE ser uma glicoproteína e requerer processamentos pós-traducionais para ser imunorreativa, particularmente nesse caso, provavelmente por se tratar de uma sequência peptídica pequena (134 aminoácidos), ela apresentou-se imunorreativa em ensaios de imunoblotting (RO et al., 1995). Porém, sistema de expressão procarioto foi incapaz de produzir uma gE recombinante imunorreativa, seja pelo processamento e conformação inapropriados quanto pela incapacidade do sistema em sintetizar a gE completa. Sistemas utilizando células de rato e de insetos também foram incapazes de produzir a gE recombinante imunorreativa (KIMMAN, et al., 1996).

Um fragmento do gene da gE, compreendido entre os nucleotídeos 60 e 370, foi clonado e expresso em Baculovírus, e a proteína recombinante foi usada em ensaios de ELISA. Este ELISA apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 81%, quando coparado o resultado com outros cinco ELISAs comerciais (KIMMAN, et al., 1996). No Brasil foi desenvolvido um protocolo para expressão do gene gE completo recombinante em Baculovírus, resultando na expressão de uma proteína de peso molecular entre 82.2 e 115.5 kDa (DAMBROS et al., 2007). Contudo, este sistema apresenta dispendiosa técnica, por necessitar de cultivo celular, e resulta em baixo rendimento.

A sequência compreendida entre os nucleotídeos 151 e 714, correspondente a uma fração da porção extramembranar da gE, referente a apenas alguns dos seus epítomos de superfície, foi clonada e expressa em *P. pastoris*, para uso em ELISA. Porém, quando testada e comparada com ELISA comercial (PRV gPI-Antibody Test Kit - IDEXX) demonstrou sensibilidade inferior (AO et al., 2003).

Assim, o uso de proteína recombinante formada com apenas um ou alguns epítomos de um antígeno limita sua capacidade de identificar animais infectados (VAN OIRSCHOT; 1986), o que já foi evidenciado para gE (SERENA et al., 2011), onde apenas o epítomo D dessa proteína foi expresso e usado em ELISA, e apresentou especificidade de 86,7% e sensibilidade de 69,7%,

e essa baixa sensibilidade de um imunodiagnóstico é indesejada para um teste utilizado como ferramenta em estratégias de controle da DA (MORENKOV et al., 1997a).

### 3.9 Sistemas de expressão

Várias são as proteínas recombinantes produzidas atualmente na indústria farmacêutica (insulina, albumina, hormônio do crescimento, e muitas outras) e para serem usadas em imunodiagnósticos. A produção de proteína por sistemas de expressão permite produção em quantidade e qualidade desejáveis, contudo, para isso, a escolha do sistema ideal que seja rápido e produtivo em fornecer uma proteína funcionalmente desejável e com qualidade é o fator mais importante (DEMAIN & VAISHMAV, 2009).

O sistema de expressão utilizando a *E. coli* como hospedeiro vem sendo utilizado extensivamente na produção de proteínas heterólogas. A facilidade de manipulação com relativamente baixo custo de cultivo e a produção de alta qualidade e quantidade de produto fazem desse sistema uma escolha interessante para a indústria. Contudo, existem algumas limitações da *E. coli* principalmente no que diz respeito a performance metabólica do micro-organismo (Tabela 1) (DEMAIN & VAISHMAV, 2009; CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2012).

**Tabela 1.** Características do sistema de expressão por *E. coli*.

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Rápida expressão</b>	Difícil de expressar proteínas com pontes dissulfeto
<b>Alto rendimento</b>	Não glicolisa proteínas
<b>Fácil manipulação genética e de cultivo</b>	Produz proteínas com endotoxinas
<b>Pouco oneroso</b>	Formação de acetato resulta em toxicidade celular
<b>Rápida produção em massa</b>	Proteínas produzidas em corpúsculos de inclusão são inativas e requerem redobramento

Fonte: (DEMAIN & VAISHMAV, 2009, adaptado).

Sob condições de produção de proteína recombinante, a *E. coli* pode perder imediatamente alguns mecanismos de ajuste de crescimento celular. O hospedeiro pode responder a essa mudança destruindo seus ribossomos ou induzindo a proteólise, interferindo na síntese proteica e na estabilidade da proteína sintetizada, respectivamente (CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2012).

Além disso, a *E. coli* apresenta limitações na produção de proteínas recombinantes que requerem certos processamentos pós-traducionais. Essas limitações foram percebidas quando proteína traduzida de gene eucarioto foi expressa em *E. coli* e sua conformação final demonstrou-se diferente de sua forma nativa. Assim, proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais como alto nível de pontes dissulfeto, glicosilação, lipidação, prolina *cis/trans* isomerização, dissulfeto isomerização e fosforilação, não apresentarão sua conformação nativa, o que pode interferir na imunorreatividade e na bioatividade da proteína recombinante (DALY e HEARN, 2005).

Além das limitações quanto à capacidade de realizar modificações pós-traducionais, que são essenciais em expressão de glicoproteínas imunorreativas, o sistema de expressão em *E. coli* necessita de processo de recuperação da proteína recombinante, que é bastante laborioso, pelo fato da proteína ser produzida, principalmente, de maneira insolúvel e inativa sob a forma de corpúsculo de inclusão. (CEREGHINO e GREGG, 2001; DEMAIN & VAISHMAV, 2009).

Sistema de expressão utilizando células de insetos, que é um sistema eucarioto onde o vetor mais usado é o Baculovírus, tem sido utilizado na expressão de proteínas heterólogas recombinantes. Modificações pós-traducionais; dobramento proteico com formação de pontes dissulfeto; alto nível de expressão; não apresenta limites do tamanho da proteína a ser expressa; e simultânea expressão de múltiplos genes são algumas das várias vantagens desse sistema. Porém, incorreta glicosilação, incapacidade de secreção, dobramento proteico inadequado e baixo nível de expressão já foram relatados nesse sistema, além disso, ele apresenta dispendiosa técnica (DEMAIN & VAISHMAV, 2009).

A principal vantagem do sistema de expressão utilizando células de mamíferos é sua capacidade de expressar proteínas de mamífero adequadamente, pois realiza as etapas pós-traducionais necessária para a essas proteínas. Contudo, o baixo nível de secreção, o alto custo dos processos desse sistema, e o potencial risco de contaminação por vírus e bactérias limitam o

seu uso (DEMAIN & VAISHMAV, 2009).

Animais transgênicos também têm sido utilizados para expressar proteínas heterólogas em secreções corpóreas (leite, urina, sangue, plasma seminal, etc), produzindo proteína tão ativa como a nativa, a melhor custo/benefício que expressão em células de mamíferos. A via de secreção mais utilizada é através do leite, contudo, o tempo de espera até a lactação, o fato de a lactação ser temporária e o custo com a criação do animal são fatores limitantes desse sistema. O uso de plantas transgênicas também tem sido eficaz na expressão de proteínas heterólogas, com produção a menor custo, em menor tempo e com baixo risco de contaminação quando comparado com animais e outros sistemas. A desvantagem no uso de plantas é a possibilidade de contaminação com pesticidas, herbicidas e metabólitos tóxicos da própria planta (DEMAIN & VAISHMAV, 2009).

### **3.10 Sistema de expressão *Pichia pastoris***

Assim como a *E. coli* a *Pichia pastoris* também é uma alternativa econômica, de fácil manipulação genética e de cultivo, produz a proteína recombinante de interesse em alta qualidade e quantidade. Adicionalmente, se tratando de um sistema de expressão eucarioto a *P. pastoris* possui as vias de síntese proteica que realizam a maioria das modificações pós-traducionais que garantem a produção da proteína heteróloga bioativa ou imunorreativa, e ainda possui vias de secreção para essa proteína (CEREGUINO et al., 2002; DALY e HEARN, 2005; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A capacidade de secretar a proteína recombinante para o meio de cultivo deve-se ao sinal de secreção adicionado à proteína. O mais comumente utilizado e que exporta a proteína com eficiência é o fator- $\alpha$  peptídeo sinal ( $\alpha$ -MF) oriundo da *S. cerevisiae* (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005) .

A secreção da proteína recombinante para o meio de cultivo evita o contato dela com a toxicidade intracelular resultante do acúmulo de metabólitos, e o fato da *P. pastoris* secretar baixos níveis de proteínas nativas simplifica o processo de purificação da proteína recombinante. Adicionalmente, a passagem dessa proteína pela via de secreção permite que ocorram os eventos pós-traducionais como maturação proteolítica, glicosilação, processamento de sequência sinal e formação de pontes dissulfeto (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DAMASCENO, HUANG

e BATT, 2012).

Várias são as linhagens de *P. pastoris* disponíveis e capazes de expressar proteínas heterólogas, sendo a necessidade de processos pós-traducionais, a extensão desses processos, e o tipo de proteína a ser expressa o que vai determinar a escolha da linhagem a ser usada (DALY e HEARN, 2005).

A *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, capaz de usar o metanol como única fonte de carbono para a produção proteica. O metabolismo do metanol ocorre pela presença desses dois genes, AOX1 e AOX2, que codificam a enzima álcool oxidase. Apesar desses genes serem reprimidos na presença de glicose, glicerol e etanol, o AOX1 pode ser induzido até 1000 vezes quando na presença de metanol. O sucesso na produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* está diretamente ligado ao uso do gene AOX1 como promotor e sua forte capacidade de indução, que juntamente com outros componentes da via de utilização do metanol regulam o nível de transcrição na célula (CEREGUINO et al., 2002; MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005; DAMASCENO, HUANG e BATT, 2012).

O gene AOX1 é responsável por aproximadamente 85% do consumo de metanol na levedura, enquanto que, o gene AOX2 apresenta baixo consumo de metanol, aproximadamente 15%. O fenótipo MUT<sup>+</sup> (rápido consumo de metanol) possui os dois genes AOX1 e AOX2 funcionais, enquanto que o fenótipo MUT<sup>S</sup> (lento consumo de metanol) apresenta o gene AOX1 inativo, e só utiliza o AOX2. Já o fenótipo MUT<sup>-</sup> tem esses dois genes deletados, e é incapaz de metabolizar o metanol. Essa capacidade rápida ou lenta de consumir o metanol vai determinar se o nível de expressão da proteína heteróloga será alto ou baixo (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005).

São várias as estirpes de *P. pastoris* e ampla a gama de genótipos usados na expressão proteica. Essa grande variedade de opções tornou esse sistema de expressão altamente requisitado para produzir os mais variados tipos de proteínas recombinantes. A estirpe selvagem X-33 permite transformantes da linhagem MUT<sup>+</sup>, enquanto a estirpe KM71H, além de ser deficiente para o gene da histitida dehidrogenase, garante transformantes da linhagem MUT<sup>S</sup> (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005).

A rápida expressão da linhagem MUT<sup>+</sup> já resultou em defeituoso dobramento proteico, produzindo proteína com falha na conformação quando expressa em *P. pastoris*. Entretanto, a linhagem MUT<sup>S</sup> apresenta expressão mais lenta, resultando em melhor acabamento proteico e é indicada, principalmente, para expressão de proteínas com atividade dependente da

conformação. Apesar da produção de ambas as linhagens ser semelhante, quando cultivadas em condições específicas ideais, a linhagem MUT<sup>S</sup> necessita de menos metanol e menos oxigênio na expressão que a linhagem MUT<sup>+</sup> (DALY e HEARN, 2005).

As características dos vetores disponíveis comercialmente para uso em expressão de proteína heteróloga em *P. pastoris* são diversas. Alguns vetores já possuem uma sequência sinal para expressão extracelular da proteína, enquanto que outros que não a tem são usados na expressão intracelular. Ainda que o vetor não traga esse sinal, o gene referente a este sinal pode ser inserido junto com o inserto e resultar na secreção da proteína heteróloga para o sobrenadante do cultivo (CEREGUINO et al., 2002; DALY e HEARN, 2005).

Alguns vetores são construídos com o gene da histidina desidrogenase funcional (HIS4), que pode ser usado como marca de seleção em *P. pastoris*, e células deficientes para esse gene são classificadas como His<sup>+</sup>, pois não ocorre o metabolismo da histidina. Entretanto, essa marca de seleção não permite identificar transformantes com múltiplas cópias, e somado ao grande tamanho do gene HIS4 levou ao surgimento de outra marca de seleção, o gene *Sh ble*. Essa segunda marca de seleção garante resistência a Zeocina e, além de ser usada na detecção de transformantes, pode identificar os clones que possuem múltiplas cópias (CEREGUINO et al., 2002; MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005).

Alguns problemas também podem ser encontrados nos vetores. Vetores de grande tamanho genético apresentam dificuldades nas etapas de clonagem *in vitro*. Quando os transformantes são obtidos a partir desses vetores geralmente apresentam pouca estabilidade. O vetor pPICZ $\alpha$ A possui o  $\alpha$ -MF, é His<sup>-</sup>, possui a marca de seleção *Sh ble* e tem tamanho de 3,6 kpb (Fig. 8) (CEREGUINO et al., 2002; DALY e HEARN, 2005).



**Figura 8.** Vetor de clonagem pPICZ $\alpha$ A. (Adaptado de DALY e HEARN, 2005).

A secreção de proteínas em conformação idêntica à nativa e a facilidade de purificá-la a partir do meio de cultivo, diminuindo o alto custo com métodos de purificação e evitando desestabilização da proteína como também alterações em sua conformação, são alguns dos principais fatores que determinam a preferência da *P. pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DAMASCENO, HUANG e BATT, 2012).

### 3.11 *Codon Usage*

O código genético é organizado em 61 trincas (códon) de nucleotídeos que codificam 20 aminoácidos diferentes, e três códon de terminação que indicam o fim da tradução. Cada aminoácido pode ter até seis códon diferentes para sua síntese e cada organismo possui códon preferenciais. O que determina a preferência de códon em um organismo é a relação de RNA transportador (RNAt) que ele possui no citoplasma referente a estes códon (GUSTAFSSON, GOVINDARAJAN e MINSHULL, 2004).

A produção de proteína de clones com múltiplas cópias e de clones com uma única cópia do cassete de expressão é muito similar, porém, é conhecido que a regulação da expressão determina a manutenção da correta conformação da proteína. Há limitações no retículo endoplasmático da *P. pastoris* que, quando ocorre expressão em níveis altos pode acontecer retenção inadequada de proteínas, o que pode interferir nas modificações pós-traducionais. A presença de códon raros na sequência nucleotídica pode determinar essa interrupção na síntese proteica e diminuir a expressão ou até mesmo produzir proteína inadequada (KANE, 1995; McNULTY et al., 2003; DAMASCENO, HUANG e BATT, 2012).

Um gene recombinante que possua códon raros para o hospedeiro pode interferir na tradução, e resultar em substituição errônea de aminoácidos e, conseqüentemente, mudanças críticas na proteína recombinante expressa (CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2012). Uma estratégia comum para melhorar o nível e a qualidade da expressão de um gene recombinante é alterar os códon de modo que eles reflitam os códon preferenciais de utilização do hospedeiro sem modificar a sequência de aminoácidos da proteína (GUSTAFSSON, GOVINDARAJAN e



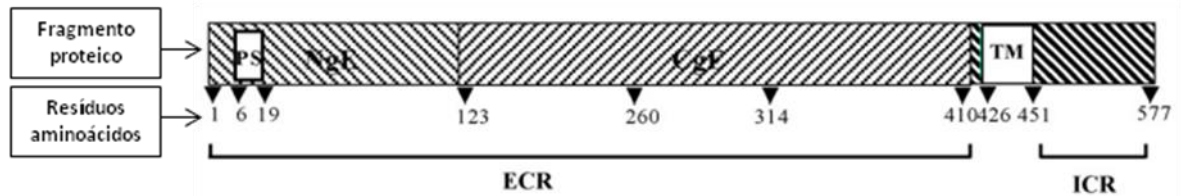
MINSHULL, 2004).

O uso de códon preferenciais em gene sintético usado no sistema de expressão *P. pastoris* tem demonstrado maior nível de expressão da proteína heteróloga e melhor qualidade dessa proteína, com bioatividade e imunorreatividade melhores que a proteína produzida a partir do gene nativo (YADAVA e OCKENHOUSE, 2003).

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Construção da sequência do gene gEs

Análises de bioinformática foram realizadas com base na sequência do genoma completo do SHV1 disponível no NCBI, acesso NC\_006151.1, para a escolha do fragmento referente à glicoproteína gE (Klupp et al., 2004). A sequência gênica selecionada compreende a porção extracelular da gE (Fig. 9), entre os nucleotídeos 96 e 1262 da sequência do gene desta proteína, com tamanho de 1166 nucleotídeos e 389 aminoácidos (SEBASTIÁN et al., 2008).



**Figura. 9.** Regiões do gene gE: sequência do péptido de sinal (PS), (ECR), domínio extracelular contendo o amino-terminal (NgE) e a maior parte das carboxi-terminais (CgE), domínio presente na transmembrana (TM) e domínio intracelular (ICR). Resíduos correspondentes estão apresentados abaixo (Sebastián et al., 2008, adaptado).

A sequência alvo, a ser sintetizada, sofreu alteração nos códons para aperfeiçoar sua expressão na levedura *P. pastoris*, resultando em uma sequência gênica diferente, porém, com mesma informação proteica. Sítios de restrição XbaI e NotI foram adicionados na extremidade 3' e sítio XhoI na extremidade 5' do gene, para possibilitar a clivagem da sequência através de enzimas específicas. Ao gene foi acrescido ainda uma sequência repetida de nucleotídeos (6x Histidina) para facilitar a imunodeteção da proteína e um códon de parada (*stop codon*). As modificações de códon (*codon usage*), as devidas inserções e a síntese foram realizadas pela empresa *Epoch Biolabs* (EUA). A sequência sintética gEs foi fornecida inserida no plasmídeo pBluescript II SK (pBSK), vetor de transporte que possui resistência à Ampicilina como marca de seleção.



**Figura 10.** Esquema da construção do gene gEs demonstrando os sítios de restrição inseridos (*NotI*, *XbaI* e *NotI*), a porção Kex2, a sequência gE otimizada, a sequência referente a cauda de polihistidina, e o códon de parada (*stop codon*).

### 4.3 Transformação de *E. coli*

A transformação das células *E. coli*, linhagem DH5 $\alpha$  (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), genótipo [F' {*proAB*, *lacIq*, *lacZ $\Delta$ M15, Tn10 (TetR)} *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*,  $\lambda$ -*araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*], foi realizada com a inserção da construção pBSKgEs, seguindo protocolo adaptado de Sambrook et al., (1989). As células transformadas foram cultivadas em placas contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani: tripton 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%) com adição de 15g/L de Agar e ampicilina (100  $\mu$ g/ml), a 37° C em estufa de cultura microbiana (Nova Ética®). As colônias que cresceram foram inoculadas em LB líquido a 37° C por 16 h, sob agitação constante de 250 RPM, e seu DNA plasmidial foi extraído (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). O DNA foi submetido à digestão dupla com as enzimas Xho I e Not I (Promega ®), seguindo recomendações do fabricante. O produto da digestão enzimática foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml) em TAE 1X (Tampão ácido acético e EDTA), em cubas horizontais de eletroforese OmniPhor®, observado em transluminador e fotodocumentado.*

Após a digestão da construção pBSKgEs o inserto gEs foi extraído do gel de agarose, purificado (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit - GE Healthcare) e usado em reação de ligação com o vetor pPICZ $\alpha$ A.

O vetor pPICZ $\alpha$ A, contendo o promotor *AOX1*, a região de terminação de transcrição *AOX1TT* e o gene *Sh ble* de resistência a Zeocina™, foi extraído de construção já existente, confirmado por sequenciamento, digerido com as enzimas Xho I e Not I para expor extremidades compatíveis com as do inserto, também digerido com as mesmas enzimas,

seguindo protocolo citado. Para a reação de ligação utilizou-se a enzima *T4 ligase* (Promega®), seguindo orientações do fabricante. O produto desta reação foi utilizado para transformar células de *E. coli*.

A transformação da *E. coli* DH5 $\alpha$  com o produto da reação de ligação foi feito segundo protocolo de Sambrook et al., (1989), e as células transformadas foram crescidas e selecionadas em placas contendo meio de cultura LB *low salt* (Luria-Bertani: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 0,5%) com adição de 15g/L de Agar e antibiótico Zeocina<sup>TM</sup> (25  $\mu$ g/ml). As colônias pré-selecionadas foram inoculadas em LB *low salt* líquido a 37° C por 16 h, sob agitação constante de 250 RPM, e foram submetidas à extração de DNA plasmidial (SAMBROOK et al., 1989). A confirmação da construção pPICZ $\alpha$ AgEs e da clonagem da *E. coli* foi feita através de digestão com as enzimas Xho I e Not I, e consequente liberação do inserto gEs (~1300pb) e do vetor pPICZ $\alpha$ A (~3600 pb). O DNA foi sequenciado utilizando os primers AOX1R GCAAATGGCATTCTGACATCC e AOX1F GACTGGTTCCAATTGACAAGC para confirmar a clonagem e a posição *in frame* do inserto no vetor. Foi utilizado o *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems® HITACHI) no sequenciamento das amostras.

#### 4.4 Transformação da levedura *P. pastoris*

O DNA da construção pPICZ $\alpha$ AgEs foi extraído, observado em gel de agarose, linearizado pela enzima SacI (Promega®), purificado a partir do gel (GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification kit - GE Healthcare) e quantificado (Nanovue GE®). Como controle positivo da transformação utilizou-se o vetor pPICZ $\alpha$ A vazio. 10  $\mu$ g (5 $\mu$ l) de DNA foi usado na clonagem das linhagens X-33, possuindo genótipo selvagem e fenótipo Mut<sup>+</sup> e His<sup>+</sup>, e KM71H possuindo fenótipo Mut<sup>S</sup> e His<sup>-</sup>, da levedura *P. pastoris* por eletroporação, com pulso de 1500 v por 5 ms no *Eletroporation System 399* (BTX® Harvard Apparatus).

Células eletrocompetentes de ambas as linhagens foram preparadas seguindo recomendações do *Easy Select Pichia Expression Kit* (Invitrogen®). Inicialmente foram realizados pré-inóculos de cada linhagem em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%,

triptona 2% e glicose 2%), e incubados a 30°C sob agitação constante de 225 rpm, até O.D.<sub>600</sub> ±6. Alíquota de 100µL de cada inóculo foi adicionada a 200mL de YPD e crescidos sob mesmas condições até O.D.<sub>600</sub> entre 1,3 e 1,5. Os inóculos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min a 4°C, e os sedimentos foram ressuspensos em 50mL de água destilada estéril gelada. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido três vezes. Após a última centrifugação as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1M estéril gelado e novamente centrifugadas, sendo ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1M estéril gelado. As células foram acondicionadas no gelo até o uso.

O DNA do cassete de expressão linearizado e purificado foi adicionado a 80µL de células eletrocompetentes de cada linhagem em cubetas de 0,2 cm e submetidas ao pulso elétrico. Imediatamente após o pulso foi adicionado 1mL de sorbitol 1M estéril gelado e o conteúdo foi transferido para tubos de 15mL (Falcon) e incubados por duas horas a 30°C. Logo após, foi adicionado 1mL de YPD e as células foram incubadas por mais duas horas a 30°C sob agitação constante de 200 RPM. As células foram crescidas em placas contendo YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e sorbitol 1M), acrescido de 20g/L de Agar e 100µg/µL de zeocina, e incubadas a 30°C por quatro dias (adaptado de SCORER et al., 1994).

#### **4.5 Seleção dos clones com múltiplas cópias**

Células contendo múltiplas cópias do cassete de expressão foram selecionadas em meio contendo alta concentração de zeocina. Placa contendo YPDS com 500µg/µL de zeocina foi usada inicialmente, e as colônias que cresceram nessa placa foram repicadas em YPDS com 1mg/µL de zeocina (MARIZ, et al., 2012). As placas foram incubadas a 30°C por três dias, e após análise foram armazenadas a 4-8°C.

#### **4.6 Imunodeteção da gEr**

O *colony blot* foi realizado com os clones selecionados e repicados em placa com YPDS. Esses clones foram incubados a 30°C por três dias, e em seguida foram induzidos mediante

adição de metanol na tampa da placa a cada 24 horas para uma concentração final de 1%. Após 72 horas, membrana PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, Millipore®) foi disposta sobre os repiques por três horas a 28°C e, depois, lavadas com tampão TBS-Tween (TBS-Tween 10X – Tris-HCl 100 mM NaCl 0.9% Tween-20 0,1% pH 7.6 - diluir para 1X) para remover o excesso de células. Para detecção da gEr foi realizada reação de bloqueio da membrana com leite desnatado 5% em TBS-Tween - p/v por uma hora a temperatura ambiente, seguida de incubação *overnight* a 4 - 8° C, com anticorpo monoclonal anti-His (Sigma-Aldrich®) diluído em solução de bloqueio (1:1000). A membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween e em seguida revelada com *Liquid Substrate System* BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich®) em câmara escura por dez minutos (GOODNOUGH et al., 1993, adaptado).

O SDS-PAGE foi realizado com gel separador de 12%, composto por 6ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0.8%, 3,75ml de Tris-HCl 1M/SDS 0,4%, pH 8.8, 50µl de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 10µl de TEMED (Sigma-Aldrich®), água MilliQ q.s.p 15ml, e gel concentrador de 5%, composto por 0,65ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8%, 1,25ml de Tris-HCl 1M/SDS 0,4% pH 6.8, 25µl de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 5µl de TEMED (Sigma-Aldrich®), água MilliQ q.s.p 5ml.

O sobrenadante das induções foram aliquoteados em tampão Laemmli 2X (Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.1%) e aquecidas por 5 min a 100°C antes de serem aplicadas no gel. Foi utilizado o tampão de corrida SDS-PAGE 1X, cuba vertical para SDS-PAGE (BioSystem®) e fonte de tensão ajustada para 400 V e 35 mA por 90 minutos.

Para o *Western blot*, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi submetida à reação de bloqueio durante 1 h. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-HIS na diluição de 1:10000 em PBS, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma®) durante 1 h, e lavada em seguida com PBS-Tween por 10 min 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 min.

#### **4.7 Indução e expressão da gEr**

A indução dos clones pPICZ $\alpha$ AgEs e o controle negativo pPICZ $\alpha$ A foi feita em 50 ml de meio YPD líquido em frascos tipo *Erlenmeyer* 500mL (Nalgene®) a 30°C sob agitação de 250 RPM por 48 horas ou até uma DO<sub>600</sub> igual a 20, para geração de biomassa. Para indução, as células foram centrifugadas por 5min a 1500 x g e ressuspensas em 5mL de MM (Minimal Methanol - YNB 1.34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>%, metanol 0.5%), em mesmo tipo de frasco, a 30°C sob agitação de 250 RPM por 96 horas. Foi adicionado metanol diariamente até concentração de 2 % e foram colhidas alíquotas a cada 24 horas pós-indução (T0, T24, T48, T72 e T96), para avaliar a expressão e a estabilidade da gEr no meio nos diferentes tempos. Ao final da indução, os cultivos foram centrifugados a 1500 x g por 5min e o sobrenadante precipitado com TCA (Tricloroacético), por adição de 1 mL de TCA, 1 mL do meio de cultura e 8 mL de acetona 100% gelada, e a suspensão foi acondicionada a -20°C por cerca de 16 horas. Procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm e secagem do precipitado a 37°C por 15 minutos. A amostra pôde ser então ressuspensa em tampão de fosfato para uma concentração final de 10X ou ressuspensa diretamente no tampão de amostra com  $\beta$ -mercaptoetanol para corrida SDS-PAGE, e armazenado a -20°C.

## 5. RESULTADOS

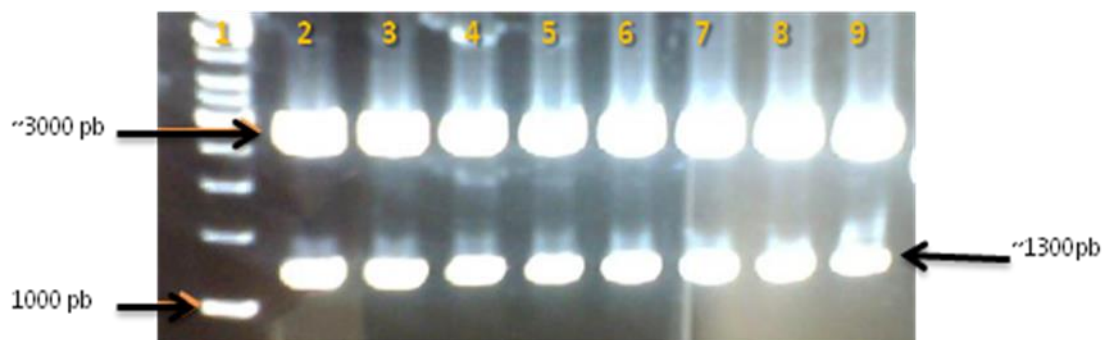
A tradução da sequência gEs inserida no plasmídio pBSK, apesar da diferença nas sequências nucleotídicas, resulta em sequência peptídica igual à originada a partir do gene gE nativo (Fig. 11), pois na otimização são substituídas algumas trincas por outras que resultem no mesmo aminoácido, mantendo, assim, a mesma sequência peptídica da proteína nativa.

Download		Graphics			
Sequencia otimizada para <i>P. pastoris</i>					
Sequence ID: lc 30249 Length: 412 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 412		Graphics			
		▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
827 bits(2135)	0.0	Compositional matrix adjust.	412/412(100%)	412/412(100%)	0/412(0%)
Query	1	LEKREAEAPGPFVTEVPSAEVWDLSTEAGDDDDLDGDLNGDDRRAGFGSALASLREAPPA	60		
Sbjct	1	LEKREAEAPGPFVTEVPSAEVWDLSTEAGDDDDLDGDLNGDDRRAGFGSALASLREAPPA	60		
Query	61	HLVNVSEGANFTLDARGDGAVVAGIWTFLPVRGCDAVAVTMVCFETACHPDLVLGRACVP	120		
Sbjct	61	HLVNVSEGANFTLDARGDGAVVAGIWTFLPVRGCDAVAVTMVCFETACHPDLVLGRACVP	120		
Query	121	EAPERGIGDYLPPEVPRLQREPPIVTPERWSPHLTVRRATPNDTGLYTLHDASGPRAVFF	180		
Sbjct	121	EAPERGIGDYLPPEVPRLQREPPIVTPERWSPHLTVRRATPNDTGLYTLHDASGPRAVFF	180		
Query	181	VAVGDRPPAPLAPVGPARGHEPRFHALGFHSQLFSPGDTFDLMPRVVSDMGDSRENFTAIL	240		
Sbjct	181	VAVGDRPPAPLAPVGPARGHEPRFHALGFHSQLFSPGDTFDLMPRVVSDMGDSRENFTAIL	240		
Query	241	DWYYARAPPRCLLYVYVEPCIYHPRAPCELRPVDPAACSFTSPARARLVARRAYASCSPLL	300		
Sbjct	241	DWYYARAPPRCLLYVYVEPCIYHPRAPCELRPVDPAACSFTSPARARLVARRAYASCSPLL	300		
Query	301	GDRWLTACPFDAFGEEVHTNATADESGLYVLVMTNHGHVATWDYTLVATAAEYVVIKEL	360		
Sbjct	301	GDRWLTACPFDAFGEEVHTNATADESGLYVLVMTNHGHVATWDYTLVATAAEYVVIKEL	360		
Query	361	TAPARAPGTPWPGGGDDAIYVDGVTT PAPPARPWNPHHHHHHHHHH*SRAA	412		
Sbjct	361	TAPARAPGTPWPGGGDDAIYVDGVTT PAPPARPWNPHHHHHHHHHH*SRAA	412		

**Figura 11.** Alinhamento das sequências peptídicas do gene gE nativo (*Query*) e do gene gEs (*Sbjct*), demonstrando 100% de homologia.

A transformação das células *E. coli* com a construção pBSKgEs resultou no crescimento de aproximadamente 60 colônias transformadas, que foram selecionadas pelo crescimento em meio LB sólido contendo Ampicilina. Após a digestão do DNA plasmidial de oito colônias transformadas com as enzimas XhoI e NotI houve a liberação da gEs (~1300pb) e do vetor pBSK (~3000pb), confirmando assim a clonagem da *E. coli* com a construção pBSKgEs (Fig. 12).





**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose 1,0% revelando o produto da digestão com as enzimas *Xho I* e *Not I* do DNA plasmidial de oito clones, e consequente liberação dos fragmentos do vetor pBSK (~3000pb) e da sequência gEs (~1300pb).

O produto da ligação do pPICZ $\alpha$ A com o gEs (pPICZ $\alpha$ AgEs) foi utilizado na clonagem de *E. coli*, resultando na transformação de aproximadamente 60 colônias que cresceram em placa contendo meio LB sólido com Zeocina (100 $\mu$ g/ $\mu$ L). O DNA plasmidial extraído das colônias inoculadas em LB líquido foi submetido à digestão com as enzimas *Xho I* e *Not I* havendo a liberação de dois fragmentos, um correspondente ao vetor pPICZ $\alpha$ A (~3600pb) e outro ao gEs (~1300pb), o que confirmou a clonagem do inserto gEs no vetor. Na análise do resultado do sequenciamento da construção pPICZ $\alpha$ AgEs ficou evidente a inclusão do inserto corretamente no sítio de restrição do vetor (Fig. 13).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

sequenciamento -----ANRNCNTT-----TTNANGNNMCTTGAGAAGATC 30
gE/vetor          GACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGAATTTAACGATTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATC 60
                  *   **                               * * * * *
sequenciamento  AAAAAACAATAATTATTTCGAA-----ACGATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCT 82
gE/vetor          AAAAAACAATAATTATTTCGAAGGATCCAAACGATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCA 120
                  *****                               *****
sequenciamento  GTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGYCAACACTACAACAGAAGATGAA 142
gE/vetor          GTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAA 180
                  *****
sequenciamento  ACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGAT 202
gE/vetor          ACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGAT 240
                  *****
sequenciamento  GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACT 262
gE/vetor          GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACT 300
                  *****
sequenciamento  ATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTC-TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGC 321
gE/vetor          ATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGC 360
                  *****
sequenciamento  TCCAGGTCCAGTTACAGAAGTTCCTAGTCCATCTGCTGAAGTTGGGATCTTTCCACCGA 381
gE/vetor          TCCAGGTCCAGTTACAGAAGTTCCTAGTCCATCTGCTGAAGTTGGGATCTTTCCACCGA 420
                  *****
sequenciamento  AGCCGGAGACGACGACCTGGATGGAGATTGAACGGAGATGATAGGAGGGCTGGATTCCG 441
gE/vetor          AGCCGGAGACGACGACCTGGATGGAGATTGAACGGAGATGATAGGAGGGCTGGATTCCG 480
                  *****
sequenciamento  AAGTGCTTTGGCTTCTCTTAGAGAAGCTCCTCCAGCCATTGGTTAATGTTTCTGAAGG 501
gE/vetor          AAGTGCTTTGGCTTCTCTTAGAGAAGCTCCTCCAGCCATTGGTTAATGTTTCTGAAGG 540
                  *****
sequenciamento  AGCCAACCTTCACCCTTGACGCCAGAGGAGACGGAGCCGTAGTGGCTGGAATTTGGACCTT 561
gE/vetor          AGCCAACCTTCACCCTTGACGCCAGAGGAGACGGAGCCGTAGTGGCTGGAATTTGGACCTT 600
                  *****
sequenciamento  TCTGCCAGTCAGAGGATGCGACGCTGTCGCCGTAACATATGGTCTGCTTTGAAACTGCTTG 621
gE/vetor          TCTGCCAGTCAGAGGATGCGACGCTGTCGCCGTAACATATGGTCTGCTTTGAAACTGCTTG 660
                  *****
sequenciamento  TCATCCTGACCTTGTTTTGGGTAGAGCTTGTGTTCCCGAAGCTCCTGAAAAGAGGTATAGG 681
gE/vetor          TCATCCTGACCTTGTTTTGGGTAGAGCTTGTGTTCCCGAAGCTCCTGAAAAGAGGTATAGG 720
                  *****
sequenciamento  AGACTATTTGCCACCCGAGGTTTCCAAGATTACAAAGGGAGCCACCTATTGTTACCCTTG 741
gE/vetor          AGACTATTTGCCACCCGAGGTT-CCAAGATTACAAAGGGAGCCACCTATTGTTACCCTTG 779
                  *****
sequenciamento  AACGTTGGTCCCCTCATCTGACCGTACGTAGAGCTACACCAAATGACACAGGACTGTACA 801
gE/vetor          AACGTTGGTCCCCTCATCTGACCGTACGTAGAGCTACACCAAATGACACAGGACTGTACA 839
                  *****
sequenciamento  CATTACACGACGCATCCGGTCCAGAGCTGTGTTCTTCGTTGCTGTTGGTGATAGACCAC 861
gE/vetor          CATTACACGACGCATCCGGTCCAGAGCTGTGTTCTTCGTTGCTGTTGGTGATAGACCAC 899
                  *****

```

```

sequenciamento      CAGCTCCATTGGCTCCTGTTGGTCCTGCTAGGCACGAGCCTCGTTTTCCACGCTTTAGGTT 921
qE/vetor             CAGCTCCATTGGCTCCTGTTGGTCCTGCTAGGCACGAGCCTCGTTTTCCACGCTTTAGGTT 959
*****

sequenciamento      TTCACAGTCAACTGTTCTCACCTGGTGATACCTTCGATCTGATGCCAAGAGTGGTGTGTCAG 981
qE/vetor             TTCACAGTCAACTGTTCTCACCTGGTGATACCTTCGATCTGATGCCAAGAGTGGTGTGTCAG 1019
*****

sequenciamento      ACATGGGTGATTCTAGGGAGAACTTTACTGCAACTTTAGACTGGTACTACGCTCGTGCTC 1041
qE/vetor             ACATGGGTGATTCTAGGGAGAACTTTACTGCAACTTTAGACTGGTACTACGCTCGTGCTC 1079
*****

sequenciamento      CTCCTCGTTGTTTGTATATTACGTTTATGAACCTTGCATCTATCATCCCAGAGCACCAG 1101
qE/vetor             CTCCTCGTTGTTTGTATATTACGTTTATGAACCTTGCATCTATCATCCCAGAGCACCAG 1139
*****

sequenciamento      AATGCTTAAGACCAGTGCACCCAGCTTGTCTTTTCACATCCCAGCTAGGGCTAGATTGG 1161
qE/vetor             AATGCTTAAGACCAGTGCACCCAGCTTGTCTTTTCACATCCCAGCTAGGGCTAGATTGG 1199
*****

sequenciamento      TGGCTAGAAGGGCATAACGCTTCTTGCTCTCCCCTGTTGGGAGACAGGTGGTTAACTGCCT 1221
qE/vetor             TGGCTAGAAGGGCATAACGCTTCTTGCTCTCCCCTGTTGGGAGACAGGTGGTTAACTGCCT 1259
*****

sequenciamento      GTCCCTTCGACGCTTTCGGTGAGGAAGTCCACACAAATGCCACCCGAGATGAGTCTGGTC 1281
qE/vetor             GTCCCTTCGACGCTTTCGGTGAGGAAGTCCACACAAATGCCACCCGAGATGAGTCTGGTC 1319
*****

sequenciamento      TTTACGTACTTGTAAATGACTCATAATGGACATGTTGCAACTTGGGACTACACTTTGGTGG 1341
qE/vetor             TTTACGTACTTGTAAATGACTCATAATGGACATGTTGCAACTTGGGACTACACTTTGGTGG 1379
*****

sequenciamento      CAACTGCTGCAGAGTACGTTACTGTGATAAAGGAACTGACTGCCCCAGCTAGAGCACCAG 1401
qE/vetor             CAACTGCTGCAGAGTACGTTACTGTGATAAAGGAACTGACTGCCCCAGCTAGAGCACCAG 1439
*****

sequenciamento      GTACTCCTTGGGGACCAGGTGGAGGAGATGACGCAATCTATGTTGATGGTGTACTACTC 1461
qE/vetor             GTACTCCTTGGGGACCAGGTGGAGGAGATGACGCAATCTATGTTGATGGTGTACTACTC 1499
*****

sequenciamento      CTGCACCTCCAGCCAGACCTTGGAAATCCACATCATCATCATCATCATCATCATCATT 1521
qE/vetor             CTGCACCTCCAGCCAGACCTTGGAAATCCACATCATCATCATCATCATCATCATCATCATT 1559
*****

sequenciamento      AATCTAGAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAATACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA 1581
qE/vetor             AATCTAGAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAATACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA 1576
*****

sequenciamento      GCGCCGTCGACCATCATCATCATCNCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGNCITGTTCCCT 1641
qE/vetor             --GCCG-CGA-----ATTAATTC----GCCTTAGACATGACTGTTCCCT 1612
      **** *          * * * *

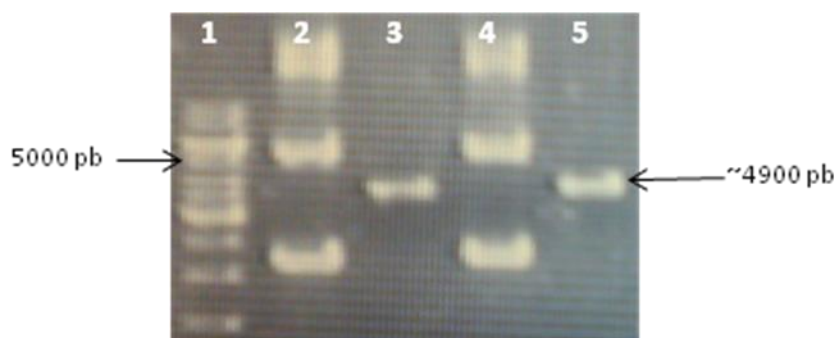
sequenciamento      CAGTTCAAGTTGGGCACT-ACGAGAAGACCGTCTTGYYNRR----- 1683
qE/vetor             CAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGT 1672
*****

sequenciamento      -----
qE/vetor             CAGAATGCCATTG 1686

```

**Figura 13.** Análise comparativa do sequenciamento da construção pPICZ $\alpha$ AgEs com a sequência gEs otimizada, utilizando o software Clustal 2.1. A sequência selecionada em azul é referente ao alinhamento da gEs e a porção em vermelho é referente ao vetor, indicando a inserção correta da gEs no pPICZ $\alpha$ A.

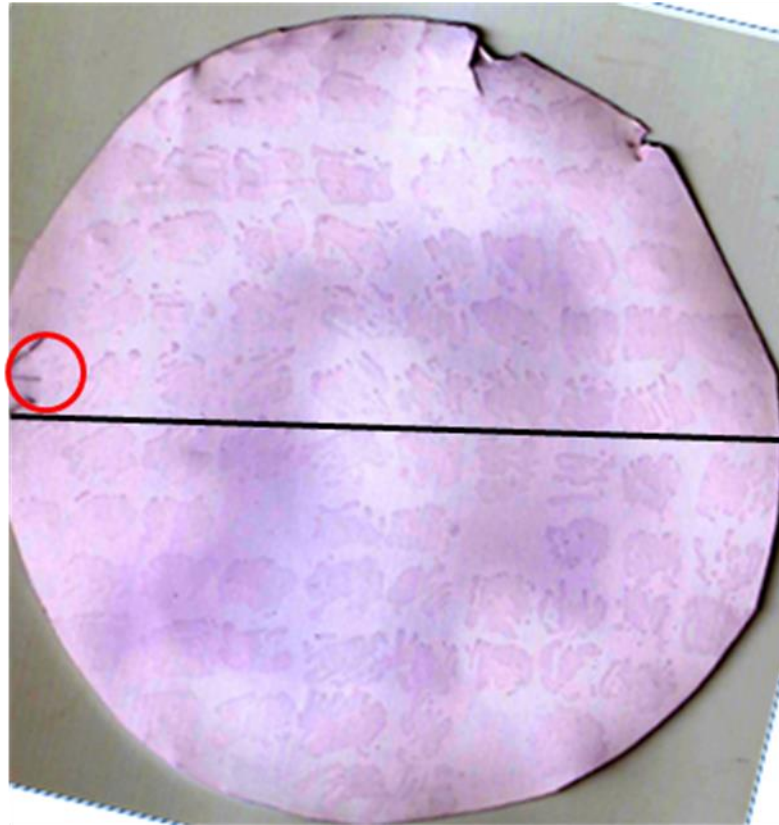
O DNA plasmidial extraído do clone obtido com a construção pPICZ $\alpha$ AgEs, já linearizado e purificado a partir do gel, resultou em 173 ng/ $\mu$ L de DNA em 600 $\mu$ L, sendo necessário concentrar esse DNA a vácuo (*Centrivap DNA concentrator*, Labconco®) até 2  $\mu$ g/ $\mu$ L em 30  $\mu$ L (Fig. 14).



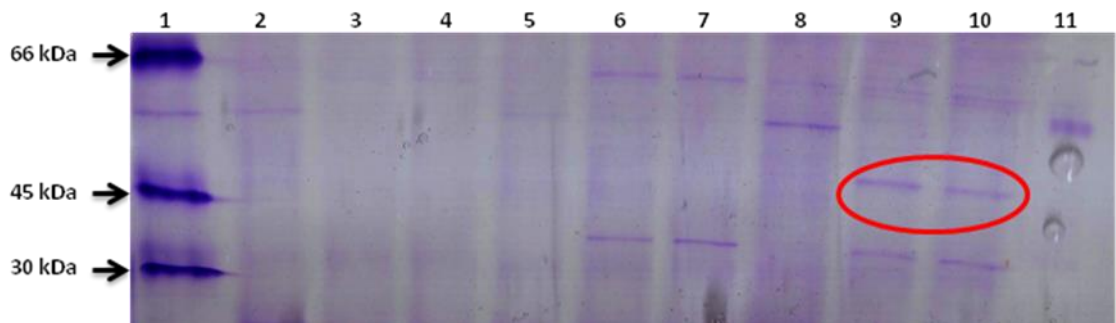
**Figura 14.** Digestão de duas construções pPICZ $\alpha$ AgEs com a enzima *Sac I* cortando o vetor em único sítio de restrição. Marcador de pares de bases de 1 kb (1); DNA plasmidial extraído de dois clones (2 e 4); DNA plasmidial linearizado após a digestão (3 e 5).

Como resultado da eletroporação das duas linhagens de *P. pastoris* observou-se crescimento ao quarto dia de aproximadamente 100 colônias em cada placa. 45 colônias de cada linhagem, KM71H e X-33, cresceram na seleção dos clones com múltiplas cópias.

O *colony blot* demonstrou a identificação da calda de histidina presente na gEr, e que os clones das linhagens KM71H e X-33 expressaram a proteína gEr de forma semelhante (Fig. 15). Dois clones de cada linhagem foram escolhidos aleatoriamente para indução em média escala. A análise do gel de SDS-PAGE das proteínas precipitadas do sobrenadante dos cultivos demonstrou a presença de uma proteína de aproximadamente 50kda, correspondente a gEr, a partir de 72 h de indução dos clones (Fig. 16).



**Figura 15.** Membrana de PVDF sensibilizada com anticorpo anti-His e revelada com BCIP®/NBT. Identificação da calda de histidina na gEr expressa nas diferentes colônias das linhagens X-33 (colônias acima da linha) e KM71H (colônias abaixo da linha), demonstrando semelhante expressão entre elas. Destacado em vermelho o controle negativo da linhagem X-33.



**Figura 16.** Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Comassie. marcador de peso molecular (1); clone pPICZ $\alpha$ AgEs.03 em 24h, 48h e 72h, (2, 5 e 8, respectivamente); clone pPICZ $\alpha$ AgEs.05 em 24h, 48h e 72h, (3, 6 e 9, respectivamente); pPICZ $\alpha$ AgEs.15 em 24h, 48h e 72h, (4, 7 e 10, respectivamente).

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi adotada a estratégia de clonar o gene sintético da proteína gE do SHV1 em *P. pastoris* usando gene sintético códon otimizado. Estratégias convencionais de clonagem de genes virais utilizam PCR para isolar o gene de interesse, a partir de amostra biológica, e construir a sequência de clonagem com os sítios de restrição adequados. Isto implica em risco de erros na sequência nucleotídica, mesmo com o uso de enzima Taq DNA Polimerase de alta fidelidade, e de exposição a agentes infecciosos. Todo esse trabalho requer tempo e custo consideráveis, além de se tornar empecilho em algumas estratégias de clonagem (AL-MUBARAK, ZHOU e CHOWDHURY, 2004).

Por outro lado, várias são as vantagens no uso do gene sintético. Ao receber a sequência de clonagem já com os sítios de restrição inseridos e clonada em vetor de passagem evita os erros decorrentes da construção convencional de sequências, evita o risco de contaminação no manuseio de material biológico, além de facilitar o processo de clonagem e diminuir relativamente os custos. Além disso, o uso do gene sintético também permite adequar a sequência de clonagem para um fragmento com maior facilidade de tradução. A substituição dos códons originais por códons preferenciais para o hospedeiro de clonagem, no caso *P. pastoris*, permite melhor taxa de tradução e, conseqüentemente, maior produtividade na produção da proteína recombinante. Para a expressão de algumas proteínas o uso de sequência otimizada é essencial para que ocorra a síntese proteica (BAZAN et al., 2009).

O uso da levedura *P. pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas tem se estabelecido nos últimos anos como sistema eficiente e que apresenta bom rendimento proteico a, relativamente, baixo custo. Este sistema apresenta ainda as vantagens de ser uma levedura de fácil manipulação genética, metilotrófica, com alto rendimento, e com fácil recuperação da proteína recombinante, que pode ser secretada para o meio extracelular e purificada por processos simples através de centrifugação ou diálise, pelo fato dessa levedura secretar baixa taxa de proteínas nativas (AO et al., 2003; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

As opções de vetores de clonagem disponíveis comercialmente que tenham a habilidade de secretar a proteína recombinante são diversas. O pPICZ $\alpha$ A, escolhido neste trabalho, que possui o sinal  $\alpha$ -MF de secreção e a marca de seleção *Sh ble*, demonstrou eficiência na

clonagem, na expressão, na seleção de clones com múltiplas cópias e na secreção da gEr, tanto nos clones da linhagem X-33 como nos clones da linhagem KM71H, resultado obtido também por Coutinho (2011) e Silva (2012), trabalhando com a clonagem de genes dos vitus da anemia Infeciosa Equina e Circovírus suíno, respectivamente.

A utilização da linhagem X-33 da *P. pastoris* permitiu a formação de clones com fenótipo MUT<sup>+</sup>, que são desejáveis na produção de certas proteínas heterólogas e na obtenção de alta produtividade proteica, o que é favorável na produção comercial em grande escala. Já o fenótipo MUT<sup>S</sup>, obtido na linhagem KM71H, permite a expressão mais lenta da proteína recombinante realizando as etapas pós-traducionais de forma mais refinada, o que é necessário para certas proteínas que precisem passar por essas etapas para serem secretadas de forma imunorreativa (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DALY e HEARN, 2005).

O *colony blot* demonstrou a presença da gEr através da identificação da calda de histidina. Este imunoblotting seria capaz de identificar clones com alta expressão da gEr, possibilitando a escolha desses clones para indução em frascos, como foi observado por Mariz (2012). Porém, a expressão da gEr foi semelhante entre os clones de ambas linhagens, o que já era esperado, pois em uma primeira seleção, os clones foram cultivados em alta concentração de zeocina, sendo escolhidos apenas os mais resistentes, ou seja, com múltiplas cópias do cassete de expressão (CREEG, VEDVICK e RASCHKE, 1993).

A máxima expressão da gEr observada 72 h após o início da indução também foi relatada por Ao e colaboradores (2003), ao verificar que 66,67% das proteínas do sobrenadante correspondia a proteína recombinante. Quando expressa em Baculovirus a proteína recombinante também apresentou o melhor nível de expressão 72 h após o início da indução (SEBASTIÁN, et al., 2008).

A gEr não foi identificada no *Western blot* quando utilizado anticorpo anti-His, isso pode ser justificado pela não exposição da calda de histidina após a desnaturação por calor da proteína recombinante para teste no *Western blot*. Essa ausência de sinal pode ser atribuída ainda a perdas proteicas durante a manipulação das amostras ou até mesmo por baixo nível de expressão, sugerindo a otimização desse sistema de expressão. Mas, como já foi observado por Silva (2012) e Jesus (2012), a não identificação da calda de histidina no *Western blot* não indica que a proteína não está presente ou que ela não seja capaz de expressar seus epítomos e reconhecer

anticorpos específicos.

O gene gE do SHV1 já foi clonado por completo por Dambros e colaboradores (2007), em sistema de expressão usando Baculovirus, porém esse sistema é dispendioso apresentando elevado custo/benefício (PRUD'HOMME et al., 1997). Alguns epítomos da gE já foram clonados em *P. pastoris* por Ao e colaboradores (2003), contudo, não apresentou sensibilidade ideal. O uso de partes de uma proteína em estratégia de imunodiagnóstico pode resultar em teste de baixa sensibilidade, por não apresentar epítomos conformacionais imunorreativos (VAN OIRSCHOT, 1986), o que já foi evidenciado para gE do SHV1 (SERENA et al., 2011; AO et al., 2003). A sequência clonada neste trabalho corresponde a porção extracelular da gE, que tem se mostrado altamente imunoreativa em testes imunoenzimáticos - ELISA (SEBASTIÁN, et al., 2008) . Espera-se que ELISA utilizando a gEr, expressa em *P. pastoris*, deve apresentar alta sensibilidade e especificidade, por esta proteína apresentar a conformação natural, garantida pelo uso de sistema de expressão eucarioto que realiza as etapas pós-traducionais necessárias à formação de uma proteína imunoreativa (AO et al., 2003; COUTINHO, 2011).

São necessários testes para padronizar o ELISA recombinante com a gEr, que poderá ser utilizado no diagnóstico da DA. Este ELISA será capaz de diferenciar animais vacinados com vacinas deletadas de animais naturalmente infectados, respeitando as normas brasileiras que regem as estratégias de controle da DA.



## 7. CONCLUSÃO

O sistema de clonagem e expressão de proteínas heterólogas utilizando a levedura *P. pastoris* foi eficiente para produção, na forma imunorreativa, da proteína recombinante gE (gEr) do vírus da Doença de Aujeszky.

## 8. REFERÊNCIAS

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. 2013. Disponível em: <http://www.abipecs.com.br>. Acessado em 25/01/2013.

AL-MUBARAK, A., ZHOU, Y., CHOWDHURY, S. I. A Glycine-Rich Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) gE-Specific Epitope within the Ectodomain is Important for BHV-5 Neurovirulence. **Journal of Virology**. v.78, p. 4806-4816, 2004.

AO, J., WANG, J., CHEN, X., WANG, X., LONG, Q. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA. **Journal of Virological Methods**. v. 114, p. 145–150, 2003.

AUJESZKY, A.; Ueber eine new Infektions krankheit bei Haustieren. Zentbl. Bakt. ParasitKde.1902. In LEE e WILSON, 1979

BAZAN, S. B., CHAVEZ, A. A. M., AIRES, K. A., CIANCIARULLO, A. M., GARCEA, R. L., HO, P. L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol*. v. 154, p. 1609-1617, 2009.

BRASIL - Instrução Normativa Nº 19, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002. DOU de 01/03/2002 Seção 1.

BRASIL - Instrução Normativa Nº 8, DE 03 DE ABRIL DE 2007. Diário Oficial da União de 10/04/2007, Seção 1, Página 1.

BRASIL. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>. Acessado em 23/01/2013.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>)

CEREGHINO, J. L. and GREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, vol. 24, p. 45-66, 2001.

CEREGUINO, G.L. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **current opinion in biotechnology**. v. 13, p. 329-332, 2002.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; AMARAL, A. L.; VENTURA, L. V.; BORTOLUZZI, N. M. H. Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitoas de reposição. **Ciência Rural, Santa Maria**. vol. 38, n. 3, p. 749-754, 2008.

CIACCI-ZANELLA, J. R., FLORES, E. F. Vacinas com marcadores antigênicos contra o Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e o Vírus da Doença de Aujeszky. **Ciência Rural**. v. 25, n. 2, p. 331-341, 1995.

COUTINHO, L. C. A. Produção da proteína p26 do vírus da Anemia Infecciosa Equina em levedura *Pichia pastoris*. 2011. 91p. Dissertação Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.

CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/technology**. v. 11, p. 905-910, 1993

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

DAMASCENO, L. M., HUANG, C. J., BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Microbiology Biotechnology**. v. 93, p. 31-39, 2012.

DAMBROS, R. M. F.; RIBEIRO, B. M.; AGUIAR, R. W. S.; SCHAEFER, R.; ESTEVES, P. A. PERECMANS, S.; SIMON, N. L.; SILVA, N. C.; COLDEBELLA, M.; CIACCI-ZANELLA, J. R. Clonning and expression of Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE) in a baculovirus system. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol. 38, p. 494-499, 2007.

DEMAIN, A. L., VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 297-306, 2009.

FONSECA JR, A. A.; DIAS, N. L.; LEITE, R. C.; HEINEMANN, M. B.; REIS, J. K. P. PCR duplex para diferenciação de amostras vacinais e selvagens do vírus da doença de Aujeszky. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 62, p. 1259-1262, 2010.

FONSECA JÚNIOR, A. A. Epidemiologia molecular de amostras brasileiras do vírus da doença de Aujeszky. 2008. 53p. Dissertação Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

GOODNOUGH, M. C., HAMMER, B., SUGIYAMA, H., JOHNSON, E. A. Colony immunoblot assay of Botulinal toxin. **Appl Environ Microbiol**. v. 59, p. 2339-2342, 1993.

GROFF, F. H. S. Epidemiologia e controle dos focos de doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. 2005. 45p. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria, Medicina Veterinária.

GUSTAFSSON, C., GOVINDARAJAN, S. and MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **TRENDS in Biotechnology**. v. 22, p. 346-353, 2004.

HIPÓLITO, O., FREITAS, M .G., e FIGUEIREDO, J. B. Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos. 1965. 4ª Ed. Edições Melhoramentos, São Paulo.

ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), 2011. Virology Division – IUMS. <[http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode\\_id=20113887&taxa\\_name=Suid%20herpesvirus%201](http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20113887&taxa_name=Suid%20herpesvirus%201)> Acesso em 05/02/2013.

INVITROGEN. *Pichia* sxpession kit. A manual of methods for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. **Catague n K1710-01**. San Diego, USA: Invitrogen Co, 2002.

JESUS, A. L. S. Desenvolvimento e Avaliação de Estratégias Vacinais contra a Papilomatose Bovina e Sarcóide Equino baseada em *virus-like particles* e imunização genética. 2012. Doutorado em andamento em Genética. Uiversidade Federal de Pernambuco.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*.

**Curr. Opin. Biotechnol.** v.6, p. 494–500, 1995.

KIMMAN, T. G., DE LEEUW, O., KOCHAN, G., SZEWCZYK, B. W., ROOIJ, E. V., JACOBS, L., KRAMPS, J. A., PEETERS, B. An Indirect Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Baculovirus-Expressed Antigen for the Detection of Antibodies to Glycoprotein E of Pseudorabies Virus and Comparison of the Method with Blocking ELISAs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 3, p. 167-174, 1996.

KINKER, D. R., SWENSON, S. L., WU, L., ZIMMERMAN, J. J. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. **Veterinary Microbiology**. v. 55, p. 99-106, 1997.

KLUPP, B. G.; HENGARTHER, C. J.; METTENLEITER, T. C.; ENQUIST, L. W. Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome. **Journal of Virology**. v. 78, n. 1, p. 424-440, 2004.

LEE, J. Y. S. e WILSON, M. R. A Review of Pseudorabies (Aujeszky's disease) in pigs. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 20, n. 3, p. 65-69, 1979.

MA, K. M. W.; LAGER, J. A.; RICHT, W. C.; STOFFREGEN, F.; ZHOU, K. Y. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. **Journal of Veterinary Diagnostics Invest.** v. 20, p. 440-447, 2008.

MACAULEY-PATRICK S., FAZENDA, M. L., McNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. v. 22, p. 249-270, 2005.

MARIZ, F. C. Expressão do gene L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris* empregando promotor induzível P<sub>AOX1</sub> e promotor constitutivo P<sub>PGK1</sub> visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal. 2012. 115p. Dissertação Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.

MENGELING, W. L.; BROCKMEIER, S. L.; LAGER, K. M.; VORWALD, A. C. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. **Veterinary Microbiology**. n. 55, p. 49-60, 1997.

METTENLEITER, T. C. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 54, p. 221-229, 1996.

METTENLEITER, T. C., Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**. v. 92, p. 197-206, 2003.

METTENLEITER, T. C.; LUKÁCS, N.; RIZHA, H. J. Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. **Journal of Virology**, vol. 56, n. 1, p. 307-311, 1985.

McCAW, M. B., OSORIO, F. A., WHEELER, J., XU, J., ERICKSON, G. A. Effect of maternally acquired Aujeszky's disease (pseudorabies) virus-specific antibody in pigs on establishment of latency and seroconversion to differential glycoproteins after low dose challenge. **Veterinary Microbiology**. v. 55, 1997.

McNULTY, D. E., CLAFFEE, B. A., HUDDLESTON, M. J., KANE, J. F. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** v. 27, p. 365-374, 2003.

MORENKOV, O. S., FODOR, N., SOBKO, Y. A., FODOR, I. Immunological Characterization of Glycoprotein E of Aujeszky's disease virus. **Virus Research**. v. 51, p. 65-79, 1997a.

MORENKOV, O. S., FODOR, N., FODOR, I. Indirect ELISAs based on recombinant and affinity-purified glycoprotein e of Aujeszky's Disease Virus to differentiate between vaccinated and infected animals. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 47, p. 137-150, 1999.

MORES, N., AMARAL, A. L., VENTURA, L., ZANELLA, J. R. C., MORI, A., DAMBRÓS, J. A., PROVENZANO, G. Disseminação do vírus da doença de Aujeszky, envolvendo o comércio de reprodutores suínos de reposição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1382-1387, 2007.

OIE - Listed diseases. 2011.

OIE (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS) 2004. Disponível em: <<http://www.oie.int/handistatus>>. Acesso em 18 set. 2010.

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines Terrestrial Animals:Chap 2.1.2. Aujeszky's disease. 2012.

OREN, S. L., SWENSON, S. L., KINKER, D. R., HILL, H. T., HU, H., ZIMMERMAN, J. Evaluation of serological pseudorabies tests for the detection of antibodies during early infection. **J Vet Diagn Invest.** v. 5, p. 529-533, 1993.

POMERANZ, L. E.; REYNOLDS, A. E.; HENGARTNER, C. J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. **Microbiology and Molecular biology reviews**, vol. 69, n. 3, p. 462-500, 2005.

PRUD'HOMME, I., ZHOU, E. M., TRAYKOVA, M., TROTTER, H., CHAN, M., AFSHAR, A., e HARDING, M. J. Production of a baculovirus-derived gp50 protein and utilization in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pseudorabies virus. **Can J Vet Res.** v. 61, n. 4, p. 286–291, 1997.

PUSIC, I., PRODANOV-RADULOVIC, J., DOSEN, R., STOJANOV, I., STOJANOVIC, D., PETROVIC, T. Epizootical Characteristics of Aujeszky's Disease in Vojvodina Region and Biosecurity Concernes. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, p. 875-882 , 2011.

RO, L. H., LAI, S. S., HWANG, W. L., CHOU, H. H., HUANG, J. N., CHANG, E. L., YANG, H. L. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in Escherichia coli and its use as antigen in diagnostic assays. **Am J Vet Res.** v. 5, p. 56-61, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 800p.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características da Carne Suína. **Universidade Federal do Espírito Santo – UFES.** Boletim Técnico, 2007.

SEBASTIÁN, S. G., FILGUEIRA, D. M. P., CASADO, E. G., NUNEZ, M. C., RAMOSA, I. S., TABARÉSC, E., ESCRIBANO, J. M. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. **Journal of Virological Methods.** v. 153, p. 29-35, 2008.

SERENA, M. S., METZ, G. E., CORVA, S. G., MÓRTOLO, E. C., ECHEVERRÍA, M. G. A differential ELISA based on recombinant immunodominant epitopes of the gE gene of SHV-1 in a baculovirus–insect cell system to

discriminate between pigs infected naturally with pseudorabies and vaccinated pigs. **Journal of Virological Methods**. v. 171, p. 388-393, 2011.

SHULER M. L. e KARGI F. Utilizing Genetically Engineered Organism, 2 nd edition, Prentice Hall, 2001.

SILVA, A. D.; SORTICA, V. A.; BRAGA, A. C.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P. A.; RIJSEWIJK, F.; ROSA, J. C. A.; BATISTA, H. B. C. R.; OLIVEIRA, A. P.; ROEHE, P. M. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. vol. 25, n. 1, p. 21-24, 2005.

SILVA, J. G. Desenvolvimento de Estratégias Vacinais contra circovirose suína tipo 2 baseada em *Virus-like particles* e Imunização genética. 2012. Doutorado em andamento em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco.

SMITH, G. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 66, p. 153–176, 2012.

VAN ORISCHOT, J. T.; RZIHA, H. J.; MOONEN, P. J. L. M.; POL, J. M. A.; VAN ZAANE, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **J. Gen. Virology**. Short communication. v. 67, p. 1179-1182, 1986.

WEIGEL, R.M.; HAHN, E. C.; SCHERBA, G. Survival and immunization of raccoons after exposure to pseudorabies (Aujeszky's disease) virus gene-deleted vaccines. **Veterinary Microbiology**. v. 92, p. 19-24, 2003.

Anjali YADAVA, A. e OCKENHOUSE, C. F. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. **Infection and Immunity**. v. 71, n° 9, p. 4961-4969, 2003.

ZANELLA, J. R. C. e MORÉS, N. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 294. 2001.