

**LUCIANA CAVALCANTI DE ARRUDA COUTINHO**

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA P26 DO VÍRUS DA ANEMIA  
INFECCIOSA EQUINA EM LEVEDURA *Pichia pastoris***

**RECIFE**

**2011**



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

**LUCIANA CAVALCANTI DE ARRUDA COUTINHO**

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA P26 DO VÍRUS DA ANEMIA  
INFECCIOSA EQUINA EM LEVEDURA *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 do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

**RECIFE**

**2011**

Ficha Catalográfica

C871p Coutinho, Luciana Cavalcanti de Arruda  
Produção da proteína P26 do vírus da anemia infecciosa  
equina em levedura *Pichia pastoris* / Luciana Cavalcanti de  
Arruda Coutinho. -- 2011.  
91 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Medicina Veterinária, Recife, 2011.  
Referências.

1. Proteína P26 2. *Pichia pastoris* 3. Vírus da anemia  
infecciosa equina (VAIE) I. Castro, Roberto Soares de,  
orientador II. Título

CDD 636.108969

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

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA P26 DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA  
EQUINA EM LEVEDURA *Pichia pastoris***

Dissertação de Mestrado elaborada por

**LUCIANA CAVALCANTI DE ARRUDA COUTINHO**

Aprovada em 22 / 02 / 2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. ROBERTO SOARES DE CASTRO  
Orientador - Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

---

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA CARVALHO MAIA  
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

---

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS DE FREITAS  
Departamento de Genética da UFPE

---

Dra. ÉRICA PAES BARRETO XAVIER MORAES  
Pós-doutoranda PNPd/CAPES

*“O orgulho dos homens que julgam saber tudo e não admitem existir coisa alguma que lhes esteja acima do entendimento, leva à cegueira do materialismo.”*

***Espírito Verdade***

## DEDICATÓRIA

*A DEUS, por ter me dado saúde,  
força e coragem para enfrentar todos  
os desafios propostos...*

*Ao meu pai “in memoriam”, por estar  
sempre comigo guiando meus passos...*

*Aos meus filhos, marido e  
enteados, fontes de motivação para o  
desenvolvimento das atividades  
durante todo o período.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que torna os sonhos possíveis, onde encontro o conforto em todos os momentos desta caminhada;

Ao meu pai “*in memoriam*” exemplo de honestidade, dignidade, integridade e amor incondicional;

Aos familiares, em especial minha mãe Maria Lúcia, e irmã Andréa, por acreditarem em mim e pela torcida para esta conquista;

Aos meus filhos Heitor Coutinho Fontenele e Artur Coutinho Fontenele por serem a inspiração para a busca do desenvolvimento e evolução de meu espírito, e ainda, por representarem fonte de amor inesgotável de onde tiro forças para seguir em frente;

Ao meu marido Antônio Tadeu Maia Fontenele por acreditar em mim, por ter tido paciência e por ter contribuído com sua maturidade profissional, me mostrando caminhos mais claros em busca de meus objetivos.

Aos meus queridos enteados João Victor Muribeca Fontenele e Rodrigo Muribeca Fontenele, por quem guardo muito amor e carinho, por muito terem me ensinado, e por também me servirem de estímulo na procura em fazer o melhor;

A minha avó materna Lindaura Cavalcanti, símbolo de força e perseverança.

Ao Professor Roberto Soares de Castro, pessoa de caráter incontestável, homem ético e respeitoso que me abriu portas, me confiando tarefas desafiadoras, me oferecendo oportunidade para o trabalho e desenvolvimento profissional;

A Sra. Oneide pela paciência e compreensão nas dificuldades das atividades administrativas.

A minha funcionária Maria Anunciada da Silva, que me proporcionou condições para que eu pudesse exercer minhas atividades de maneira tranquila, pois, sabia que minha casa e meus filhos estavam sendo bem cuidados;

A minha querida amiga Eliane Coimbra por ter me assistido em momentos difíceis de minha vida pessoal e profissional;

Ao Sérgio, colega de grande estima, que sempre acreditou e sempre me incentivou;

A amiga Angélica que me presenteou com sua forma serena de enxergar o mundo, me ensinando preciosas lições, meus sinceros agradecimentos;

A minha colega de trabalho Karin Fontes que trabalhou comigo, com quem troquei muitas idéias e muito aprendi;

Aos meus amigos Filipe Mariz, André Luiz e Marcelo Nazário que contribuíram de maneira direta e significativa para a obtenção dos resultados, e para quem devo muitas lições aprendidas;

Ao Professor Antonio Carlos de Freitas que estive de prontidão, pacientemente disponível para todos os questionamentos. Ao mesmo tempo em que proferia palavras de conforto e esperança, também sabia ser firme nos momentos necessários, trazendo-nos a confiança e a segurança que precisávamos para seguirmos em frente, sem titubear;

Aos meus colegas de laboratório da UFPE Carol, Jack (Anjonay), Naiara (Nai), Breno, Janaine (Jane), Barbosinha, Élide (queridinha), Pavla, Billy, Katka, Cybelle, Bárbara, cada um deles possui um espaço reservado em meu coração. Agradeço a Deus por ter me dado o grande presente da convivência com pessoas tão especiais, uma verdadeira equipe;

Ao Professor Rinaldo Aparecido Mota que me proporcionou a oportunidade de contribuir, com a consolidação da parceria do Departamento de Medicina Veterinária (UFRPE), com o Departamento de Genética da UFPE, relação esta, que vem rendendo bons frutos para ambas as instituições;

A Professora Rita de Cássia sempre disposta a contribuir de maneira positiva.

Ao colega André Ribas do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética da UFPE, sempre atencioso e prestativo.

A Dra. Érica Moraes por ter me ajudado nos primeiros momentos junto à equipe da UFPE.

Aos funcionários da UFPE Dona Zizi e Seu Romildo, sempre trabalhando com disposição e simpatia;

A Gissandra pela amizade e experiências passadas em suas breves visitas;

A todos os integrantes da equipe do Laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco que auxiliaram durante a realização deste projeto, em especial a Cosme e Daniela;

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pelo trabalho com profissionalismo realizado nestes últimos anos, em especial a Tom, funcionário dedicado e atencioso, um ótimo ser humano, meus sinceros agradecimentos.

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



## RESUMO

A Anemia Infeciosa Equina (AIE) é uma importante lentivirose em equídeos, caracterizada por causar um quadro crônico e degenerativo, trazendo muitos prejuízos econômicos. Considera-se que animais expostos aos vírus e submetidos à prova sorológica, quando considerados positivos, assim permanecerão por toda vida, fato que justifica a grande preocupação e vigilância da doença. Neste trabalho objetivou-se utilizar células da levedura *Pichia pastoris* para produção da proteína p26 da região *gag* do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) para fins de diagnóstico. O gene da proteína p26 do VAIE foi sintetizado e otimizado por meio da utilização de códons preferenciais para ser expresso em célula da levedura *Pichia pastoris*. O inserto foi subclonado em vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A após digestão enzimática apropriada. Células de *P. pastoris* transformadas com a construção pPICZ $\alpha$ Ap26 foram induzidas a expressarem a proteína recombinante p26 sob regulação do promotor *AOXI* através da adição de metanol ao meio de cultura. A análise quanto à produção da proteína recombinante e sua identificação foram realizadas através de RT-PCR e Dot blotting utilizando anticorpo anti-His.

**Palavras-chave:** *Pichia pastoris*, VAIE, expressão, p26.

## ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is an important lentivirose in horses, characterized by a chronic and degenerative profile, causing many economic losses. It is considered that animals exposed to the virus and underwent serological evidence, when considered positive, remain so throughout life, which justifies the great concern and disease surveillance. The aim of this study was to use *Pichia pastoris* yeast cells for protein production of p26 *gag* region of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) for diagnostic purposes. The *p26* gene of EIAV was optimized through the codon usage strategy to be expressed in cells of the *Pichia pastoris* yeast. The insert was cloned into pPICZ $\alpha$ A expression vector after appropriate enzymatic digestion. *P. pastoris* transformed with the construction pPICZ $\alpha$ Ap26 were induced to express the p26 recombinant protein under the regulation of *AOX1* promoter by adding methanol to the culture medium. The p26 recombinant protein was identified by RT-PCR and Dot blotting assay using anti-His antibody. Further studies are needed to optimize bioprocesses involved in this system in order to obtain a stable, purified and useful antigen for diagnostic purposes.

**Key-words:** *Pichia pastoris*, EIAV, expression, *p26*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

	Página
<b>Revisão de Literatura</b>	
<b>Figura 1</b> Ilustração esquemática de um vírion (VAIE).	22
<b>Figura 2</b> Simetria capsidial de lentivírus por (ME e modelo de arranjo).	23
<b>Figura 3</b> Representação linear da organização do genoma de VAIE.	23
<b>Figura 4</b> Brotamento de partículas lentivirais a partir de células de defesa.	24
<b>Figura 5</b> Representação esquemática do ciclo viral de VAIE.	25
<b>Figura 6</b> Representação esquemática de integração do DNA proviral de VAIE ao genoma de suas células-alvo.	26
<b>Figura 7</b> Distribuição da AIE no mundo.	32
<b>Figura 8</b> Prova sorológica IDGA.	33
<b>Figura 9</b> Destino das carcaças dos equinos com AIE após o óbito confirmado.	38
<b>Figura 10</b> Modelos cristalográficos de associações oligoméricas da proteína capsidial p26 de VAIE.	40
<b>Figura 11</b> Representação esquemática da metabolização do metanol <i>P. pastoris</i> .	45
<b>Figura 12</b> Diagrama representando processamento e secreção de proteínas heterólogas em levedura.	47

<b>Figura 13</b>	Representação esquemática de vetor de expressão em <i>P. pastoris</i> , série pPICZ $\alpha$ .	49
------------------	--	----

## **Artigo**

<b>Figura 1</b>	Cloning and expression of EIAV p26 protein.	88
-----------------	---	----

<b>Figura 2</b>	Immunodetection reactions of p26 protein by Dot blotting.	88
-----------------	---	----

<b>Figura 3</b>	Agar gel immunodiffusion with recombinant EIAV p26.	88
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAHSA	<i>American Association for Horsemanship Safety</i>
AIE	Anemia Infecciosa Equina
ALP	Via de secreção de proteína fosfatase alcalina ( <i>Alcaline Phosphatase Pathway</i> )
<i>AOX1</i> e <i>AOX2</i>	Genes codificantes da enzima álcool oxidase isoformas 1 e 2
<i>ARG4</i>	Gene codificante da enzima arginosuccinato liase
A -T	Nucleotídeos adenina e timina
CAIEPAN	Programa de Controle e Prevenção da Anemia Infecciosa Equina do Pantanal
CD8+	Linhagem de células de defesa do sistema complemento (linfócitos T citotóxicos)
cDNA	DNA complementar
CECAIE	Comissão Estadual de Controle da AIE
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CP	<i>carboxy-peptidase</i> (sequência sinal vacuolar envolvida no destino da proteína recombinante)
CPY	<i>carboxi-peptidase yeast</i> (via de secreção de proteína em leveduras)
d.p.i	Dias pós infecção
DH5 $\alpha$	Linhagem de células de <i>Escherichia coli</i> livre de plasmídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO 600nm	Densidade óptica de 600 nanômetros
ELISA	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELR1	Receptores lentivirais celulares equinos 1
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum associated protein degradation</i> (sistema de controle de qualidade do RE que sinaliza destino da proteína).
<i>env</i>	Gene codificante para proteínas de VAIE
F	Primer forward
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

<i>FDL1</i>	Promotor envolvido no controle da expressão da enzima formaldeído desidrogenase (metabolismo do metanol)
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
G eC	Nucleotídeos guanina e citosina
<i>gag</i>	Região do genoma do VAIE
<i>GAP</i>	Gene codificante da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GS115	Linhagem de levedura <i>Pichia pastoris</i>
GTA	Guia de Trânsito Animal
HI	Inibição de Hemaglutinação
<i>HIS4</i>	Gene codificante da enzima multifuncional que catalisa quatro passos na biossíntese da histidina.
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV – 1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HSA	Soro albumina humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA	Imunodifusão em gel de Agar
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
KM71H	Linhagem de células da levedura <i>Pichia pastoris</i>
LTR	Região do genoma de VAIE ( <i>Long Terminal Repeats</i> )
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ME	Microscopia eletrônica
Mut	Fenótipo quanto à utilização de metanol ( <i>Methanol utilization</i> )
Mut <sup>S</sup>	Fenótipo quanto à utilização de metanol ( <i>Methanol utilization</i> ) <i>slow</i>
Mut <sup>+</sup>	Fenótipo quanto à utilização de metanol ( <i>Methanol utilization</i> ) <i>plus</i>
Mut <sup>-</sup>	Fenótipo quanto à utilização de metanol ( <i>Methanol utilization minus</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NotI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>NotI</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
<i>PEX8</i>	Gene codificante da proteína de matriz peroxissomal

<i>PGK1</i>	Promotor envolvido no controle da expressão da enzima 3-fosfoglicerato quinase (via glicolítica e glicogênica)
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
<i>pol</i>	Gene codificante para proteínas de VAIE
pPICZA	Vetor de expressão em levedura <i>Pichia pastoris</i>
pPICZαAp26	Construção de cassete de expressão
<i>pr</i>	Poliproteína precursora capaz de originar outras proteínas de VAIE
<i>PUI</i>	Elemento rico em purina 1 envolvido na regulação de promotores lentivirais
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR em tempo real)
R	Primer reverse
RE	Retículo Endoplasmático
<i>rev</i>	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RP26	Proteína recombinante p26
RT-PCR	PCR com enzima transcriptase reversa ( <i>Reverse transcriptional – Polymerase Chain Reaction</i> )
S2	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
<i>SacI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>SacI</i>
SCP	Biomassa utilizada como fonte de alimento ( <i>Single Cell Protein</i> )
SDS-PAGE	Gel de eletroforese poli(acrilamida dodecil sulfato de sódio)
<i>Sh ble</i>	Gene que codifica resistência à droga zeocina <sup>TM</sup> relaciona a bleomicina
SIV	Vírus da imunodeficiência dos símios
<i>tat</i>	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
U3	3' <i>end</i> , único (região do genoma de VAIE contido na LTR)
U5	5' <i>end</i> , único (região do genoma de VAIE contido na LTR)
UF	Unidade da Federação
UPR	<i>Unfolded protein response</i> (Proteína sinalizadora de resposta de desdobramento de proteína)

USDA:APHIS	Agência regulatória americana ( <i>United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service</i> )
VAIE	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
X-33	Linhagem selvagem de células da levedura <i>Pichia pastoris</i>
<i>XhoI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>XhoI</i>
<i>YPT1</i>	Gene codificante para GTPase envolvida na secreção e transporte de proteínas



## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1 - A indústria do cavalo	19
2.2 - Histórico da AIE	21
2.3 -Genoma viral	22
2.4 - Mecanismos virais e variabilidade genética	24
2.5 - Infecção e fases da doença	27
2.6 - Resposta imunológica	29
2.7 - Patologia	30
2.8 - Epidemiologia	30
2.9 - Diagnóstico	33
2.10 - Controle	36
2.11 - A proteína p26	39
2.12 - Sistemas heterólogos de produção de proteínas	41
2.13 - A levedura <i>Pichia pastoris</i>	43
2.13.1 - <i>P. pastoris</i> como um organismo experimental	43
2.13.2 - Metabolismo do metanol	44
2.13.3 - Promotores alternativos para expressão	45
2.13.4 - Linhagens de <i>P. pastoris</i>	46
2.13.5 - Vetores de expressão gênica	48
2.13.6 - <i>Pichia pastoris</i> x outros sistemas de expressão	50
2.13.7 - A estratégia de "codon usage" e a integração do cassete de expressão em <i>P. pastoris</i>	52
2.13.8 - Fatores interferentes na fase indutiva da produção da proteína recombinante	53
2.13.8.1 - Nutrição	53
2.13.8.2 - Influência do pH, proteólise e temperatura	54
2.14 - Novas perspectivas na engenharia de produção de proteína recombinantes em leveduras	55
<b>3 - REFERÊNCIAS</b>	58
<b>4 - ARTIGO</b>	78

Abstract	79
1 - Introduction	80
2 - Material and methods	81
2.1 - Cloning of synthetic EIAV <i>p26</i> gene	81
2.2 - Expression of recombinant EIAV p26 protein in <i>P. pastoris</i>	83
2.3 - AGID	84
3 - Results	84
4 - Discussion	85
Acknowledgments	87
Attachments	88
References	89
5 - <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	91

## 1. INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus macrófago-trópico da família *Retroviridae* que causa infecção persistente, potencialmente fatal em equídeos. A AIE é reconhecida como a virose de maior importância em equinos no mundo, por tratar-se de uma doença crônica e amplamente disseminada. A doença caracteriza-se por apresentar um quadro clínico degenerativo, de longa incubação, não existindo vacina ou tratamento eficiente.

Esta enfermidade é considerada um obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, capaz de causar grandes prejuízos. Considera-se que animais expostos aos vírus submetidos à prova sorológica para a detecção de anticorpos contra antígenos do agente, quando considerados positivos, assim permanecerão por toda vida, fato que justifica a grande preocupação e vigilância da doença.

A proteína p26 presente no capsídeo do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) é sob o ponto de vista quantitativo, a principal proteína do core viral, representando cerca de 40% do total das proteínas produzidas. Ela é altamente conservada entre as diferentes amostras virais avaliadas. Ensaio imunoenzimático com soros infectados com VAIE demonstram que a proteína p26 recombinante pode ser extremamente útil para fins de diagnóstico.

O sistema de produção de proteínas heterólogas em que se utilizam células de leveduras apresenta uma ótima relação custo-benefício quando comparado aos demais sistemas de expressão utilizados na atualidade. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um sistema eficiente e vem sendo amplamente utilizada na produção de diferentes tipos de proteínas recombinantes. Com esta técnica é possível combinar as principais vantagens dos dois sistemas mais utilizados: o sistema de expressão em células de mamíferos, que possui a indispensável capacidade em realizar as modificações pós-traducionais; e o sistema de expressão em procariotos, caracterizado por grande viabilidade econômica.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituíram medidas sanitárias obrigatórias para combater a AIE em todo território nacional, que incluem o diagnóstico oficial, pela imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sacrifício ou isolamento dos animais positivos e exigência do certificado negativo para trânsito interestadual e concentrações de equídeos. Evidencia-se, portanto, a necessidade do desenvolvimento e

aprimoramento de técnicas diagnósticas que contribuam com as medidas de controle da doença no país, bem como com a prevenção de sua disseminação nos rebanhos. Neste sentido, a finalidade deste trabalho foi expressar a proteína p26 da região *gag* do VAIE através do sistema de produção de proteínas heterólogas utilizando células de leveduras *Pichia pastoris*, para fins diagnósticos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 - A indústria do cavalo**

O rebanho equino mundial corresponde a 75 milhões de cabeças, sendo a maior parte pertencente a China com cerca de 10 milhões de animais (AAHSA, 2010). O Brasil fica em quarta posição, depois dos EUA e México, com aproximadamente 6 milhões de equinos. As primeiras criações de equídeos no Brasil datam do século XVI. Dados recentes estimam a população brasileira de equídeos em mais de 8 milhões, sendo 1,3 de muares 1,2 de asininos e 5,8 milhões de equinos (CNA, 2009). A população equídea no Nordeste é de cerca de 40% da nacional (IBGE, 2007).

O complexo agronegócio do cavalo, que inclui atividades “antes, dentro e fora da porteira”, é responsável pela movimentação anual de R\$ 7,5 bilhões e geração de 642 mil empregos diretos, segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). As atividades denominadas “antes da porteira” contemplam agentes que fornecem insumos, produtos e serviços para a criação e o uso de cavalos. “Atividades dentro da porteira” dizem respeito a agentes que, diretamente, utilizam o cavalo em suas atividades. Agentes que encerram o ciclo do cavalo são denominados “atividades fora da porteira”, neste contexto, as empresas leiloeiras e o mercado internacional merecem destaque. As exportações desta atividade em 2009 totalizaram US\$ 27,4 milhões, receita superior a de produtos como café torrado e cachaça (CNA, 2010).

O Brasil é o terceiro maior exportador de carne de cavalo para a União Européia, ficando atrás apenas do Canadá e Argentina. Os principais países importadores são Bélgica, Holanda, Itália e Japão (CNA, 2009; FAO, 2009). Abate-se cerca de 200 mil equídeos por ano, em sete abatedouros distribuídos nos estados de PR, RS e MG (CNA, 2009). Em relação à exportação de animais vivos, o Brasil não tem muita participação no mercado, ocupando a 31ª (0,11%) posição no ranking mundial. Os maiores exportadores

são EUA, seguido de Reino Unido e Emirados Árabes que juntos somam mais da metade (53,68%) do mercado (FAO, 2009). Os principais países compradores de nossos animais são EUA, Angola e Uruguai. E os estados que mais exportam são SP, RJ e RS (CNA, 2010).

Recentemente o bloco europeu passou a exigir rastreabilidade e maior controle dos medicamentos dados aos equinos nos seis meses antes do abate. O Brasil vem demonstrando habilidade no cumprimento das exigências internacionais adequando-se rapidamente. Além disso, até julho deste ano serão necessárias modificações nos sete abatedouros habilitados pelo Ministério da Agricultura. Apesar da aprovação europeia às mudanças já realizadas, rastrear as exportações de cavalos no Brasil ainda é tarefa muito difícil, pelo fato de não existir uma criação comercial, pois a maior parte da carne vendida é proveniente de animais descartados do uso diário das fazendas (CNA, 2009).

Outras atividades não relacionadas diretamente com a Indústria do Cavalo, mas que geram muitos empregos e movimentam a economia do setor são: produção de insumos e acessórios para pastagens, moda *country*, equipamentos para atrelagem, serviços de Medicina Veterinária, construções para manejo animal e prática de esportes, tecnologias e produtos para estábulos, equipamentos e acessórios para equitação, acessórios para esportes equestres, equipamentos e serviços para eventos, softwares para manejo de equinos (CNA, 2009).

O estímulo à promoção do agronegócio cavalo no exterior, divulgação de linhas de crédito existentes nos bancos para alavancar a atividade, qualificação profissional de mão-de-obra e fortalecimento da representatividade do setor são algumas das principais demandas requeridas. A disponibilidade de recursos adicionais para programas de sanidade animal e investimentos em pesquisa e tecnologia pode facilitar a certificação dos rebanhos como negativos para diversas doenças, inclusive a AIE. Este fato permite uma maior obtenção de animais de qualidade, estado sanitário adequado e alto valor agregado o que leva ao atendimento das exigências internacionais para o comércio. A comercialização, especialmente internacional, de animais de interesse econômico geralmente requer a certificação de que esses animais são livres de infecções persistentes ou latentes, como a infecção pelo VAIE. Por esta razão as técnicas de diagnóstico devem estar em contínuo aperfeiçoamento, no intuito de atender às exigências do mercado (ORSOLINI; LIMA, 2005; CNA, 2009)

O impacto econômico causado pela dificuldade de certificação é bastante expressivo, a exemplo do que ocorreu com o cavalo Pantaneiro. Esses animais foram introduzidos no

Pantanal pelos colonizadores. As condições ambientais encontradas eram propícias para sua multiplicação. Como consequência dos processos adaptativos e da seleção natural por mais de dois séculos e com pouca ou nenhuma interferência antrópica, surgiu um tipo adaptado ao meio. Com o desenvolvimento da pecuária na região, o cavalo Pantaneiro constituiu-se num fator de importância econômica e social, tornando-se imprescindível em trabalhos de manejo do gado e no transporte regional. No final do século XIX a raça entrou em declínio principalmente devido à doença conhecida como Peste das Cadeiras, AIE e cruzamentos indiscriminados com outras raças (SANTOS et al., 1995).

## 2.2 - Histórico da AIE

Durante muitos anos os retrovírus foram conhecidos como causadores de tumores em animais. Na década de setenta, dois tipos virais foram identificados como causadores de linfomas linfocíticos de células T em humanos. Entretanto, somente na década de oitenta este grupo viral adquiriu proeminência e notoriedade, quando foi identificado um terceiro tipo viral capaz de provocar a síndrome da imunodeficiência adquirida. Atualmente, a AIE é reconhecida como a principal virose dos equídeos no Brasil e vem sendo utilizada como modelo de estudo para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (KONEMAN, 2008).

O VAIE foi um dos primeiros vírus animais a ser identificado, ocorrido no início do século 20 por Valle e Carré (1904), apesar da doença já ter sido descrita anteriormente na França (LIGNÉE, 1843 *apud* MONTELARO et al., 1993). Na década de sessenta o VAIE foi cultivado, “*in vitro*”, pela primeira vez (CLEMENTES; ZINK, 1996).

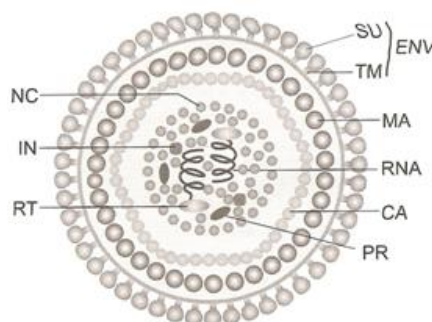
Nas Américas, a enfermidade foi diagnosticada primeiramente em 1881, em Manitoba, Canadá (BYRNE, 1960). Na América do Sul, década de sessenta, a doença foi diagnosticada na Venezuela e Argentina (SAXER, 1960; MONTEVERDE, 1964).

Em território brasileiro, esta virose foi descrita pela primeira vez por Dupont et al. (1968) no extinto Estado da Guanabara, mas no mesmo período a doença foi diagnosticada por Silva et al. (1968) em animais do Clube Hípico Fluminense e em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade do Rio de Janeiro. Neste mesmo ano Guerreiro et al. também descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais, o primeiro caso foi diagnosticado neste mesmo ano, em um cavalo da Vila Hípica de Belo Horizonte. Mas, somente três anos depois, a partir de exames clínicos, anátomo-histopatológicos, laboratoriais e infecção experimental em animal sadio, o resultado foi

publicado, citando também a comprovação de mais 18 casos em equídeos do Jóquei Clube de Minas Gerais (BATISTA JUNIOR e FONSCECA, 1971).

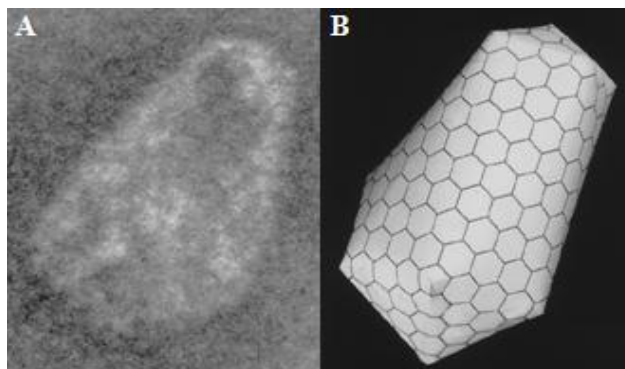
### 2.3 – Genoma viral

O genoma de VAIE é constituído por duas fitas de RNA não complementares de apenas 8.2 Kb (Fig.1). Seu núcleo tem forma cônica e a simetria capsidial é icosaédrica (CLEMENTS, 1996) (Fig. 2). Em sua face externa, possui envelope lipídico derivado da membrana plasmática de células do hospedeiro, proveniente da maturação e brotamento da partícula viral (RIET-CORREA, 2007).



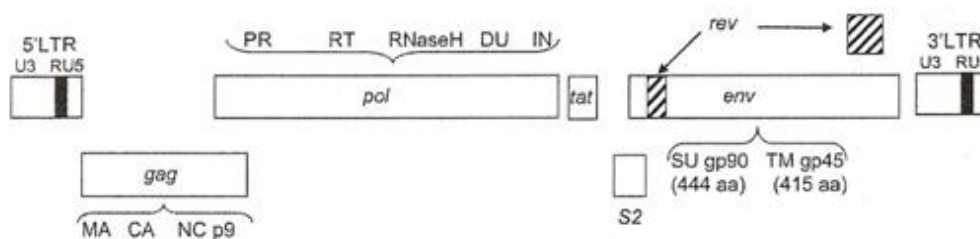
**Figura 1.** Ilustração esquemática de um vírion do Vírus da Anemia Infecciosa Equina mostrando seus componentes. RNA: duas fitas não complementares de 8.2 Kb; NC: proteína de núcleo capsídeo; CA: capsídeo; MA: matriz; IN: integrase; RT: transcriptase reversa; PR: protease; TM: glicoproteína transmembrana; SU: glicoproteína de superfície, ENV: envelope. Fonte: adaptado de Flores, 2007.

Seu RNA além de pequeno é geneticamente simples, composto por três genes codificantes para proteínas estruturais e não estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e por três fases abertas de leitura que codificam proteínas de regulação do VAIE (*tat*, *rev* e *S2*) (Fig. 3). A montagem das proteínas *gag* é essencial no ciclo de replicação do vírus, pois está relacionada à fase de brotamento das novas partículas virais na célula hospedeira (Fig. 4). A poliproteína precursora Pr55*gag* de 55 Kilodaltons (KDa) é clivada pela protease viral do vírion maduro, em quatro principais proteínas estruturais internas não glicosiladas: p15 (transmembrana), p26 (capsídeo), p11 e p9 (nucleocapsídeo). A Pr 55 codifica unidades de montagem e brotamento do vírus, enquanto as pequenas regiões de transcrição tardia codificam proteínas que medeiam à capacidade daquelas estruturas protéicas se ligarem à membrana celular e induzir a etapa final de segregação e fixação da partícula viral nascente (STEPHENS et al., 1986; HUSSAIN et al.; 1988) (Fig. 5).



**Figura 2.** Simetria capsidial de lentivírus. (A) ME (microscopia eletrônica) de isolado de VAIE, a maior dimensão do capsídeo é cerca de 100 nm (Roberts e Oroszlan; 1989; Roberts et al., 1991). Um modelo simples papel para o núcleo capsídeo baseado na simetria icosaédrica. (B) Um simples modelo de papel baseada na simetria icosaédrica do capsídeo, similaridade com arranjos hexagonais da foto em ME. Fonte: adaptada de Jin et al. (1999).

A clivagem do precursor *Pr180 gag/pol* produz o gene *pol* que codifica proteínas com diversas atividades enzimáticas incluindo a transcriptase reversa (p66), uma protease viral (p12) para o processamento das proteínas, uma dUTPase (p15) essencial para replicação do VAIE em macrófagos (células naturais de expressão e replicação), e uma integrase. A organização geral do gene *env* é semelhante ao descrito para outros retrovírus onde são codificadas glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana (gp45), que também montam a estrutura antigênica do VAIE (LEROUX et al., 2004).



**Figura 3.** Representação linear da organização do genoma de VAIE. LTR: Long terminal repeat; MA: matriz; CA: capsídeo; NC: nucleocapsídeo; PR: protease; RT: transcriptase reversa; DU: dUTPase; IN: integrase; SU: superfície; TM: transmembrana. Fonte: adaptada de Leroux et al. (2004).

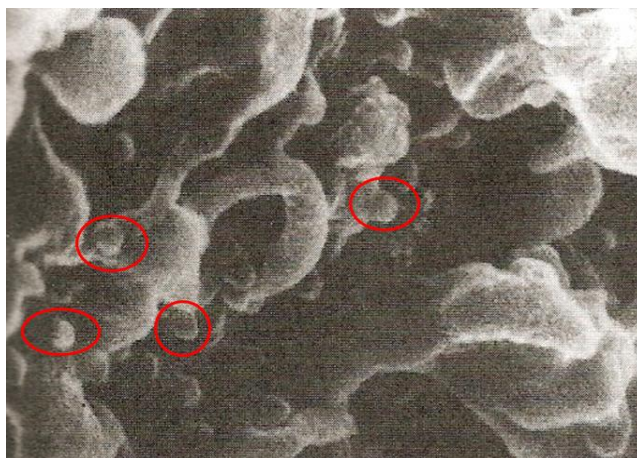
O genoma de VAIE possui ainda sequências de repetições terminais longas denominadas LTR, responsáveis pela regulação da transcrição viral, poliadenilação do RNA viral e tropismo celular (MAURY et al., 1998). Elas são constituídas de três segmentos denominados U3 (3' end, único), R (repetido) e U5 (5' end, único) e servem também como um sítio inicial de transcrição.



Os promotores lentivirais são regulados pelo DNA de ligação celular que interage com motivos específicos sobre as LTRs. O promotor do VAIE é regulado positivamente por um elemento rico em purina 1 (*PUI*) (CARVALHO et al., 1993). A expressão de *PUI* é normalmente restrita ao sistema hematopoiético é absolutamente necessário para a geração de linfócitos B e macrófagos, destino natural da infecção pelo VAIE (LLOBERAS et al., 1999).

#### 2.4 – Mecanismos virais e variabilidade genética

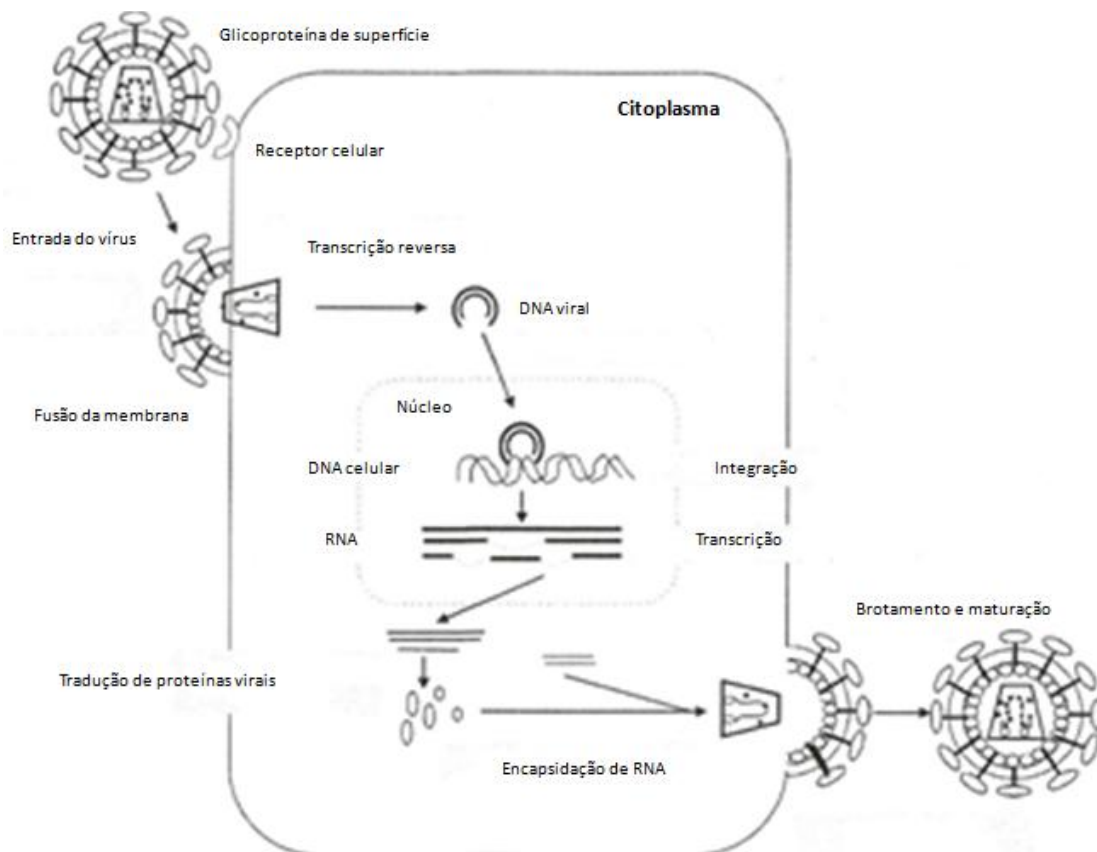
Embora o VAIE tenha sido caracterizado há mais de 150 anos, pouco se sabe sobre seu mecanismo de entrada nas células. “In vivo”, o VAIE é preferencialmente macrófago-trópico, no entanto, em cultura de tecidos o vírus mostra capacidade para se adaptar e infectar outros tipos de células, incluindo células endoteliais e fibroblastos, a partir não só da espécie equina, mas também de origens felina e canina (OAKS et al., 1998; NGUYEN e HILDRETH, 2000).



**Figura 4.** Micrografia eletrônica de varredura de linfócitos T humanos com partículas lentivirais brotando (indicado) de sua superfície. Fonte: adaptado de Koneman, 2008.

A adaptação e o tropismo do vírus estão associados com alterações no envelope e no LTR. Sugere-se que essas regiões do genoma influenciam o tropismo celular e a virulência, além disso, altos níveis de variação genética têm sido bem documentados em ambas as regiões genômicas. Em uma nova geração viral foi encontrado um novo motivo de fator de transcrição dentro do um reforçador que foi associado com sua adaptação às células endoteliais e fibroblastos. Um LTR que continha o novo motivo teve um aumento na atividade transcricional em fibroblastos, enquanto o novo sítio não alterou a atividade de

LTR em uma linhagem celular de macrófagos. Portanto, a seleção para variantes genéticas que produzam nova LTR podem ser uma consequência de pressões seletivas de células específicas. (MAURY et al., 2005).



**Figura 5.** Ciclo retroviral. Representação esquemática do ciclo viral de VAIE nas células hospedeiras. Fonte: adaptado de Leroux et al., (2004).

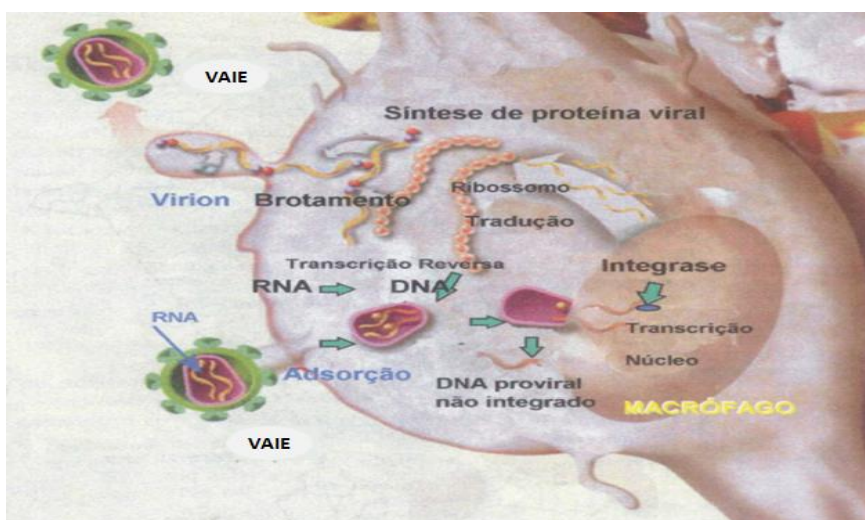
Estudos recentes mostram que a entrada de vírus tipo selvagem da AIE em células, requer um baixo pH, esta restrição implica endocitose e a entrada do vírus. Das diversas cepas virais analisadas, observou-se que tanto as macrófagos-trópicos quanto as cepas adaptadas à cultura “in vitro”, utilizam fossas recobertas por clatrina para a entrada. Em contraposição existe uma linhagem superinfectante independente de pH, onde a entrada do vírus é mediada por fusão de membrana (MELINDA et al., 2009).

A infecção pelo vírus envelopado é iniciada pela ligação da glicoproteína viral *gp90* ao seu receptor celular. Interações com receptores lentivirais celulares equinos 1 (ELR1) tem demonstrado serem as responsáveis pela interiorização. O evento de ligação desencadeia a fusão da membrana viral à membrana plasmática e a partir daí a internalização do vírus em um endossomo. Para os vírus que são endocitados, eventos endossomais subsequentes levam à fusão da membrana viral com a vesícula, liberando partícula do núcleo para o

citoplasma. As células utilizam vários mecanismos de endocitose para pegar os nutrientes de seu ambiente, e o vírus usurpa estes mecanismos de internalização (ZHANG et al., 2005).

Existem várias vias de endocitose definidas como: endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por cavéolas, macropinocitose, entre outras (MARSH e HELENIUS, 2006). Muitas destas vias de tráfego ocorrem através de compartimentos ácidos. Os Vírus podem tirar vantagem da diminuição do pH para estimular eventos que desencadeiam a fusão da membrana (SKEHEL e WILEY, 2000; BARNARD e YOUNG, 2003; BRINDLEY e MAURY, 2005). Evidências indicam que as condições de pH baixo são necessários para alterar a conformação da glicoproteína viral de superfície e assim, remover o seu impedimento estérico da fusão de células-vírus (SKEHEL e WILEY, 2000). Dentro da família dos retrovírus, o mecanismo de entrada baixo pH-dependente pode ser mais comumente usado que a de fusão direta com a membrana plasmática (MELINDA et al., 2009).

Após a entrada do vírus na célula, inicia-se uma segunda fase envolvendo a síntese e o processamento de mRNAs e proteínas virais. Nas duas fases o vírus se utiliza da maquinaria celular de transcrição e processamento de mRNAs. Dentro da célula o vírus é parcialmente desnudo e o RNA viral é copiado pela transcriptase reversa viral gerando uma fita dupla do DNA do genoma viral. O DNA proviral é então integrado ao genoma celular dos macrófagos pelas porções terminais dos LTRs mediado pela integrase viral. A transcrição viral passa a ser dependente da presença de fatores de transcrição específicos, o que pode estar relacionado ao tropismo do vírus (FLORES, 2007) (Fig.6).



**Figura 6.** Representação esquemática do ciclo do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE), em suas células-alvo. O DNA proviral é integrado ao genoma celular dos macrófagos pelas porções terminais dos LTRs mediado pela integrase viral. Fonte: adaptado de Pinheiro, 2001.

Alterações nas sequências terminais repetidas longas e no envelope estão associadas tanto a virulência alterada quanto ao tropismo celular (CARPENTER; CHESEBRO 1989; PAYNE et al., 2004; MAURY et al., 2005). Estes últimos achados indicam que cepas superinfectantes não exigem a mesma via endocítica utilizada pelo VAIE do tipo selvagem e sugere que a variante viral é capaz de se fundir com a membrana plasmática das células-alvo. Os diferentes caminhos pelos quais cepas superinfectantes utilizam nas diversas linhagens celulares estudadas sugerem a intrigante possibilidade de que estes vírus podem utilizar diferentes receptores nos diversos tipos celulares (MELINDA et al., 2009).

As altas taxas de mutação podem estar relacionadas a um falho sistema de reparo onde erros cometidos pela enzima transcriptase reversa, que possui baixa atividade de correção de leitura 3'-5' ("proofreading activity"), determina a ocorrência de mutações pontuais, na ordem de aproximadamente uma substituição a cada 104 bases (PIQUE et al., 1990, MANSKY e TEMIN, 1994; COFFIN et al., 1997). Além disso, o genoma dos Retrovírus está sujeito a altas taxas de rearranjos intragênicos, recombinações, deleções, duplicações, inversões ou uma combinação desses eventos (HU e TEMIN, 1990; ZHANG e TEMIN, 1993; COFFIN, 1996; WILLEMS et al., 2000).

## 2.5 - Infecção e fases da doença

A infecção de monócitos com VAIE resulta em uma infecção não produtiva e a diferenciação de monócitos infectados em macrófagos é necessária para ativar a replicação viral (MAURY et al., 1994; SELTON et al., 1996). Assim, os monócitos infectados podem servir como agentes disseminadores da infecção, sem que o sistema imune seja ativado (CLEMENTES e ZINK, et al., 1996). A identificação do VAIE em células endoteliais macrovasculares, sugere que este tipo celular também sirva de reservatório viral em portadores inaparentes (MAURY, et al., 1998). Durante os episódios febris o VAIE se replica predominantemente nos macrófagos maduros no baço, fígado, linfonodo, pulmões, rins e na glândula adrenal (SELTON et al. 1994; SELTON et al., 1996).

Os sinais clínicos da AIE são variáveis e irão depender da dose e da virulência da amostra infectante, e ainda da susceptibilidade individual do hospedeiro (SELTON, 1993). O VAIE é o único, no grupo dos lentivírus, que provoca febre aguda inicial, entre 40 e 41°C, associada à viremia, seguida por ciclos recorrentes da doença e período assintomático prolongado (COOK et al., 1996). Inicialmente os sintomas são brandos e

podem passar despercebidos. A doença se manifesta clinicamente de diferentes formas, sendo possível a reversão de uma forma a outra, a qualquer instante (SELLON, 1994).

É uma infecção persistente caracterizada por episódios periódicos de febre, apatia, hemorragias (MCCLURE et al., 1982), trombocitopenia (CRAWFORD et al., 1996), leucopenia, supressão transitória da resposta imunológica (NEWMAN et al., 1991) e aumentos significativos nos níveis de cobre e de enzimas hepáticas (PALOMBA et al., 1976). Distúrbios hematológicos são facilmente identificados através de sinais como palidez de mucosas, hemorragias petequiais, icterícia e edema nas regiões inferiores do corpo (COOK et al., 1996). Distúrbios neurológicos e lesões do sistema nervoso central têm sido associados à doença, podendo ser observados através de sinais clínicos como perda de peso, depressão, desorientação e andar em círculos (MCCLURE et al., 1982).

Na forma aguda da doença, os animais jovens podem apresentar febre, anorexia, forte prostração e andar cambaleante, que pode evoluir à morte entre 10 e 30 dias após o início dos sintomas (COOK et al., 1996). No começo desta fase, os níveis de anticorpos séricos não são detectáveis no teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), o que ocorre em média a partir de 45 dias pós-infecção. Resultados negativos nos exames sorológicos estão associados à ausência ou baixo título de anticorpos específicos (COGGINS et al., 1972). A trombocitopenia associada à febre, que geralmente precede o surgimento de anticorpos detectáveis, caracteriza bem esta fase. Após o desaparecimento dos sintomas iniciais da doença, a maioria dos animais progride para a fase crônica (CRAWFORD et al., 1978).

Durante a fase crônica o título do VAIE não é estável, porém, é alto durante os picos febris. Cada episódio de viremia recorrente tem duração média de três a cinco dias, e o intervalo dos ciclos da doença é irregular podendo ser de semanas a meses. A frequência e a gravidade dos episódios geralmente declinam com o tempo e terminam no primeiro ano. Após cerca de oito episódios clínicos, o estágio crônico da AIE termina. Neste período, a maioria dos animais torna-se assintomáticos, característica específica do VAIE, diferente das demais lentivirose (ISSEL e COGGINS, 1979).

Cavalos que estiveram assintomáticos por alguns meses ou anos podem apresentar episódios de febre após o tratamento com drogas imunossupressivas (KONO et al., 1976). A maior parte dos animais infectados nunca demonstra os sinais clínicos, passando ao estágio de portador inaparente, sem passar pelas fases aguda e crônica da doença (ISSEL e COGGINS, 1979).

Achados clínico-patológicos e laboratoriais em muares, mostram que estes indivíduos produzem sinais clínicos semelhantes ou mais brandos que os observados em equinos

(SPYROU et al., 2003). Os asininos, apesar de serem susceptíveis ao VAIE, podem apresentar níveis de viremia bem baixos, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem usualmente, os sinais clínicos da doença (COOK et al., 2001).

## 2.6 - Resposta imunológica

Os primeiros anticorpos que aparecem no sangue dos animais infectados são contra a glicoproteína *gp90* (anti-*gp90*), e são detectados aos 7-10 dias pós-infecção (d.p.i.), até atingir um pico de concentração aos 90 dias (HAMMOND et al., 2000). Esta glicoproteína é submetida a uma rápida evolução durante o curso da doença, fato que pode estar relacionado à natureza periódica da doença, onde a produção sequencial e liberação de novas cepas antigênicas do vírus promovem o escape temporário do agente viral frente à atuação do sistema imunológico (COLE et al., 1997).

O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína p26 (principal proteína do core viral), e são observados aos 10 -14 d.p.i., atingindo um pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores aos observados para *gp90* (MONTELARO et al., 1993).

As infecções pelo VAIE resultam em altos títulos de viremia em três semanas após a infecção. Diversos estudos sugerem que respostas celulares e humorais específicas são necessárias para o término da viremia inicial, e a replicação viral é reduzida a baixos níveis em animais que evoluem do estágio crônico para inaparentes (SANTOS, 2006).

O desaparecimento da viremia plasmática inicial coincide com a emergência de linfócitos T citotóxicos (CD8+) específicos para o VAIE e anticorpos não neutralizantes (PERRYMAN et al., 1988; MCGUIRE et al., 1994). Assim como ocorrido nos casos de infecção por HIV e SIV dos primatas, a evolução viral no gene *env* ajuda o VAIE a escapar dos linfócitos T citotóxicos e dos anticorpos específicos (CARPENTER et al., 1987; MEALEY et al., 2003).

Anticorpos neutralizantes, que são capazes de bloquear o estrato infectante, usualmente emergem somente depois de 2 ou 3 meses pós-infecção, sugerindo que esses anticorpos não são os responsáveis pelo término do episódio agudo inicial. A recrudescência da doença está associada com a emergência de variantes que escapam dos anticorpos neutralizantes (KONO et al., 1973; MONTELARO et al., 1984; LEROUX et al., 1997; LEROUX et al., 2001). Durante o curso da infecção, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune efetiva e duradoura, capaz de manter a replicação viral abaixo do limiar

para a indução da doença, fato que contribui para a manutenção da AIE em fase inaparente (HAMMOND et al., 2000).

O fenômeno de variação antigênica em lentivírus é comumente descrita. Estudos mostram que existem variadas cepas identificadas a partir de diferentes regiões geográficas em todo mundo e que viremias recorrentes durante a AIE crônica, resultam de uma evolução sequencial e da seleção imune de variantes antigênicas do VAIE, que são capazes temporariamente de burlar o estabelecimento da resposta imune (KONO et al., 1973; CARPENTER et al., 1987; PAYNE et al., 1987). Distintos estratos antigênicos do vírus predominam durante cada ciclo da doença. Descreve-se que pode haver mudanças completas do estrato predominante, dentro de apenas duas semanas (PAYNE et al., 1987).

## 2.7 - Patologia

A natureza das lesões encontradas durante a necropsia depende do tipo clínico da doença e da sua duração. Um animal que morre logo após várias exacerbações características da moléstia crônica, exibe alterações teciduais diferentes, em comparação com outro animal que morreu em seguida a um só episódio agudo (JONES, 2000). De maneira geral, a análise necroscópica revela lesões em diversos órgãos como coração, fígado, baço, linfonodos, rim e medula óssea. Os principais achados macroscópicos são edema subcutâneo, icterícia, tumefação de órgão parenquimatosos, hemorragias petequiais ou equimoses das membranas serosas, hipertrofia ventricular, palidez e flacidez do miocárdio (TRAUB-DARGATZ, 1993).

A anemia é caracteristicamente normocítica e normocrômica, resultante de uma combinação de hemólise, eritrofagocitose e de uma redução na produção de eritrócitos. Na histologia observa-se hemossiderose do fígado, baço, linfonodos, vasculite, com infiltração de células mononucleares em diversos órgãos, e glomerulonefrite proliferativa, por conta do acúmulo de imunocomplexos no glomérulo (TRAUB-DARGATZ, 1993; JONES, 2000).

## 2.8 – Epidemiologia

A AIE é uma enfermidade de morbidade e mortalidade variáveis, pois fatores como condições ecológico-ambientais, população de insetos hematófagos e densidade demográfica de equídeos, são determinantes na epidemiologia da doença (CORRÊA;

CORRÊA, 1992). O principal meio de transmissão do vírus é através da picada de insetos hematófagos. Muitas espécies parecem estar envolvidas, incluindo os tabanídeos (*Tabanus* spp. e *Hybomitra* spp., *Chrysops flavidus*), mosca de estábulo (*Stomoxys* spp.), borrachudos (*Simulium vittatum*), mosquitos (*Psorophora columbiae*, *Aedes vexans* e *Anopheles* spp.) e mosquito-pólvora (*Culicoides* spp.) (FOIL et al., 1983; ISSEL et al., 1985; TIMONEY et al., 1988; MURPHY et al., 1999).

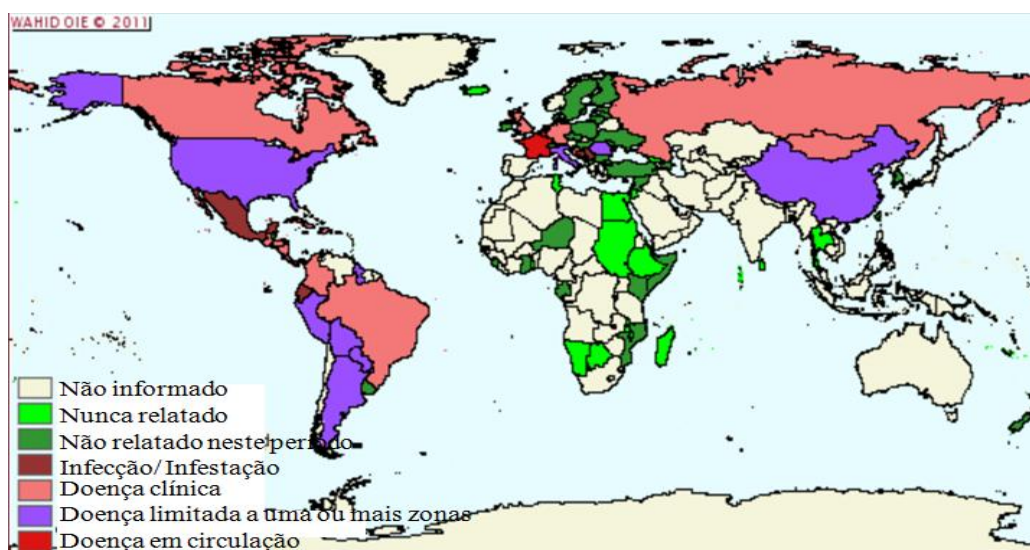
Pode ocorrer também de forma iatrogênica através de fômites, como arreios, agulhas, material cirúrgico, com resíduos de sangue contaminado. Estudos sobre a viabilidade do VAIE em agulhas, indicam que estes vírus permanecem infectantes por até 96 horas (WILLIAMS et al., 1981). Nos vetores, o VAIE mantém-se viável por um período de 30 minutos a 4 horas (HAWKINS et al., 1976).

Existem ainda outras formas de menor importância epidemiológica, como a transmissão transplacentária e através do colostro ou do sêmen (TASHJIAN, 1984). O vírus é transmissível a todos os equídeos, sem que haja qualquer preferência por raça, sexo e idade. A infecção intra-uterina pode resultar no abortamento ou nascimento de potros infectados, que frequentemente morrem nos dois primeiros meses de vida (RADOSTITS, 2002).

Os dados mais recentemente completos sobre a distribuição da AIE no mundo, disponíveis na OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) datam do primeiro semestre de 2010. De acordo com eles, dentre os países da América do Sul, o Brasil e a Colômbia apresentavam a forma clínica da doença, bem como a maioria dos países da América Central. Nesta mesma situação encontravam-se diversos países em todo o mundo: na América do Norte, a extensa área pertencente ao Canadá; na Europa, somente Reino Unido e a Alemanha; na Ásia, a Rússia e a Mongólia. Não há informações oficiais sobre o status da doença em diversos países da África e da Ásia, bem como na Austrália (Fig. 7) (OIE, 2011).

Quanto à distribuição da AIE no território nacional, observa-se que as mais altas prevalências para rebanhos e para animais foram encontradas na região Norte/Noroeste de Minas Gerais, seguida pela região Vale do Mucuri/Jequitinhonha (ALMEIDA et al., 2006). Os mesmos autores descrevem este Estado como área endêmica para AIE, com prevalência de 5,3% para rebanhos e 3,1% para animais.





**Figura 7.** Distribuição da AIE no mundo. Mapa da Organização Internacional de Epizootias (OIE), dados do primeiro semestre de 2010. Fonte: Site da OIE [www.oie.int](http://www.oie.int).

No Mato Grosso do Sul em 2007, de um total de 744 animais que foram considerados positivos à IDGA, apenas 67 (9%) foram sacrificados e 164 (22%) foram isolados, isto significa que o saldo de positivos, cerca de 70%, permaneceu nas propriedades. No mesmo ano e região, foi observada uma prevalência de 1,38% de animais soropositivos, no entanto, não se pode concluir que há um decréscimo em relação à média nacional ou em relação à média do Centro-Oeste, uma vez que não há estudos sobre a situação nos anos anteriores (DELEVATTI, 2008).

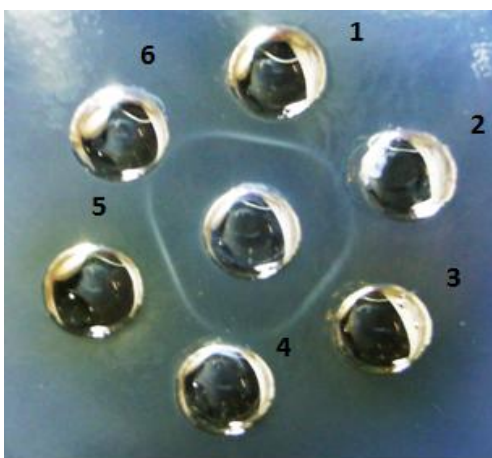
Heinemann et al. (2002) descreveram 17,8% de animais soropositivos no município de Uruará no Pará. Em Cuiabá, Mato Grosso, há uma prevalência de 11,8% de casos positivos em equinos de tração (NOCITI et al., 2007). Ainda de acordo com esses autores, dados não oficiais têm mostrado maior prevalência da doença em outras regiões, indicando sua ampla distribuição no território brasileiro. Essa alta prevalência indica que muitos proprietários de cavalos têm mantido animais positivos, o que pode estar relacionado ao fato deles não apresentarem qualquer sinal clínico associado à AIE. A ausência de dados ou a subnotificação da doença no Brasil e no mundo torna seu controle e erradicação ainda mais difícil, pois os animais acometidos servem de fonte de infecção contribuindo para disseminação da doença (CAVALCANTE, 2009).

## 2.9 - Diagnóstico

Os primeiros testes utilizados no diagnóstico das infecções causadas pelo VAIE foram inoculações de sangue suspeito em animais susceptíveis, que passava por monitoramento até o surgimento dos sinais clínicos característicos da AIE. A fixação de complemento foi um dos primeiros ensaios empregados para detecção de anticorpos específicos ao VAIE, mas demonstrou resultados insatisfatórios (NAKAJIMA et al., 1972). O teste de inibição da hemaglutinação (HI) surgiu como a primeira alternativa utilizada em relação aos testes de inoculação. Através da técnica de HI pode-se demonstrar que o soro de cavalos infectados em estágios iniciais é inibido por anti-soro homólogo, e que os anticorpos são detectados antes da produção dos anticorpos neutralizantes (SENTSUI; KONO,1981).

A falta de sistemas confiáveis de isolamento “in vitro”, propagação e quantificação do VAIE até a década de 60 restringia muito as pesquisas nesta área (MONTELARO et al.,1993). Em 1968, Kobayashi e Kono conseguiram multiplicar o VAIE em cultura de leucócitos e adaptá-los a linhagens celulares contínuas.

Diversos testes sorológicos foram desenvolvidos, dentre eles o IDGA, uma adaptação do método de Ouchterlony, descrita por Coggins e Norcross em 1970. Este método sorológico foi amplamente aceito e padronizado internacionalmente. A IDGA baseia-se na detecção de anticorpos contra a principal proteína do core viral, a p26 (BIRKETT et al., 1997; JIN et al., 2005). Se o animal for positivo, ao realizar a leitura do teste será possível observar uma linha de precipitação visível a olho nu em meio semi-sólido (ágar-gel), decorrente da formação do complexo antígeno anticorpo presente no soro-teste do animal (Fig.8).



**Figura 8.** IDGA (Imunodifusão em Gel de Ágar). Linha de precipitação: formação do complexo antígeno/anticorpo. No poço central o antígeno padrão; nos poços 1, 3 e 5 soro padrão positivo; nos poços 2,4 e 6 soros testes positivos. Fonte: arquivo pessoal.

Conhecido como Teste de Coggins, o método de IDGA detecta anticorpos precipitantes entre 14 e 45 d.p.i (COGGINS et al., 1972). Apesar da facilidade de execução, não é um teste rápido, pois a leitura é feita em 48 horas. Além disso, esta técnica não é capaz de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção (REIS, 1997). Outra limitação seria a subjetividade inerente ao teste, que propicia a liberação de resultados falso negativos ou duvidosos, principalmente quando a resposta imunológica do animal é muito baixa (MOTTA, 2007). Entretanto, mesmo com algumas deficiências o teste é considerado a prova padrão-ouro para AIE, segundo a OIE (2010), bem como pelo MAPA, a qual somente poderá ser realizada em laboratórios credenciados por este órgão (MAPA, 2008).

Durante os últimos anos, a detecção de anticorpos contra o VAIE pelo ELISA tem sido descrita e usada em alguns países onde “kits” são comercializados em vários formatos (MATSUSHITA et al., 1989). Nos Estados Unidos alguns ELISAs foram aprovados pelo “US Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service” (USDA e APHIS) em 1990, como métodos de teste equivalentes para a diagnóstico de AIE.

No Brasil, um ELISA utilizando *gp90* recombinante foi desenvolvido por Reis (1997) e demonstrou ser mais eficiente do que o ELISA com antígeno p26 (SILVA et al., 2003), pois detectou anticorpos para o VAIE mais precocemente em animais infectados, apresentou boa correlação com os resultados do teste de IDGA e foi recomendado como teste de triagem em levantamentos sorológicos (REIS, 1997; MARTINS, 2004). No entanto, até mesmo quando ambos os testes (IDGA e ELISA) são usados, diversos fatores incluindo a presença de proteínas do soro bovino utilizado no cultivo de células “in vitro”, ou mesmo das proteínas advindas das células do hospedeiro, que foram utilizadas para o cultivo, podem contribuir para resultados conflitantes (KIM et al., 1992; LANGEMEIER et al., 1996).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido proposta como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovíroses. A PCR para detecção de DNA proviral do VAIE é sensível e específica para identificar cavalos em estágios subclínico, animais recentemente infectados e infecções neonatais, além de elucidar reações indeterminadas pela sorologia (McCONNELL et al., 1983; ISSEL et al., 1993; LANGEMEIER et al., 1996; SANTOS, 2006). Em infecção experimental, Ferraz (1998) mostrou que com apenas três dias após infecção foi possível detectar sequências do genoma de VAIE por PCR. No entanto, vários trabalhos vêm contestando a sensibilidade da técnica devido ao grande número de resultados negativos obtidos com amostras de

animais com sorologia positiva (BIENZLE et al., 2004; CAMARGOS, 2005; HIRSCH et al., 2005), fato que pode estar associado a dinâmica da infecção. Motta (2007) encontrou divergências significativas nos resultados comparados de IDGA e PCR em equinos naturalmente infectados. A baixa sensibilidade e especificidade relativas podem estar associadas a uma improvável, porém possível contaminação da PCR, por um número insuficiente de células infectadas ou ainda por uma pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em decorrência ao término dos episódios de viremia (O' ROURKE et al., 1991). Resultados parecidos foram encontrados quando se compararam os testes ELISA e PCR. Amostras que foram consideradas positivas na PCR e negativas no sorológico foram relacionadas a uma possibilidade de mutações no gene *env* e consequente variância de antigenicidade das proteínas do envelope. Já as amostras que foram positivas no ELISA e negativas na PCR foram associadas à insuficiência de células infectadas ou mesmo uma pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em virtude no período de convalescência da viremia.

A sensibilidade e especificidade das técnicas de PCR são motivos de discussão por diversos autores, principalmente no que se refere à adoção desta metodologia como diagnóstico de doenças infecto-contagiosas e para teste de rebanho (BIENZLE et al., 2004; CAMARGOS, 2005; SANTOS, 2006). No entanto, esta técnica vem sendo utilizada em várias pesquisas de variabilidade genética, detecção e quantificação de agentes infecciosos, com bons resultados. Adicionalmente, a especificidade do teste é considerada satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região conservada no genoma do VAIE, como a região *gag* (KIM et al., 1992; LANGEMEIER et al., 1996).

Grande parte dos trabalhos sobre diagnóstico da AIE relata a produção da proteína p26 de *gag* a partir de cultivos celulares infectados com o VAIE (MALMQUIST et al., 1973; MONTELARO et al., 1984; BOUILLANT et al., 1986) ou recombinantes (ARCHAMBAULT et al., 1989; KONG et al., 1997; SENTSUI et al., 2001; PIZA et al., 2007). Recentemente na Argentina, foi padronizado e validado um teste de imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da AIE, utilizando como antígeno a proteína p26 de VAIE a partir do sistema de expressão em *E. coli*. O teste demonstrou uma sensibilidade diagnóstica relativa de 100% e especificidade de 100% quando comparado com um ensaio de IDGA comercial (ALVAREZ et al., 2007). Ensaio imunoenzimáticos com soros infectados com VAIE demonstram que a proteína p26 recombinante pode ser extremamente útil para fins de diagnóstico (BIRKETT et al., 1997).

Embora os títulos de anticorpos para as principais proteínas (destacadamente a p26) sejam menores que aqueles produzidos contra as glicoproteínas virais, especificamente a *gp90* (passíveis de altas taxas de mutação), seu uso como antígeno é especificamente desejável nos testes sorológicos, por serem eficientemente imunogênicas e produzidas em quantidades significativas (LERUOX et al., 2004).

Considerando que mais de 95% dos animais infectados pelo vírus da AIE são portadores assintomáticos e que ainda não existe vacina eficaz disponível contra a doença, o diagnóstico laboratorial assume um papel decisivo no controle e prevenção da AIE (FERRAZ et al., 1998). Os testes diagnósticos vêm evoluindo desde a descoberta da AIE. Os antígenos recombinantes p26 de VAIE produzidos nos diferentes sistemas de expressão têm provado ser confiáveis reagentes de diagnóstico (ARCHAMBAULT et al., 1989; SENTSUI et al., 2001; ALVAREZ et al., 2007). No entanto, testes mais sensíveis, acessíveis e aplicáveis ainda é uma prioridade a ser alcançada em medicina veterinária de equídeos (MOTTA, 2007).

## 2.10 - Controle

A ineficiência das vacinas contra a AIE restringe as ações de controle da doença a medidas de identificação, segregação ou sacrifício dos animais infectados. Somente em países como China e Cuba tem sido executado um programa de vacinação usando amostras atenuadas de VAIE, que parece proteger os animais apenas contra amostras homólogas do vírus (MONTELARO et al., 1993).

Desde 1981, através da Portaria nº 200, a AIE está incluída entre as doenças passíveis de aplicação das medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal (Art.61 do Decreto 24.548, de 03 de julho de 1934), sendo obrigatório o sacrifício dos animais infectados, uma vez que não existe cura ou tratamento. Atualmente, a legislação em vigor é a Portaria nº 84 de 19 de outubro de 1992, e em consulta pública, a Portaria nº 46 de 10 de setembro de 2002.

A Instrução Normativa nº45 de 15 de junho de 2004, que prevê os procedimentos gerais de profilaxia e combate à AIE, encontra-se em fase de revisão. Um das medidas previstas refere-se às condições epidemiológicas peculiares a cada Unidade da Federação (UF). Em cada UF deverá ser constituída uma CECAIE (Comissão Estadual de Controle da AIE), que será responsável pelas ações de campo referentes à prevenção e ao combate da AIE.

A Instrução Normativa nº 17, de 8 de maio de 2008 institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) do MAPA. O programa visa o fortalecimento da equideocultura nacional, por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal. Um dos objetivos é realizar vigilância epidemiológica e sanitária das principais doenças dos equídeos, tais como Mormo e Anemia Infecciosa Equina, visando à profilaxia, controle e a erradicação destas doenças em todos os Estados da Federação.

De acordo com o PNSE o trânsito interestadual de equídeos somente é permitido quando os animais estão acompanhados da Guia de Trânsito Animal (GTA). Na emissão da GTA para equídeo, com seis meses ou mais de idade, é obrigatória a apresentação de resultado negativo à prova de IDGA. A participação de animais em leilões, feiras, rodeios, exposições, torneios e demais concentrações, somente é permitida a equídeos com resultados negativos à prova de diagnóstico para AIE, independentemente da necessidade da movimentação interestadual ou não.

O Diagnóstico Oficial é realizado por laboratório credenciado, usando antígeno oficialmente aprovado para IDGA. Os resultados poderão ser utilizados na emissão de atestado negativo para AIE, que tem a seguinte validade, para efeito de trânsito: 180 dias, para equídeos procedentes de entidades controladas, e 60 dias, nos demais casos. O equídeo que reagir positivamente à prova de IDGA será considerado portador de AIE. O resultado positivo deverá ser imediatamente comunicado pelo laboratório ao serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal. Esses animais poderão ser sacrificados ou marcados e isolados, dependendo da política sanitária definida na UF (Fig. 9).

O equídeo portador, que não seja sacrificado prontamente, será marcado, na paleta esquerda, com a letra A e a sigla da UF onde se encontra o animal. Quando a medida indicada for o sacrifício, este será executado de preferência no próprio local onde se encontra o animal, no prazo máximo de 30 dias. O sacrifício do animal será realizado, somente, após um novo teste, 15 dias após a primeira prova (MAPA, 2008).

A manutenção de animais positivos nas propriedades do Pantanal Sul-Mato-Grossense ocorre por que o programa de controle local (CAIEPAN) preconiza a manutenção dos animais positivos nas propriedades, ao invés do sacrifício, permitindo sua utilização no manejo diário da fazenda. Por outro lado, o programa estimula o diagnóstico e a adoção de medidas profiláticas e de controle da doença. O CAIEPAN tem como meta a incorporação de todas as propriedades da região ao Programa de Prevenção e Controle da AIE em um prazo de até cinco anos. Pretende-se com isso, reduzir a prevalência a níveis que permitam

o sacrifício dos animais infectados, sem comprometer a atividade pecuária no Pantanal (DELEVATTI, 2008).



**Figura 9.** Destino das carcaças dos equinos após óbito confirmado. Município de Silva Jardim, RJ. Fonte: Karam et al. (2010).

Um inquérito epidemiológico aplicado a proprietários e tratadores de cavalos abordando a ocorrência de fatores riscos envolvidos na transmissão da AIE, mostrou que apenas 15% dos entrevistados informaram contar com serviços veterinários constantes em suas propriedades, 20% não contavam com qualquer assistência veterinária e o restante (65%) contavam com serviços esporádicos. Quanto à realização de exames sorológicos constantes, apenas 10% informou realizá-lo. Apesar de todos os entrevistados participarem de atividades que envolvem concentrações de equídeos como vaquejadas, 62,5% afirmaram não ter havido qualquer tipo de controle fiscal no local do evento. No entanto, 80% informam ter sofrido fiscalização no transporte interestadual dos animais (LAGE, et al., 2007).

O controle sanitário de entidades hípicas e de estabelecimentos que produzam, criem ou mantenham equídeos é de responsabilidade dos serviços veterinários próprios. As entidades ou estabelecimentos serão considerados controlados quando possuírem assistência veterinária permanente, não apresentarem animais reagentes positivos, em dois testes realizados com intervalo de 30 a 60 dias, e todo o seu efetivo equídeo seja submetido à prova, no mínimo, uma vez a cada seis meses. Essas entidades ou estabelecimentos poderão receber certificados, renováveis a cada 12 meses, após o re-teste de todo plantel. Além disso, medidas como separação de animais positivos dos negativos, testes sorológicos periódicos, uso de uma agulha por animal e separação de potros filhos de éguas infectadas também ajudam no controle da doença (BRASIL, 2004).

Um dos principais problemas para o cumprimento dos programas de controle e das instruções normativas é a falta de conscientização sanitária dos proprietários. Muitos criadores que possuem animais registrados preocupam-se com o controle da enfermidade. No entanto, outros que não possuem cavalos registrados ainda não fazem o controle da AIE, que pode atingir uma prevalência alta nas tropas (DEVELATTI, 2008). Além disso, Santos et al. (1995) relatam que um dos grandes problemas detectado e enfrentado pela maioria dos criadores é a dificuldade na realização do teste IDGA.

Estes fatos se caracterizam como grandes obstáculos que devem ser vencidos para facilitar as ações dos serviços oficiais. Faz-se necessário investir de maneira equilibrada e eficiente nos diversos programas de controle das diferentes doenças de grande impacto na pecuária nacional, do contrário, a credibilidade do país é afetada. O aspecto sanitário deve ser visto como prioridade para que o Brasil não continue sofrendo com barreiras político-sanitárias (DELEVATTI, 2008).

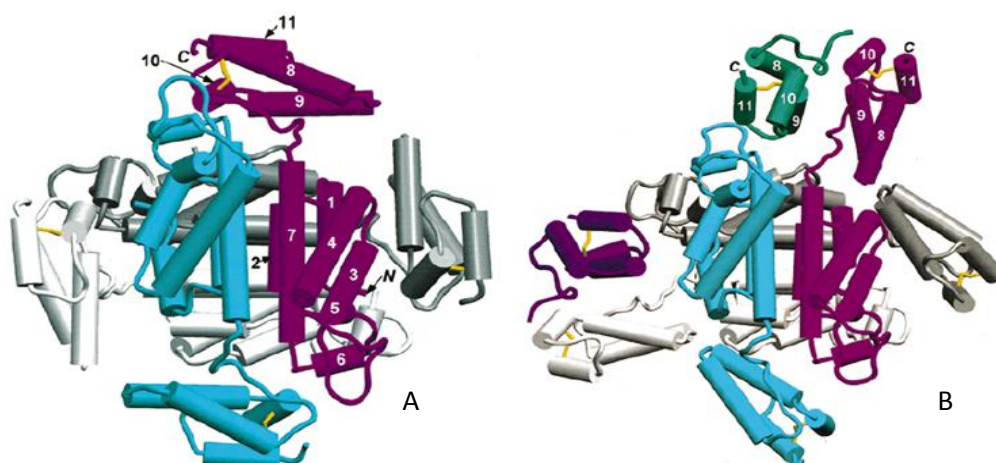
### 2.11 – A proteína p26

Do ponto de vista quantitativo, a principal proteína de VAIE é a p26, que representa cerca de 40% do total das proteínas virais. Esta proteína é altamente conservada entre as diversas cepas virais de localizações geográficas diferentes, com um máximo de 12% de variabilidade entre as linhagens (ZHANG et al., 1999; SENTSUI et al., 2001; LERUOX et al., 2004; CHUNG et al., 2005).

Em 1997, Birkett et al. caracterizaram a proteína recombinante p26 (rp26) obtida através do sistema de expressão em *Escherichia coli*. Após tratamento e purificação por métodos convencionais, foi revelado um monômero de 26 kDa, ausente de ligações dissulfeto intermoleculares. Estes autores descreveram os domínios monoméricos em concentrações de até 20mg/ml. Este fato também foi evidenciado por diferentes sistemas de análise físico-química, incluindo a cromatografia de filtração, que indicou a ocorrência da proteína como um monômero em solução. Sugeriu-se que nenhum dos três resíduos de cisteína da rp26 estava envolvido em pontes dissulfeto intermoleculares. Descreveu-se ainda que 51% da estrutura secundária da proteína eram compostos por motivos  $\alpha$ -hélice, 15% voltas-beta ( $\beta$ -turn) e 34% aperiódico (*aperiodic string*). A espectrometria de fluorescência revelou que os três resíduos de triptofano na rp26 ocupam duas localizações diferentes, evidenciando que a proteína recombinante sofre dobramentos e tem conformação provavelmente nativa.



No entanto, estudos posteriores demonstraram que a proteína purificada proveniente de construção recombinante do VAIE com sistema em *E.coli* é facilmente cristalizada em duas diferentes formas. Estas estruturas foram determinadas e examinadas em detalhe quanto às associações oligoméricas e posições de domínio. Uma se caracteriza por cristais cúbicos formando tetrâmeros a partir de dois pares de dímeros, com 4 pontes dissulfeto. E a outra é formada por estruturas similares a cristais hexagonais de tetrâmeros com dois domínios C-terminais vizinhos, com seis pontes dissulfeto. As duas formas cristalográficas da proteína recombinante p26 do capsídeo do VAIE têm em comum uma interface anti-paralela de quatro hélices referente a dois pares de dímeros com domínios N-terminais. Dois pares de dímeros fracamente associados formam tetrâmeros, em uma das duas formas cristalográficas os tetrâmeros são ligados através de dimerização dos domínios C-terminal (JIN et al., 1999) (Fig. 10).



**Figura 10.** Associações oligoméricas da proteína de capsídeo viral p26. (A) Cristais cúbicos formando tetrâmeros, com um dímero em roxo e azul, e o segundo dímero em atrás em branco e cinza. As pontes dissulfeto no domínio C-terminal são apresentadas em amarelo. (B) Uma visão similar de cristais hexagonais formando tetrâmero, com os domínios C-terminais vizinhos apresentados em púrpura e verde. Numeração referente às hélices antiparalelas (grupos de quatro) formando subunidades de dimerização. C - domínio C-terminal e N - domínio N- terminal. Fonte: adaptado de Jin et al. (1999)

O gene *p26* de VAIE possui uma parte significativa de homologia com os genes das principais proteínas do core de outros lentivírus. Comparada a proteína de capsídeo p24 do HIV-1, a p26 possui 55% similaridade de aminoácidos (30% de identidade). Estes vírus pertencem a uma subfamília dos lentivírus que apresentam reatividade sorológica cruzada através de uma sequência altamente conservada no domínio C-terminal do capsídeo, denominada região de homologia maior (GOUDSMIT et al., 1986; EGBERINK et al., 1990). Na verdade, soro de cavalos infectados com VAIE tem sido utilizado para precipitar os principais antígenos do núcleo do HIV-1 (MONTAGNIER et al., 1984) e FIV

(EGBERINK et al., 1990; STEINMAN et al., 1990) indicando a presença de regiões conservadas interespecies. Sugere-se que as principais proteínas do núcleo lentiviral, de pelo menos HIV-1, EIAV e FIV, são organizadas em domínios antigênicos semelhantes responsáveis por definirem epítomos estáveis que podem provocar reações cruzadas (EGBERINK et al., 1990; CHONG et al., 1991; SENTSUUI et al., 2001).

## 2.12 – Sistemas heterólogos de produção de proteínas

O aperfeiçoamento das técnicas em biologia molecular e engenharia genética vêm contribuindo substancialmente para o desenvolvimento de organismos capazes de produzir proteínas recombinantes em diferentes sistemas de expressão (MORTON e POTTER, 2000; SCHATZMAYR, 2001). A tecnologia de DNA recombinante para a produção de proteínas heterólogas consiste essencialmente em clonagem do gene referente à proteína de interesse, o inserto desta construção do organismo hospedeiro, crescimento dos transformantes, indução da produção da proteína recombinante, recuperação e purificação da proteína expressa (KOBAYASHI et al., 2000).

Dentre esses sistemas, um dos mais empregados atualmente está aquele que utiliza células da levedura *Pichia pastoris*. Estes microrganismos são capazes de realizar o processamento pós-traducional da proteína de maneira completa, podendo ser secretada para o meio extracelular, fato que reduz as etapas de purificação envolvidas (KOBAYASHI et al., 2000). Esta característica é essencial tanto para fins terapêuticos como diagnósticos. Adicionalmente este sistema é economicamente viável e garante bons níveis de produção, configurando boa relação custo/benefício. Nesse sentido, a escolha de um sistema de expressão heterólogo que contemple características necessárias à produção da proteína de interesse representa um passo importante (COIMBRA, 2007).

O sistema de expressão em que se utilizam organismos procariotos para a obtenção de DNA recombinante tem como principal representante a bactéria *Escherichia coli*. Este sistema de expressão está bem caracterizado, pode atingir bons níveis de produção e apresenta uma vantagem econômica sobre os demais por crescer em meios simples e baratos (BILLMAN-JACOB, 1996). No entanto, existem muitas dificuldades associadas à produção de proteínas a partir de genes exógenos clonados nesta bactéria. Estas limitações estão associadas à presença de íntrons e a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, pois, a *E. coli* não possui a maquinaria intracelular responsável para tal finalidade (PELCSAR et al., 1996; BROWN, 2003; DALY; HEARN, 2005).

Adicionalmente, a liberação de endotoxinas ou pirógenos que provocam reações indesejáveis, e a retenção da proteína recombinante de maneira insolúvel e inativa sob a forma de “corpúsculos de inclusão”, tornam o processo de purificação e recuperação do produto intracelular mais trabalhoso (MONTO; SOGAYAR, 2003).

Comparada à expressão em *E. coli*, a produção de proteínas heterólogas em leveduras permite um processamento mais parecido com aquele encontrado em células animais, pois o ambiente intracelular da levedura possibilita a ocorrência de várias reações que normalmente acontecem em células de mamíferos. No entanto, algumas modificações pós-traducionais realizadas em células de animais não ocorrem nesses organismos, o que pode alterar a estrutura funcional destas proteínas. Por outro lado, a expressão heteróloga em leveduras está bem caracterizada, havendo várias técnicas de manipulação gênica disponíveis. Outra grande vantagem é a boa eficiência do sistema para produção em larga escala (GELLISSEN, 2000). Adicionalmente, há relatos que confirmam que o rendimento de proteínas recombinantes obtidas a partir de células de leveduras *P. pastoris* foi bem maior que os resultados obtidos no sistema *E.coli*. (POKOJ et al., 2010).

No que concerne aos sistemas com eucariotos, diferentes linhagens celulares de mamíferos, derivadas majoritariamente de tecidos humanos, de camundongos ou de “hamsters”, vêm sendo utilizadas na síntese de várias proteínas recombinantes (WURM; BERNARD, 1999; MORTON; POTTER, 2000). Além destas, células de inseto e de leveduras também vêm sendo extensivamente utilizadas como sistema de expressão heteróloga (TORRES; MORAES, 2002; BROWN, 2003). Nos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos as proteínas são processadas corretamente e são indistinguíveis das versões não-recombinantes, no entanto, apresentam algumas desvantagens como crescimento lento em meios caros, baixo nível de expressão e processo de purificação complexo (BROWN, 2003).

O uso de animais transgênicos é uma alternativa à cultura de células de mamíferos, pois a biologia do animal pode favorecer o processamento satisfatório da proteína. Os animais são modificados geneticamente para produzir a proteína em fluidos específicos, como leite ou urina, mas existem muitas limitações nesta tecnologia. Em alguns casos, a proteína de interesse pode provocar efeitos adversos à saúde do animal, além de apresentar alto custo e certa ineficiência no processo de geração e seleção do animal que melhor produz a proteína (SHULER; KARGI, 2001).

O sistema que utiliza células de insetos é relativamente fácil de manter e com menor custo em comparação com as células de mamífero, além de oferecer um processamento

pós- traducional similar ao destes (MCCARROLL; KING, 1997). O nível de produção obtido pode ser satisfatório, pois há a possibilidade de cultivar as células em suspensão, o que permite construir biorreatores com alta densidade celular. No entanto esta técnica tem como desvantagens a manipulação e manutenção de células, que são mais complexas quando comparadas às células de levedura e bactéria (MONTOR; SOGAYAR, 2003).

A produção em plantas transgênicas apresenta vantagem em relação à purificação do produto recombinante, uma vez a proteína pode ficar retida em compartimentos estéreis ou comestíveis. Fato este, que possibilita a idéia de administração oral de um produto terapêutico ou vacina, além disso, é um organismo que realiza modificações pós-traducionais (MASON; ARNTZEN, 1995). Todavia, ainda existem desvantagens neste sistema que o torna indesejável para uso comercial, dentre elas destacam – se: baixos níveis de expressão, longo tempo de testes e dificuldades no controle ambiental, que pode influenciar na qualidade e na quantidade de produção (SHULER; KARGI, 2001).

## 2.13 – A levedura *Pichia pastoris*

### 2.13.1 – *P. pastoris* como um organismo experimental

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, mesofílica, homotálica, anaeróbica facultativa, com uma típica estrutura de célula eucariótica possuindo uma parede celular espessa de polissacarídeo. Este microrganismo é naturalmente haplóide em seu estado vegetativo e multiplica-se por brotamento multilateral (CEREGHINO e CREGG, 2000). É taxonomicamente classificadas no Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e Gênero *Pichia* (NCBI, 2011).

A primeira descrição da habilidade que certas espécies de leveduras possuíam em utilizar o metanol como única fonte de carbono e energia foi realizada há aproximadamente 40 anos (OGATA, 1969). O fato de crescer até alta densidade celular em meios simples provocou o interesse comercial e sua utilização foi direcionada como fonte de alimento animal altamente protéico SCP (*single cell protein*) (WEGNER, 1990). A empresa *Phillips Petroleum Company* desenvolveu meios e protocolos para o crescimento de *Pichia pastoris*. Mas a crise do petróleo, na década de 70, causou um dramático aumento no preço do metanol tornando sua utilização inviável para tais fins. Na década seguinte, a empresa *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc.* (SIBIA, La

Jolla, CA, USA) adquiriu a tecnologia, direcionando-a para uso como sistema de produção de proteínas heterólogas. Hoje, a *Invitrogen Corporation* (Carlsband, CA, USA) está licenciada para vender o sistema em forma de “kit” (CEREGHINO e CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A viabilidade econômica de utilizar o metanol como única fonte de carbono, ou seja, sua capacidade metilotrófica, confere a *P. pastoris*, grande sucesso na produção de uma numerosa variedade de proteínas recombinantes. Mais de 400 proteínas codificadas por diferentes genes de diversos organismos, já foram produzidas utilizando-se este sistema. Os índices de produção atingem miligramas a gramas por litro, sendo utilizado tanto na pesquisa laboratorial quanto na indústria farmacêutica (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

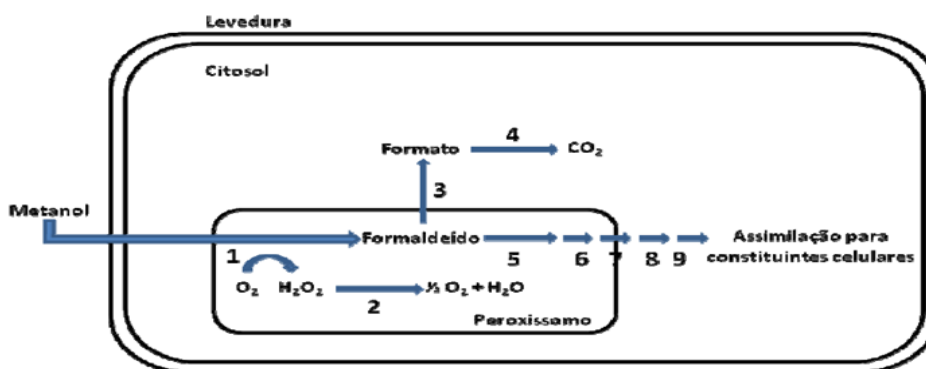
### 2.13.2 - Metabolismo do metanol

O primeiro passo no metabolismo do metanol é sua oxidação do metanol em formaldeído, gerando peróxido de hidrogênio, pela ação da enzima álcool oxidase (AOX). Para evitar a toxicidade causada pelo peróxido de hidrogênio, esse primeiro passo ocorre dentro do peroxissomo, que sequestra o produto tóxico degradando-o em oxigênio e água através da ação conjunta da catalase e da AOX (KOTZÉ, 2007; SOUZA, 2007). Uma parte do formaldeído gerado deixa o peroxissomo e é oxidada a formato e dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são fonte de energia para o crescimento celular em metanol. A porção restante do formaldeído que permanece no peroxissomo é utilizada como precursora de constituintes celulares (Fig. 11) (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN et al., 2005).

A AOX tem uma baixa afinidade por oxigênio e, para contornar essa situação, esta enzima é produzida em grandes quantidades, chegando a representar mais de 30% do conteúdo de proteínas solúveis totais nas células cultivadas em metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000). Existem dois genes que codificam a álcool oxidase em *P. pastoris*, *AOX1* e *AOX2*. Muito embora as seqüências codificantes destes dois genes possuam 97% de homologia, o gene *AOX1* regula cerca de 80% da atividade da enzima álcool oxidase, enquanto o gene *AOX2* regula os 20% restantes (CREGG, 1989).

A expressão do gene *AOX1* é controlada em nível transcricional e sua regulação envolve mecanismos de repressão/desrepressão, e um de indução. O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido em células cultivadas com glicose e outras fontes de

carbono, no entanto, pode ser induzido em mais de 1000 vezes quando são cultivadas em meio contendo metanol como única fonte de carbono (CEREGHINO, 2002). Portanto, a ausência de uma fonte de carbono repressora, tal como glicose, não resulta em substancial transcrição de *AOX1*. Para que ocorra a indução de altos níveis de transcrição é essencial a presença do metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000). A capacidade de indução do promotor *AOX1* pelo metanol vem sendo utilizada para direcionar a produção de proteínas recombinantes em altos níveis, até mesmo com a integração de uma única cópia do cassete de expressão (CREGG et al., 2000; DALY; HEARN, 2005).



**Figura 11.** Metabolização do metanol em *P. pastoris*: 1 - Álcool oxidase; 2 - Catalase; 3 - Formaldeído desidrogenase; 4 - Formato desidrogenase; 5 - Deidroxiacetona sintetase; 6 - Deidroxiacetona quinase; 7 - Frutose-bifosfato aldolase; 8 - Frutose bifosfatase; 9 - Formaldeído redutase. Fonte adaptada de Zhang et al (2000) e Houard et al (2002).

### 2.13.3 – Promotores alternativos para expressão

Existem promotores alternativos para expressão de determinados tipos de genes, além do *AOX1*. O promotor *GAP* controla a expressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, necessitando de glicose como fonte de carbono. Este promotor vem sendo bem utilizado (WATERHAM et al., 1997; VASSILEVA et al., 2001; ALOULOU et al., 2006; LI et al., 2007; HONG et al., 2007), pois apresenta níveis satisfatórios de expressão podendo até superar a eficiência do promotor *AOX1*. Entretanto, por ser constitutivo, ele só é apropriado para proteínas recombinantes que não sejam tóxicas às células (CEREGHINO; CREGG, 2000).

O promotor *FDL1* controla a expressão do gene da enzima formaldeído desidrogenase, envolvida no metabolismo do metanol. Trata-se de um promotor forte, induzido por metanol e glicose. Quando induzido por metanol como única fonte de carbono necessita da amônia como a fonte de nitrogênio, quando a glicose for a única fonte de carbono disponível, é exigido a metilamina como fonte de nitrogênio. Isso proporciona maior

facilidade na produção de proteínas heterólogas uma vez que esta abordagem não é dependente apenas de metanol para produção (SHEN et al., 1998; RESINA et al., 2004; COIMBRA, 2007).

O promotor *PGK1* tem origem no gene da enzima 3-fosfoglicerato quinase, a qual participa tanto da via glicolítica quanto da via glicogênica. Alguns estudos utilizaram este promotor com células de leveduras e fungos filamentosos em crescimento celular onde a glicose era a principal fonte de carbono. Altos níveis de produção foram descritos quando comparadas com crescimentos em glicerol e metanol (ALMEIDA et al., 2005).

Existe ainda os promotores *YPT1*, induzido por manitol e constituído a partir do gene *GTPase* (SEARS et al., 1998) e o *PEX8*, que controla a proteína da matriz peroxissomal (LIU et al., 1995). No entanto, não são muito utilizados provavelmente pelos baixos níveis de produção obtidos (CEREGHINO; CREGG, 2000).

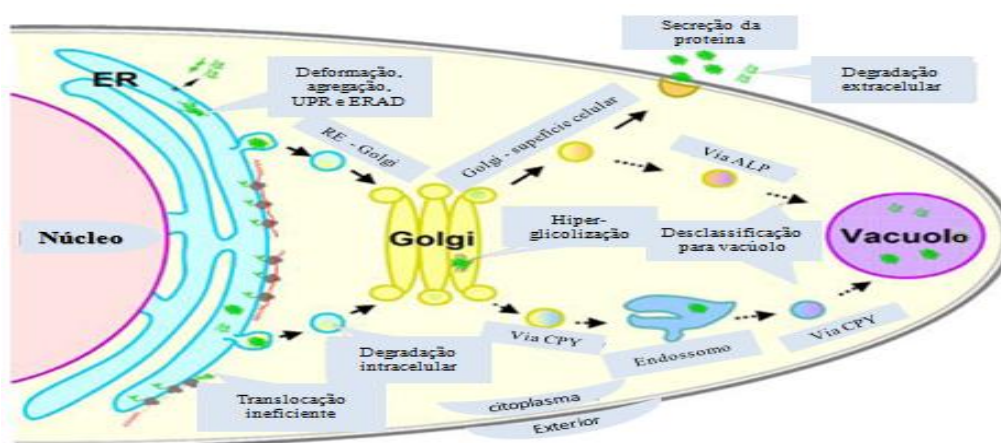
#### 2.13.4 – Linhagens de *P. pastoris*

De todas as linhagens de leveduras identificadas, são conhecidos apenas quatro gêneros que apresentam o metabolismo do metanol: *Hansenula*, *Pichia*, *Cândida*, *Torulopsis* (FABER et al., 1995). Várias linhagens de *P. pastoris* estão disponíveis para produção de proteínas recombinantes, sendo que todas elas derivam da linhagem NRRL-Y 11430 (CEREGHINO; CREGG, 2000; CEREGHINO; CREGG, 2001). Algumas possuem o genótipo modificado para atender diferentes aplicações, a exemplo das linhagens GS115 e KM71H que apresentam o gene da histidina desidrogenase (*HIS4*) inativo, funcionando como uma marca de seleção para os transformantes. Além destas há também a linhagem selvagem X-33. Os fenótipos associados ao metabolismo do metanol variam em relação ao consumo lento ou normal da fonte de carbono, que depende da interrupção ou não do gene *AOX1*, respectivamente (CEREGHINO; CREGG, 2000).

As linhagens X-33 e GS115 são exemplos de cepas *Mut<sup>+</sup>* (*Methanol utilization plus*) e a linhagem KM71H é *Mut<sup>S</sup>* (*Methanol utilization slow*) (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Linhagens que apresentem o gene *AOX1* intacto responsável por 85% da utilização de metanol, têm fenótipo *Mut<sup>+</sup>* com taxa de crescimento no metanol igual ao tipo selvagem. Estas linhagens possuem tanto o gene *AOX1* quanto o *AOX2*, o que aumenta sua afinidade com o metanol. A levedura que têm o fenótipo *Mut<sup>S</sup>* cresce e usa o metanol de maneira mais lenta por apresentar o gene *AOX1* interrompido. Assim, tanto o crescimento quanto a produção de proteína é dependente do gene menos ativo *AOX2* para metabolizar o

metanol (INAN; MEAGHER, 2001; DALY; HEARN, 2005). Trata-se de linhagens indicadas para produção intracelular da proteína heteróloga, pois possuem menores quantidades de enzima AOX, o que proporciona maior rendimento específico (SREEKRISHNA et al., 1997). Além disso, o crescimento lento do metanol favorece o processamento adequado das proteínas recombinantes em longas fermentações (CREGG et al., 1987). Linhagens com fenótipo Mut<sup>-</sup> (*Methanol utilization minus*) são deficientes em ambos os genes *AOX*, sendo inviáveis para o crescimento em metanol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A engenharia de produção de proteínas recombinantes vem centralizando a atenção no processamento das mesmas dentro das células. Sabe-se que a secreção destas proteínas envolve complexos sistemas sinalização, conformação da proteína, sistema de controle de qualidade, enzimas, vias de eliminação, entre outros. Resumidamente o processamento protéico inicia-se no retículo endoplasmático (RE), onde a proteína ainda em conformação irregular pode ser exportada para o complexo de Golgi. Neste local, elas também serão modificadas, antes de serem exportadas para os vacúolos, para o espaço extracelular, ou para outras organelas (KLAUSNER, 1989). O controle de qualidade do RE envolve a associação de elementos moleculares (ERAD) capazes de se agregarem às proteínas sinalizando seu destino. A prolongada ligação destes elementos moleculares às proteínas sinaliza a resposta de desdobramento da proteína (UPR) estimulando a proteólise e inibindo a transcrição e translocação da proteína (IDIRIS et al., 2010) (Fig. 12).



**Figura 12.** Um diagrama esquemático representando as típicas vias de processamento e secreção de proteínas heterólogas em leveduras. O tráfego no citosol e as vias de classificação protéicas são indicados. Via de secreção de proteína fosfatase alcalina (ALP) – proteína utilizando um adaptador AP (“alkaline phosphatase”); Via de secreção de proteína carboxi-peptidase (CPY) – proteína associada a uma sequencia sinal CP vacuolar (“carboxy-peptidase”) sinaliza destino da proteína. Fonte: adaptado de Idiris et al. (2010).



### 2.13.5 - Vetores de expressão gênica

A expressão de qualquer gene de interesse em *P. pastoris* compreende três passos principais: inserção do gene em vetor de expressão; introdução do vetor de expressão na levedura *P. pastoris* e avaliação do potencial dos clones recombinantes para a expressão do gene de interesse (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Em leveduras metilotróficas, os vetores utilizados para transformação são integrados ao genoma de forma estável, proporcionando um processo consistente de produção (GELLISSSEN, 2000).

Vetores plasmidiais desenhados para produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, comerciais ou não, apresentam algumas características em comum. Primeiramente, são vetores produzidos para utilização tanto em *E. coli* quanto na levedura em questão (MORTON; POTTER, 2000). De maneira geral, esses vetores contêm uma origem de replicação bacteriana e uma de levedura, além de marcas de seleção para um ou ambos os organismos (HIGGINS, 1998; CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2002). Certas características adicionais servem como ferramentas para funções especializadas, como é o caso da utilização bem sucedida do sinal  $\alpha$ -mating factor de *S. cerevisiae*, que codifica o peptídeo pré-pró fator  $\alpha$ , cuja função é dirigir a secreção da proteína recombinante (CEREGHINO; CREGG, 2000).

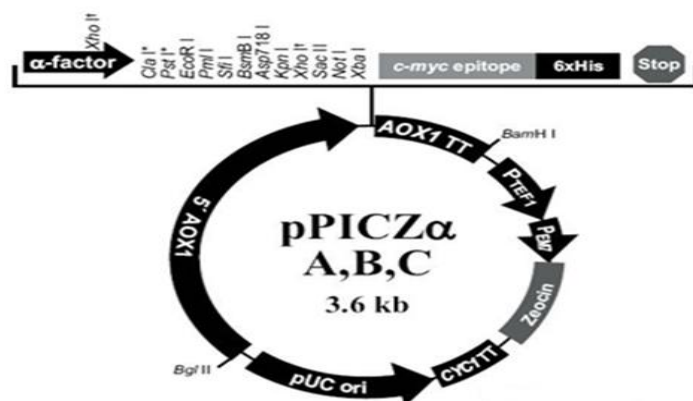
O vetor de expressão pPICZA apresenta como principal característica a sequência promotora do gene *AOX1* e a sequência de terminação da transcrição do *AOX1* (CEREGHINO; CREGG, 2000) (Fig. 13). Entre o promotor e a sequência finalizadora, existem múltiplos sítios de clonagem para inserção do gene exógeno de interesse. Além disso, o pPICZA apresenta duas sequências que possibilitam estratégias diferentes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. A primeira delas refere-se ao epítipo C-myc, cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção por anticorpo anti-myc. A outra sequência está relacionada à cauda de poli-histidina (6xHis), cujo epítipo C-terminal possibilita a detecção através do anticorpo anti-His e a purificação da proteína recombinante frente a cromatografia por afinidade (GELLISSSEN, 2000; TORRES; MORAES 2002; INVITROGEN, 2007).

Existem poucos genes conhecidos que conferem marcas de seleção nas leveduras *P. pastoris*. Ainda assim, foram desenvolvidos vetores como a série pPICZA, que contém o gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus*. Este gene confere resistência ao antibiótico zeocina<sup>TM</sup> em *E. coli*, e eucariotos de maneira geral. Estão ainda disponíveis, os genes da via biossintética *HIS4* de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*; e *ARG4*, também desta última. O

vetor pPICZA é do tipo integrativo, onde, após a transformação em *P. pastoris*, ocorre a integração do cassete de expressão em locus específico, originando transformantes geneticamente estáveis (HIGGINS et al.,1998).

Tanto em *S. cerevisiae* quanto em *P. pastoris*, existe uma tendência para recombinações homólogas entre seu genoma e DNAs artificialmente introduzidos. Os vetores integrativos devem ser linearizados mediante digestão em único sítio, o qual pode ser uma marca gênica ou o promotor (no caso do pPICZA, o promotor *AOX1*). A integração no genoma se dá via recombinação homóloga, já que o vetor contém regiões homólogas ao genoma de *P. pastoris*, podendo ocorrer por inserção ou substituição gênica (DALY; HEARN, 2005).

A integração por inserção ocorre em altas frequências (50-80%) por eventos de “crossover” únicos nos loci *HIS4* ou *AOX1* (ROMANOS, 1995; CEREGHINO; CREGG, 2000). Estas integrações podem ocorrer em *tandem* devido a eventos de recombinação repetidos numa taxa de 1-10% dos transformantes. A transformação de linhagens *Mut*<sup>+</sup> com vetores linearizados na região 5’ *AOX1* (promotor *AOX1*) promove a inserção por único *crossover* na região homóloga do locus *AOX1*, gerando transformantes *Mut*<sup>+</sup>, uma vez que o gene *AOX1* não é interrompido. A transformação de linhagens *Mut*<sup>S</sup>, por sua vez, origina apenas transformantes *Mut*<sup>S</sup> (DALY; HEARN, 2005).



**Figura 13.** Série de vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICZα. Fonte: adaptado de Manual de *Pichia pastoris*, Invitrogen (2009).

A substituição gênica em *P. pastoris* pode ser obtida pela digestão do cassete de expressão nas regiões 5’ e 3’ terminais, correspondentes às regiões 5’ e 3’ do locus *AOX1*. Trata-se, portanto, de um evento que ocorre por duplo “crossover” no locus gênico alvo, dando origem a transformantes de cópias únicas geralmente mais estáveis. Esse fenômeno

provoca deleção sítio-específica do gene *AOX1*, numa frequência de 5-25% dos transformantes (DALY; HEARN, 2005). Os eventos de substituição gênica ocorrem numa frequência menor do que a observada em *S. cerevisiae* e requerem sequências flanqueadoras longas para uma eficiente integração deste tipo (CREGG; RUSSEL, 1998).

#### 2.13.6 - *Pichia pastoris* x outros sistemas de expressão

A levedura *Pichia pastoris* pode ser manipulada por métodos genéticos clássicos tendo capacidade de produzir altos níveis de proteínas heterólogas intra e extracelularmente, além de atingir altas densidades em meios mínimos de baixo custo (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). No sistema com *Pichia pastoris*, a expressão extracelular é bastante utilizada porque a levedura secreta baixo nível de proteínas nativas e por isto a purificação da proteína heteróloga se faz de maneira simples. A purificação das proteínas de secreção extracelular é considerada mais simples do que aquelas de expressão voltada para o interior da célula (REES et al, 1999).

A maior vantagem do sistema heterólogo baseado em células de *P. pastoris* sobre os sistemas de expressão em bactérias é o potencial para fazer muitas modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores, como processamento de sequência sinais, conformação, formação de pontes dissulfeto, certos tipos de adição de lipídeos, e glicosilações, modificações necessárias para a atividade biológica das proteínas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

O processo de glicosilação corresponde à transferência de oligossacarídeos, a maioria o açúcar manose, aos aminoácidos da cadeia polipeptídica em formação (WATSON, 2006). As glicosilações de proteínas heterólogas realizadas por *P. pastoris* e outros fungos não parecem ser uma etapa tão simples, no entanto, isto não constitui problema para produção da proteína recombinante em questão, uma vez que a p26 não sofre glicosilações em sua forma nativa (STEPHENS et al., 1986; HUSSAIN et al.; 1988).

Os sistemas baseados em leveduras metilotróficas não oferecem dificuldades geralmente encontradas nos sistemas de produção baseados em *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar de ser a levedura mais utilizada e bem conhecida geneticamente, a *S. cerevisiae* possui uma série de inconvenientes como instabilidade mitótica de linhagens recombinantes, promove hiperglicosilação das proteínas e empecilhos na adaptação de esquemas de produção para escala industrial (CEREGHINO; CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Além disso, não atinge altos níveis de expressão,

seus produtos revelam considerável variabilidade conformacional e podem não produzir as proteínas em seus tamanhos originais (GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997; BRADY et al., 2001).

Para a expressão em células de *P. pastoris*, a utilização de um promotor forte, referente ao gene codificante da enzima álcool oxidase (AOX), induzido por metanol, constitui uma escolha econômica (JESUS, 2008). A fermentação com *Pichia pastoris* pode ser feita facilmente em larga escala para atender a demandas maiores, e os parâmetros que influenciam a produção e atividade da proteína como pH, aeração e quantidade de carbono, podem se bem controlados (HIGGINS; CREGG, 1998). A referida levedura não é uma forte fermentadora como a *S. cerevisiae* e conseqüentemente, não atinge com rapidez, níveis tóxicos de etanol e ácido acético para as células (CEREGHINO et al., 2002).

Apesar de muitas publicações detalharem a utilização de sistema de expressão como *E. coli* e *S. cerevisiae* com fins investigativos, ainda há muita dificuldade em encontrar detalhes sobre o real processo de produção das proteínas. Os níveis de produção são frequentemente omitidos ou não declarados em unidades comparáveis. Expressões como "overexpressed" são muito utilizadas, oferecendo um dado qualitativo e não quantitativo. Muitos pesquisadores publicam níveis de produção em unidades de bioluminescência, sem relacionar esses números para a produtividade de seu processo em particular, tornando extremamente difícil estabelecer comparações entre a produção de proteínas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Em contraposição a *Pichia pastoris* é uma levedura que atinge gramas/litro de proteína e apresenta um padrão de glicosilação mais simples, semelhante aos mamíferos (SUDBERY, 1996).

Células de inseto, tais como *Spodoptera* e *Trichoplusia* demonstraram ser competentes com relação a glicosilação das proteínas recombinantes, com a vantagem de que as sequências do peptídeo sinal são reconhecidos de um modo semelhante às células de mamíferos (KING; POSSEE, 1992). No entanto, problemas tem sido relatados sobre a "over-glicosilação" de proteínas (MORTON; PORTER, 2000).

Li et al. (2007), depois de clonar e expressar o gene codificante da enzima lacase B advindo do basidiomiceto *Trametes* sp., em *P. pastoris*, analisou sua atividade enzimática e estabilidade. Além de ter sido obtido altos níveis da proteína recombinante, os resultados também revelaram que o processo de produção em *P. pastoris* (SODEN et al. 2002; LIU et al. 2003) foi considerado mais seguro do que o utilizado em outros microrganismos experimentais como *Saccharomyces cerevisiae* (LARSSON et al. 2001; BULTER et al.

2003), *Aspergillus niger* (RECORD et al., 2002) e *Aspergillus oryzae* (HOSHIDA et al., 2005), cujos autores descrevem rendimentos de lacase em níveis insatisfatórios.

#### 2.13.7 – A estratégia de “codon usage” e a integração do cassete de expressão em *P. pastoris*.

Diferentes combinações de nucleotídeos são capazes de codificar a mesma proteína. Alguns organismos estão adaptados à utilização de códons específicos. Dessa forma, quando se insere certo gene num determinado organismo, é possível que a utilização preferencial de códons deste último não esteja correlacionada ao inserto. Esse dado possui um impacto significativo na produção de proteínas recombinantes (GUSTAFSSON et al., 2004).

Quando códons não muito comuns ocorrem num gene heterólogo é pouco provável que a proteína recombinante seja expressa em altos níveis. Assim, os códons raros devem ser identificados e modificados para códons preferenciais do hospedeiro utilizado, o que pode ser feito por mutagênese dirigida ou por síntese de um gene inteiramente otimizado (GUSTAFSSON et al., 2004). Segundo Hu et al. (2006) a otimização dos códons e a diminuição do conteúdo G+C no gene sintético (de 56% para 43%) desempenharam efeito marcante na produção protéica, proporcionando um aumento no rendimento da proteína de até cinco vezes.

Diversos estudos comprovam, sob diferentes aspectos, a eficiência de sistema de expressão utilizando células de *P. pastoris*, tanto no que se refere à produção de proteínas extra e intracelularmente secretadas, quanto no que diz respeito à inserção do cassete de expressão, que pode ser integrativa ou episomal (HASSLACHER et al., 1997; LI et al., 2003; BAZAN et al., 2009). Mesmo assim, dados demonstram que alguns genes não expressam nenhuma quantidade mensurável de proteínas em *P. pastoris*. Isto geralmente está associado às marcas de terminação transcricional em leveduras, representadas por regiões gênicas ricas em A-T, produtoras de RNAm truncados (ROMANOS, 1995). Tal problema pode ser solucionado através da utilização da estratégia “codon usage”, ou seja, produção de gene sintético com sequência nucleotídica otimizada para produção de determinada proteína direcionada especificamente a um microrganismo hospedeiro (ROMANOS et al., 1992).

Era de se esperar que uma única cópia do vetor de expressão utilizando o promotor *AOXI* fosse suficiente para induzir a expressão do gene de interesse em quantidades

significativas (KOTZÉ, 2007). Em um estudo para otimização da expressão em *P. pastoris*, observou-se que o número de cópias do gene não desempenhou efeito significativo na expressão (HU et al., 2006). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que o aumento no número de cópia de genes de interesse pode ter relação direta com o ganho nos níveis de expressão (CLARE et al., 1991; VASSILEVA et al., 2001).

A obtenção de linhagens com múltiplas cópias pode ser realizada através de dois métodos distintos. Em um realiza-se um “screening” para identificar os clones com múltiplas cópias. E em outra, é introduzida múltiplas cópias do cassete de expressão dentro de um único vetor antes da transformação (CREGG et al., 1993).

### 2.13.8 - Fatores interferentes na fase indutiva da produção da proteína recombinante

#### 2.13.8.1 - Nutrição

A indução da produção da proteína recombinante pelo promotor *AOX* consome quase toda a energia obtida a partir da fonte de carbono indutora, de forma que muito pouco é empregado no crescimento e na manutenção celular. Algumas fontes de carbono e/ou metabólitos presentes no meio de crescimento contendo metanol reprimem ou não induzem o promotor *AOX*, comprometendo efetivamente a produção protéica. Para contornar esse empecilho, certas estratégias de cultivo envolvem uma mistura de diferentes fontes de carbono não repressoras que possam favorecer o crescimento e manutenção celular durante a fase de indução, otimizando os níveis de expressão em *P. pastoris* (MARIZ, 2009).

O cultivo de *P. pastoris* para produção de proteínas heterólogas pode ser realizado basicamente em três estágios. No primeiro, a levedura recombinante é cultivada em meio contendo uma fonte de carbono não fermentável, como o glicerol. Após a redução das concentrações deste nutriente no meio, inicia-se o segundo estágio, que corresponde à fase de transição (INAN; MEAGHER, 2001).

Este segundo momento é importante porque proporciona a depleção dos produtos metabólitos gerados durante o estágio inicial de cultivo, favorecendo o início da indução. Por fim, a adição de concentrações limitantes de metanol ao crescimento celular e consequente produção da proteína recombinante caracteriza a terceira fase, também chamada fase de indução. Um esquema alternativo de cultivo aborda a utilização de distintas fontes de carbono simultaneamente, onde uma possa promover o crescimento e

divisão celular e a outra possa induzir a produção da proteína heteróloga (como glicerol e metanol, respectivamente). Embora este esquema potencialize a produtividade, a obtenção maximizada dos níveis protéicos pode ficar comprometida pela ausência de controle fino dos níveis residuais de glicerol, que reprime parcialmente o promotor *AOX1* (INAN; MEAGHER, 2001).

O sorbitol é caracterizado como uma fonte de carbono não repressora para *P. pastoris*, proporcionando níveis de produção similares aos obtidos quando se utiliza glicerol para obtenção de biomassa. Da mesma forma, manitol, trealose e alanina também são descritos como fontes de carbono não repressoras (SREEKRISHNA et al.1997; CHAUHAN et al.,1999). Xie et al. (2005) utilizaram o ácido láctico como principal fonte de carbono para produção de angiostatina. A acumulação desta fonte no caldo fermentador não reprimiu a expressão heteróloga, pelo contrário, seu rendimento aumentou em até 2,5 vezes. Através de um estudo comparativo, ficou evidenciado que a taxa de crescimento celular no ácido láctico era muito menor do que no sorbitol, enquanto a produção volumétrica de angiostatina apresentava-se mais elevada. A partir destes dados pode-se concluir que uma maior quantidade de proteína recombinante foi produzida em uma menor densidade de células, num período mais curto.

#### 2.13.8.2 - Influência do pH, proteólise e temperatura

O efeito do pH na produção de proteínas intracelulares não é tão grande quanto o observado no produto extracelular. A faixa ótima de pH para crescimento e produção em *P. pastoris* está entre 5 e 6 (INVITROGEN, 2007), mas alguns autores têm relatado que a manutenção do pH acima de 6 durante a fase de indução diminui a atividade de proteases e, conseqüentemente, a degradação do produto extracelular recombinante. Resultados semelhantes foram obtidos através da adição de ácido casamino durante a indução (SREEKRISHNA et al., 1997).

A proteólise ocorre na maior parte das células após certo tempo de fermentação, sendo resultado da liberação de proteases extracelulares, estando intimamente relacionada ao pH e à temperatura de cultivo (MARIZ, 2009). Durante a fermentação na produção de interferons (proteína secretada) recombinantes proveniente de ovinos em *Pichia pastoris*, foram observadas taxas significativas de degradação protéica após 48 horas da indução. Proteases, cuja principal fonte era os vacúolos, foram encontradas em níveis crescentes no citoplasma e no caldo de fermentação após 48 h da indução, atingindo valores máximos em

72 horas, quando o experimento foi concluído. Níveis de protease em diferentes frações de células, bem como no sobrenadante da cultura, foram menores quando o glicerol foi utilizado como fonte de carbono, ao invés de metanol. Pode-se concluir que o metabolismo do metanol, juntamente com a lise celular contribui para o aumento da atividade proteolítica e eventual degradação da proteína recombinante (SINHA et al., 2004).

Jahic et al. (2003) compararam a técnica de indução alimentada com metanol (tradicional), com a técnica cujo controle de temperatura era mais rigoroso, para produzir uma proteína de fusão recombinante, secretada pela cepa *Mut<sup>+</sup>* de *P. pastoris*. A concentração da proteína produzida no processo tradicional foi bem menor e com significativa degradação proteolítica. No entanto, ao aplicar o processo com controle de temperatura, o rendimento foi duplicado obtendo-se o produto completo, sem degradação por proteases. Uma análise de citometria de fluxo mostrou o percentual de células mortas durante o experimento, fato que se relaciona diretamente com a proteólise, uma vez que a morte celular proporciona a liberação de proteases intracelulares para o meio. Concluiu-se que três mecanismos podem contribuir para o acúmulo maior de produtos no processo com controle mais rigoroso da temperatura, são eles: proteólise reduzida devido à baixa temperatura, redução da morte celular e aumento da taxa de síntese, devido à maior atividade da AOX. Este fato sugere a existência de uma temperatura ótima para a atividade da AOX.

Embora a faixa de temperatura considerada ótima para *P. pastoris* seja entre 28 e 30°C, menores temperaturas podem aumentar a produção da proteína recombinante. Li et al. (2001) demonstraram que a utilização de temperaturas reduzidas, mais precisamente 23°C, refinaram a produtividade sem comprometer o crescimento celular. Por fim, a diminuição da temperatura de 30°C para 20°C durante a fase de indução, reduz os problemas de envelhecimento da proteína por conta da menor taxa de crescimento celular e, portanto, confere mais tempo para o processamento protéico (HONG et al., 2002). No entanto, é preciso avaliar com cautela as modificações na temperatura de crescimento, pois isto pode causar um estresse celular levando ao surgimento de efeitos contrários aos esperados.

#### 2.14 - Novas perspectivas na engenharia de produção de proteínas recombinantes em leveduras

Atualmente uma nova abordagem da engenharia genética tem sido o método mais útil e eficaz para a superação dos inconvenientes que influenciam a quantidade e a qualidade dos



produtos gerados pelos sistemas de produção de proteínas recombinantes em leveduras, consideradas como “unidades de produção”. A produção de proteínas heterólogas em leveduras, é muitas vezes, limitada a níveis relativamente baixos, o que pode estar relacionado a uma gama de fatores como propriedades da proteína-alvo, tipo de célula hospedeira, condições de cultivo, sistema vetorial, escolha do promotor, códons utilizados, sequências líderes, peptídeos sinais, processamento, dobramento e secreção (MATTANOVICH et al., 2004; NIEBAUR; ROBINSON, 2005).

A engenharia molecular tem direcionado esforços com o objetivo de otimizar o processo de secreção de proteínas recombinantes. Tal abordagem denota certo nível de complexidade uma vez que existe uma interdependência entre os diversos fatores acima relacionados. Isso indica a necessidade no desenvolvimento de novas estratégias que possam promover modificações capazes de tornarem os sistemas de produção ainda mais eficientes. A essa nova tendência da engenharia genética dá-se o nome de pós-genômica. Tais estudos envolvem conhecimentos em genômica, proteômica, transcriptoma e dados metabólicos. Uma das estratégias utilizadas tem sido direcionada à bibliotecas de cDNA de levedura que superexpressam proteínas heterólogas. Além disso, ferramentas analíticas como os microarranjos de DNA são considerados como fontes de dados para o direcionamento dos efeitos fisiológicos, regulação do estresse, e engenharia de linhagens hospedeiras. Outras estratégias atuais de engenharia de produção de proteínas recombinantes nas células de leveduras têm sido trabalhadas em quatro tópicos principais: engenharia de enovelamento de proteínas e sistema de controle de qualidade do retículo endoplasmático; engenharia da via intracelular de proteínas; minimização de degradação proteolítica pós-secreção; engenharia de glicosilação pós-traducional, neste caso mais direcionado a produção farmacêutica (IDIRIS et al., 2010).

Sauer et al. (2004) analisaram o diferencial do transcriptoma de uma cepa de *P. pastoris* que superexpressa tripsinogênio humano em comparação com uma cepa incapaz de expressar. Usando técnicas de rastreamentos clássicos e várias novas ferramentas de pós-genômica, muitos genes de levedura relacionados com a engenharia de secreção foram encontrados. No entanto, é evidente que os genes identificados variam em função, e que uma única modificação pode ter um efeito limitado sobre as proteínas de secreção. Isso indica a necessidade de várias modificações, como deleção, co-expressão ou superexpressão de vários genes. Alguns autores demonstram claramente o efeito sinérgico de várias modificações genéticas embora tenha ficado claro que outras modificações ou combinações fossem ainda necessárias (TAKEGAWA et al., 2009).

Alguns estudos quanto a otimizações de sistema vetorial e fermentação já estão bem estabelecidos (BÖER et al., 2007). Mais recentemente a engenharia de células vem trabalhando para ajustar a maquinaria celular em prol da produção da proteína-alvo. Estes processos progredem rapidamente, fornecendo informações sistemáticas e soluções para superar os gargalos do sistema de secreção em leveduras (IDIRIS et al., 2010).

### 3 - REFERÊNCIAS

- AAHSA. American Association for Horsemanship Safety. Disponível em <http://www.horsemanshipsafty.com/>. Acesso em: 21.04.2010.
- ALMEIDA, H. B. 2001. **Sincronização do estro e dinâmica folicular de éguas crioulas submetidas a tratamentos com Norgestomet, Acetato de Melengestrol e Altrenogest.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 100p.
- ALMEIDA, J.R.; MORAES, L.M.; TORRES, F.A.. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725-737, 2005.
- ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. ; HADDAD, J. P. A.; DIAS, R. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 141-148, 2006.
- ALOULOU, A.; GRANDVAL, P.; DE CARO, J.; DE CARO, A.; CARRIERE, F..Constitutive expression of human pancreatic lipase-related protein 1 in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 2, p. 415-421, 2006.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; OSTUND, E.; BARRANDEGUY.; TRONO, K. Western Blot Assay Using Recombinant *p26* Antigen for Detection of Equine Infectious Anemia Virus-Specific Antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 12, p. 1616-1648, 2007.
- ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E. & TRONICK S.R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, 1167–1173, 1989.
- BANCO de dados agregados. IBGE, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acessado em: 10 de maio. 2009.
- BARNARD, R. J., e J. A. YOUNG. 2003. Alpharetrovirus envelope-receptor interactions. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 281:107–136.
- BATISTA JÚNIOR, J. A.; FONSCECA, V. O. Anemia infecciosa equina. **Arq Esc. Vet.** v. 23, p.281-290, 1971.

- BAZAN, S. B.; CHAVES, A.; MUNIZ, A.; 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.** 154: 1609-1617, 2009.
- BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Can. Vet. J.** v.45, p. 753-757, 2004.
- BILLMAN-JABOCE, H.. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 500-504, 1996.
- BIRKETT, A.J.; YÉAMOS, B.; CRESPO, I. R.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning expression purification, and characterization of the major core protein (*p26*) from equine infectious anemia virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, p. 62-72, 1997.
- BÖER E, STEINBORN G, KUNZE G, GELLISSEN G .Yeast expression platforms. **Appl Microbiol Biotechnol** 77:513–523, 2007.
- BOUILLANT A. M.; NIELSEN K., RUCKERBAUER G. M.; SAMAGH B.S.; HARE W. C.; The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. **J. Virol. Methods.** n.13, p. 309–321, 1986.
- BRADFORD, MM . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254, 1976.
- BRADY C.P., SHIMP R.L., MILES A.P., WHITMORE M., STOWERS A.W. Highlevel production and purification of P30P2MSP119 an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 23: 468-475, 2001.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, Instrução Normativa nº 15, 02.04.2008. **Diário Oficial da União**, nº 65, Seção 1, p. 2, 04.04.2008.
- BRINDLEY, M. A., e W. MAURY. Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. **J. Virol.** 79:14482–14488, 2005.
- BROWN, T.A.. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: uma Introdução**. 4. ed. Porto Alegre:Artmed, 2003, 240p.

- BULTER, T.; ALCALDE, M.; SIEBER, V.; MEINHOLD, P.; SCHLACHTBAUER, C.; ARNOLD, F. H. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. **Appl Environ Microbiol**, 69:987–995, 2003.
- BÜRKI, F., W. ROSSMANITH, e E. ROSSMANITH. Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anaemia. **Vet. Microbiol.** 33:353–360, 1992.
- BYRNE, R. J. Equine Infectious anemia. Resumo in Progress equine practice. **Md Vet.**, p.6-8, 1960.
- CAMARGOS, M. F. **Vírus da Leucemia Bovina: Epidemiologia Molecular e Diagnóstico**, 2005. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CARPENTER, S., e B. CHESEBRO. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. **J. virol.** 63: 2492– 2496, 1989.
- CARPENTER, S., EVANS, L.H., SEVOIAN, M., CHESEBRO, B. Role of the host immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. **J. Virol.** 61, 3783–3789, 1987.
- CARVALHO M., Derse D., Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the equine infectious anemia virus promoter, **J. Virol.** 67: 2064–2074, 1993.
- CAVALCANTE, P. H. **Risco de transmissão do vírus da anemia infecciosa equina por equídeos errantes no Município de Mossoró – RN.** 2009. 36f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró.
- CEREGHINO J. L.; CREGG J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology** 24: 45-66, 2000.
- CEREGHINO J.L. e CREGG J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, 24:45-66, 2001.
- CEREGHINO, G.L. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.
- CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotech.**, 13: 329-332.
- CHAUHAN, A.K.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 139-145, 1999.

- CHONG, Y.H.; PAYNE, S.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.; RUSHLOW, K. J. **Viol.** 65, 1007–1012, 1991.
- CHUNG, C.; MEALEY, H. R.; McGUIRE, T. C. Evaluation of high functional avidity CTL to Gag epitope clusters in EIAV carrier horses. **Virology**, 342: 228-239, 2005.
- CLARE, J.J.; ROMANOS, M.A.; RAYMENT, F.; ROWEDDER, J.E.; SMITH, M.A.; PAYNE, M.M.; SREEKRISHNA, K.; HENWOOD, C.A.. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, v. 105, p. 205-212, 1991.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infectious. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.
- CNA. Comissão Nacional de Equinocultura na Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/noticias/>. Acesso em: 18.04.10
- COFFIN, J. M. **Retroviridae**: the virus their of replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNAOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. Fields Virology, Philadelphia, Lippincott-Raven, p.1767-1847, 1996.
- COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 757p. 1997. Appendix 2: Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps.
- COGGINS, L., NORCROSS N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Vet.** v. 60, n. 2, p. 330-335, 1970.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM, S. R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. **Am. J. Vet. Res.** v. 33, n. 1, p. 11–18, 1972.
- COIMBRA, E.C. **Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do papilomavírus humano tipo 16**. 2007. 104p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- COLE K.S., ROWLES J.L., JAGERSKI B.A., MURPHEY-CORB M., UNANGST T., CLEMENTS J.E., ROBINSON J., WYAND M.S., DESROSIERS R.C., MONTELARO R.C., Evolution of envelop specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity, **J. Virol.** 71:5069–5079, 1997.

- COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M.J. (Ed.), *Virus Infections of Equines*. **Elsevier**, Amsterdam, p. 297–323, 1996.
- COOK, S.J.; COOK, R.F., R.C. MONTELARO, ISSEL, C.J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Veterinary Microbiology**, v. 79, p. 93-109, 2001.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Anemia infecciosa equina. In\_\_\_\_. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, Cap. 76, p. 695-698, 1992.
- CRAWFORD, J.B.; CHEEVERS, W.P.; KLEVJER-ANDERSON, P.; McGUIRE, T.C. Equine infectious anemia: Virion characteristics, virus cell interactions, and host responses, in: **Persistent Viruses**, v.11, p.155-162, 1978.
- CRAWFORD, T.B.; WARDROP, K.J.; TORNQUIST, S.J.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; MCGUIRE, T.C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **Journal of Virology**, v.70, n.11, p.7842-7850, 1996.
- CREGG, J.M.; RUSSELL, K.A. Transformation. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 27-39, 1998.
- CREGG, J.M.; TSCHOPP, J.F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W.S.. High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, v. 5, p. 479-485, 1987.
- CREGG, J.M., MADDEN, K.R., BARRINGER, K.J., THILL, G.P., STILLMAN, C.A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, 9(3): 1316-1323, 1989.
- 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.
- CREGG, J. M., et al., Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol**, 16: 23-52, 2000.
- DALY R.; HEARN, M. T.W. Expression of Heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit**. 18: 119-138, 2005.
- DELEVATTI, C. **Ações de controle e erradicação da anemia infecciosa equina no Estado de Mato Grosso do Sul em 2007**. 2008. 33f. Trabalho de conclusão (Especialização *lato senso* em Vigilância em saúde e defesa animal) – Universidade Castelo Branco, Campo Grande.

- DUPONT, O. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa equine no Rio de Janeiro In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 11. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1, 1968, Niterói. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 160-161, 1968.
- EGBERINK, H. F.; EDERVEEN, J.; MONTELARO, R. C.; PEDERSEN, N. C.; HORZINEK, M. C.; KOOLEN, M. J. Intracellular proteins of feline immunodeficiency virus and their antigenic relationship with equine infectious anaemia virus proteins. **J. Gen. Virol.** 71: 739-743, 1990.
- FABER, K. N.; HARDER, W.; A. B. G.; VEENHUIS, M. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast** 11:1331–1344, 1995.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 20 de abril 2010.
- FERRAZ, I. B. F. **Vírus da Anemia Infecciosa Equina: amplificação por PCR do DNA proviral da gp90, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras**, 1998. 153f. Tese (doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007.
- FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. Y.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 155-156, 1983.
- GELLISSSEN, G.; HOLLENBERG, C.P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. **Gene**, v. 190, p. 87-97, 1997.
- GELLISSSEN, G.. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.
- GELLISSSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J.M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; VAN DER KLEI, I.. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p.1079-1096, 2005.
- GOUDSMIT, J.; HOUWERS, D. J.; SMIT, L.; NAUTA, I. M. LAV/HTLV-III gag gene product p24 shares antigenic determinants with equine infectious anemia virus but not



- with visna virus or caprine arthritis encephalitis virus. **Intervirology**, 26, 169-173, 1986.
- GUERREIRO, M.G.; BAUER, A. G.; GLOSS, R. M. et al. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor**, n. 2, p. 3-4, 1968.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J.. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 346-353, 2004.
- HAMMOND S.A., LI F., MCKEON B.M.S., COOK S.J., ISSEL C.J., MONTELARO R.C., Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus, **J. Virol.** 74 : 5968–5981, 2000.
- HASSLACHER, M.; SCHALL, M.; HAYN, M.; BONA, R.; RUMBOLD, K.; LUCKL, J.; GRIENGL, H.; KOHLWEIN, S.D.; SCHWAB, H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. **Protein expression and purification**, v. 11, p. 61-71, 1997.
- HAWKINS J.A., ADAMS W.V., WILSON B.H., ISSEL C.J., ROTH E. E. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. **J Am Vet Med Assn**, 168:63-64, 1976.
- HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; SOUZA, M. C. C.; GOTTI, T.; FERREIRA, F. Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da artrite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. **Braz. J. Vet. Revanim. Sci.**, São Paulo, v. 39, n.1, p. 50-53, 2002.
- HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. *Pichia* protocols. **Human Press**, Totowa, N. J, 1998.
- HIGGINS, D.R.; BUSSER, K.; COMISKEY, J.; WHITTIER, P.S.; PURCELL, T.J.; HOEFFLER, J.P.. Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 41-53, 1998.
- HIRSCH, C. **Caracterização molecular do vírus da leucose enzoótica bovina: análise filogenética das regiões gênicas 5' LTR e pol de amostras brasileiras, 2005**. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HONG, F.; MEINANDER, N.Q.; JONSSON, L.J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438-449, 2002.
- HONG, I.; LEE, S.; KIM, Y.; CHOI, S. Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. **Biotech. Lett**, 29: 73-78, 2007.

- HOSHIDA, H.; FUJITA, T.; MURATA, K.; KUBO, K.; AKADA, R. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci Biotechnol Biochem**, 69:1090–109, 2005.
- HOUARD, S.; HEINDERYCKX, M.; BOLLEN, A.. Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. **Biochimie**, v. 84, p.1089-1093, 2002.
- HU, W.S.; TEMIN, H.M. Retroviral recombination and reverse transcription. **Science**, v.250, p.1227-1233, 1990.
- HU, S.; LI, L.; QIAO, J.; GUO, Y.; CHENG, L.; LIU, J.. Codon optimisation, expression and characterisation of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 249-257, 2006.
- HUSSAIN, K. A.; ISSEL C. J.; RWAMBO P. M.; ARNIZAUT A. B.; BALL J. M.; SCHNORR K. L.; MONTELARO R. C. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26, **J. Gen. Virol.** 69:1719–1724, 1988.
- IDIRIS, A.; TOHDA H.; KUMAGAI, H.; TAKEGAWA, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **App. Microb. and Biotech**, vol. 86, 2: 403-417, 2010.
- INAN, M; MEAGHER, M. M. The effect of ethanol and acetate on protein expression. **J Biosci. Bioeng.** 92: 337-341, 2001.
- INVITROGEN. *Pichia* spression kit. A manual of methods for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. Catague n K1710-01. San Diego, USA: Invitrogen Co, 2009.
- ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 174, 727–733, 1979.
- ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; FOIL, L.D. Prospective study of the progeny of inapparent carriers of equine infectious anemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1114-1116, 1985.
- ISSEL, C.J.; COOK, R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 5, 137–141. 1993.
- JAHIC, M.; WALLBERG, F.; BOLLOK, M.; GARCIA, P.; ENFORS, S.. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 2, n. 1, p. 6, 2003.

- JESUS, A.L.S.. Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em *Pichia pastoris*. 2008. 74 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- JIN, Z.; JIN, L.; PETERSON D. L., LAWSON, C. L. J. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26. **Mol. Biol.** 286: 83 – 93, 1999.
- JIN, S.; ZHANG, B.; WEISZ, O. A.; MONTELARO, R. C. Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14489-14497, 2005.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W.; **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2004.
- KARAM, C. H. V.; ROLIM, M. F.; GRAÇA, F.A.S.; ARAGÃO, A.P. Anemia infecciosa equine no Estado dom Rio de Janeiro: Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Revista eletrônica novo enfoque**, Rio de Janeiro, v. 09, n. 09, p. 01-13. 2010. Disponível em:< [www.castelobranco.br/sistema/novoenfoco](http://www.castelobranco.br/sistema/novoenfoco)> Acesso em: 01.2011.
- KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. **Journal of Virology**, v. 66, p. 3879-3882, 1992.
- KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system: A laboratory guide**. Chapman and Hall, New York, NY, 1992.
- KLAUSNER RD. Architectural editing: determining the fate of newly synthesized membrane proteins. **New Biol** 1:3–8, 1989.
- KOBAYASHI, K., KONO, Y. Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. **Natl. Inst. Anim. Health Q.** v. 7, n.1, p. 8–20, 1968.
- KOBAYASHI, K., KUWAE, S., OHYA, T., OHDA, T., OHYAMA, M., TOMOMITSU, K. High level secretion of recombinant human serum albumin by fedbatch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 90:280–288, 2000.
- KONEMAN, E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KONG X. K., PANG H., SUGIURA T., SENTSU H., ONODERA T. MATSUMOTO Y. & AKASHI H. Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. **Microbiol. Immunol.**, v.41, p.975–980, 1997.

- KONO, Y., KOBAYASHI, K., FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. **Arch Virol**, 41:1-10, 1973.
- KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. **National Institute of Animal Health Quarterly**, Tokyo, v.16, p.8 -15, 1976.
- KOTZÉ, L.. Development of *Pichia pastoris* as a production system for HPV16 L1 virus-like particles as component to a subunit vaccine. 2007. 87p. Dissertação (mestrado) – University of Stellenbosch. Stellenbosch, South Africa.
- LAGE, R. A., QUEIROZ, J.P.A.; SOUSA, F. D. N.; ANGRA, E. G. D.; IZAEL, M. A.; DIAS, R. V. C. Fatores de risco para a transmissão da anemia infecciosa equina, leptospirose, tétano e raiva em criatórios equestres e parques de vaquejada no Município de Mossoró, RN. **Acta veterinária Brasília**, v. 1, n.3, p.84-88, 2007.
- LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1481-1487, 1996.
- LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JÖNSSON, L. J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Appl Environ Microbiol**, 67:1163–1170, 2001.
- LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **J. Virol.**, v.71, p.9627-9639, 1997.
- LEROUX, C.; CRAIGO, J.K.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. **J. Virol.**, v.75, p. 4570-4583, 2001.
- LEROUX, C.; CADORÉ J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, v. 35, p. 485-512, 2004.
- LI, Z.; XIONG, F.; LIN, Q.; D'ANJOU, M.; DAUQUILIS, A.J.; YANG, D.S.; HEW, C.L..Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 3, p. 438-445, 2001.

- LI, P.C.; ZHANG, X.G.; ZHOU, L.; ZENG, Y.. Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v. 17, n. 4, p. 310-314, 2003.
- LI, J. F.; HONG, Y. Z.; XIAO, Y. Z.; XU, Y. H.; FANG, W. High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. **World J. Microbiol. Biotech**, 23: 741-745, 2007.
- LIGNÉ, M. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydrohémie, cachexie acquise Du cheval, **Rev. Med. Vet. Ec. Alfort**. p. 30–44, 1843.
- LIU H.; TAN X.; RUSSELL, K. A.; VEENHUIS, M. ; CREGG, J. M. PER. A gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. **J Biol Chem**, 270(18):10 940, 1995.
- LIU, W.; CHAO, Y.; LIU, S.; BAO, H.; QIAN, S. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 63:174–181, 2003.
- LLOBERAS J., SOLER C., CELADA A., The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages, **Immunol. Today** 20:184–189, 1999.
- MACAULEY-PATRICK S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast** 22: 249-270, 2005.
- MALMQUIST W.A., BARNETT D. & BECVAR C.S. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. **Arch. Gesamte Virus for sch.**, v.42, p.361–370, 1973.
- MANSKY, L.M; TEMIN, H.M. Lower rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. **J. Virol.**, v.68, n.1, p.494-499, 1994..
- MARIZ, F. C. **Utilização da levedura *Pichia pastoris* no desenvolvimento de um sistema para produção de vírus-like particles baseadas na proteína capsidial L1 de BPV2**. 2009. 110f. Monografia de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MARSH, M., E A. HELENIUS. Virus entry: open sesame. **Cell** 124:729–740, 2006.
- MARTINS, M. F. **Comparação entre os testes IDGA(p26) e ELISA indireto (gpr90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- MASON, H. S.; ARNTZEN, C.J. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol* 13:388–392, 1995.
- MATTANOVICH D, GASSER B, HOHENBLUM H, SAUER M . Stress in recombinant protein producing yeasts. **J Biotechnol** 113:121–135, 2004.
- MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K., PORTER, J.P., SMITH, B. J., NEWMAN, L. E. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 50-52, 1989.
- MAURY W., Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus,**J. Virol.** 68: 6270–6279, 1994.
- MAURY W., OAKS J.L., BRADLEY S., Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus, **J. Virol.** 72:9291–9297, 1998.
- MAURY, W., R. J. THOMPSON, Q. JONES, S. BRADLEY, T. DENKE, P. BACCAM, M. SMAZIK, e J. L. OAKS. Evolution of the equine infectious anemia virus long terminal repeat during the alteration of cell tropism. **J. Virol.** 79: 5653–5664, 2005.
- MCCARROLL, L.; KING, L.A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Curr Opin Biotechnol**, 8:590–594, 1997.
- MCCLURE J.J., LINDSAY W.A., TAYLOR W., OCHOA R., ISSEL C.J.,COULTER S.J. Ataxia in four horses with equine infectious anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.180, n.3, p.279-83, 1982.
- MCCLURE, M. O., M. A. SOMMERFELT, M. MARSH, AND R. A. WEISS. The pH independence of mammalian retrovirus infection. **J. Gen. Virol.** 71:767–773, 1990.
- McCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNTON, S. M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. **Equine Practice**, v.5, p.32-39, 1983.
- MCGUIRE T.C., TUMAS D.B., BYRNE K.M., HINES M.T., LEIB S.R., BRASSFIELD A.L., O'ROURKE K.I., PERRYMAN L.E. Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins, **J. Virol.** 68: 1459–1467, 1994.
- MEALEY R.H., ZHANG B., LEIB S.R., LITTKE M.H., MCGUIRE T.C., Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus, **Virology** 313: 537–552, 2003.

- MELINDA, A. B.; WIDRLECHNER, M. P.; McCOY, J.; MURPHY, P.; HAUCK, C.; RIZSHSKY, L.; NIKOLAU, B.; MAURY, W. Inhibition of lentivirus replication by aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. **Viol. Journal.**, 6:8, 2009.
- MONTAGNIER, L., DAUGUET, C., AXLER, S., CHAMBARET S., GRUEST, J., NUGEYRE, M.T., REY, F., BARRE-SINOUSI, F. AND CHERMANN, J.C. **Ann. Inst. Pasteur Virol.** 135E, 119–134, 1984.
- MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. **J. Biol. Chem.**, v.16, p.10539–10544, 1984.
- MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.) **The retroviridae**. New York: Plenum Press, v. 2, cap. 5, p. 257-359, 1993.
- MONTEVERDE, J. J.; MORÁN, B. L.; GABERS, G. V. Anemia infecciosa equina. **Rev. Med. Vet.**, v.45, n.6, p.431-434, 1964.
- MONTOR, W.R.; SOGAYAR, M.C.. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 196, p. 16-23, 2003.
- MORTON, C.L.; POTTER, P.M.. Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda* and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p.193-202, 2000.
- MOTTA, P.M.C. **Comparação da IDGA, ELISA e “NESTED” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muares**. 2007. 29 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MURPHY, F. A. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. 629 p. Rio de Janeiro. Decreto Estadual Número 26.214, de 25 de abril de 2000. Disponível em: < [http://www.agricultura.rj.gov.br/sanidade\\_prog.asp](http://www.agricultura.rj.gov.br/sanidade_prog.asp)>. Acesso em 01 de março de 2008.
- NAKAJIMA, H.; NORCROSS, N.L.; COOGINS, L. Demonstration of antigenic identity between purified EIA virus and an antigen extracted from infected horse spleen. **Infect. Immun.**, v.6, p. 416, 1972.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. Acesso: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV). **Virology**, New York, v.184, n.1, p.55-66, 1991.

- NIEBAUER RT, ROBINSON AS .Saccharomyces cerevisiae protein expression: from protein production to protein engineering. In: Baneyx F (ed) **Protein expression technologies**. Horizon, Norwich, pp 253–296, 2005.
- NGUYEN, D. H., e J. E. HILDRETH. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. **J. Virol.** 74:3264–3272, 2000.
- NOCITI, D. L. P. ; SENNA, D. ; REGO, C. L. P. ; HOFMEISTER, K. S. ; MUTZENBERG, E. R. ; NOCITI, R. P. . Anemia Infecciosa Equina em Equídeos de tração no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, p. 165-167, 2007.
- OAKS, J. L., T. C. MCGUIRE, C. ULIBARRI, e T. B. CRAWFORD. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **J. Virol.** 72:7263–7269, 1998.
- OGATA, K.; NISHIKAWA, H.; OHSUGI, M.; A yeast capable of utilizing methanol. **Agric. Biol. Chem.** 33:1519:1520., 1969.
- OIE – Organização mundial de saúde animal. Manual of standards diagnostic tests and vaccines. www.oie.int. 2011.
- O' ROURKE, K. I.; BESOLA, M. L.; MCGUIRE, T.C. Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with equine infectious anemia lentivírus. **Arch Virol.**, v.117, p. 109-119, 1991.
- ORSOLINI, H. M. P.; LIMA, R. A. S. **Características das exportações brasileiras de carne de cavalo, no período de 1996 a 2004**. Apresentado no XLIII Congresso da SOBER: “Instituições, eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”. Ribeirão Preto, 2005.
- PALOMBA, E.; MARTONE, F.; MEDURI, A.; VACCARO, A.; DAMIANI, N. **Folia Veterinaria Latina**, Milano, v.6, n.3, p.275-288, 1976.
- PAYNE, S. L.; FANG, F.D.; LIU, C.P.; DHRUVA, B.R.; RWAMBO, P.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Antigenic variation and lentivirus persistence: Variations I envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. **Virology**, n. 161, p. 321, 1987.
- PAYNE, S. L., X. F. PEI, B. JIA, A. FAGERNESS, e F. J. FULLER. Influence of long terminal repeat and Env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus. **J. Virol.** 78:2478–2485, 2004.



- PELCZAR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R.. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo, Makron Books, 2.ed., 1996, 517p.
- PERRYMAN L.E., O'ROURKE K.I., MCGUIRE T.C., Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection, **J. Virol.** 62: 3073–3076, 1988.
- PESSOA JR., A.; B. V. KILIKIAN, (coordenadores). **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2005. 444p.
- PINHEIRO, R.R., **Vírus da artrite encefalite caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 115p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PIQUE, C.; TURSZ, T.; DOKHELAR, M.C. Mutations introduced along the HTLV-1 envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelope conservation? **The Embo Journal**, v.9, n.13, p.4243-4248, 1990.
- PIZA, A.S.T.; PERIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant *p26* viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, p.239-45, 2007.
- POKOJ, S.; LAUER, I.; FÖTISH, K.; HIMLY, M.; NARI, A.; ENRIQUE, E.; MIGUEL-MONCIN, M. M. S.; LIDHOLM, JONAS; VIETHS, S.; SCHEURER, S. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer protein. **Protein expression and purification**, 69: 68-75, 2010.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002, 1737 p.
- REES, G.S. ,GEE, C.K., WARD, H.L., BALL, C., TARRANT, G.M., POOLE, S., BRISTOW, A. F. Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. **Eur Cytokine New** 10:383–392, 1999.
- RECORD E.; PUNT, P. J.; CHAMKHA, M.; LABATM, V. D. H. CAMJJ; ASTHER, M. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. **Eur J Biochem**, 269:602–609, 2002.
- REIS, J. K. P. **Produção de antígenos recombinantes *gp90* e *p26* do vírus da anemia infecciosa equina, para seu uso em imunodiagnóstico**. 1997. 184 f. Dissertação

- (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RESINA, D.; SERRANO, A.; VALERO, F.; FERRER, P.; Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. **J Biotechnol** 109 (1–2):103–113, 2004.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de ruminantes e equídeos**. Santa Maria: Palloti, 2007.
- ROBERTS, M. M. e OROSZLAN, S. The preparation and biochemical characterization of intact capsids of equine infectious anemia virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 160, 486-494, 1989.
- ROBERTS, M. M., VOLKER, E., COPELAND, T. D., NAGASHIMA, K., CASSELL, M. B., BRIGGS, C. J. & OROSZLAN, S. Regulated proteolytic processing within mature retroviral capsids. **In Advances in Molecular Biology and Targeted treatment for AIDS** (Kumar, A., ed.), 1991, pp. 273-280, Plenum Press, New York.
- ROMANOS, M.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J.. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, p. 423-488, 1992.
- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6: 527-533, 1995.
- SANTOS, S. A.; MAZZA, M. C. M.; SERENO, J. R. B.; ABREU, U.G.P. de; SILVA, J. A. **Avaliação e conservação do cavalo pantaneiro**. Corumbá-MS: EMBRAPA-CPAP, 1995. 40 p.il. (EMBRAPA-CPAP. Circular Técnica, 21).
- SANTOS, E. M. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em pbmc e lavado broncoalveolar para o diagnóstico da anemia infecciosa equina**. 2006. 36 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SAUER M, BRANDUARDI P, GASSER B, VALLI M, MAURER M, PORRO D, MATTANOVICH D. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. **Microb Cell Fact** 3:17, 2004.
- SCHATZMAYR, H.G. Emerging and reemerging viral diseases. **Cad Saude Publica**, 17:209-213, 2001.
- SEARS, I. B.; OCONNOR, J.;rossanese, o. w.; glick, B. s.A versatile set of vectors for constitutive e regulated gene e espression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, 14: 783- 790, 1998.

- SELLON, D. C. Equine Infectious Anemia. **Vet. Clin. N. Am.:** equine practice. v. 9, n. 2, p.321-336, 1993.
- SELLON, D. C.; FULLER, F. J.; McGUIRE, T. C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Res.** v. 32, p.111-138, 1994.
- SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSEL, K. E. Equine Infectious Anemia Virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. **J. Virol.**, v. 70, p.590-594, 1996.
- SENTSUI, H.; KONO, Y. Hemagglutination inhibition tests with different strains of equine infectious anemia virus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 42, p. 1949, 1981.
- SENTSUI, H., INOSHIMA, Y., MURAKAMI, K., AKASHI, H., PUREVTSEREN, B., PAGMAJAV, O., SUGIERA, T. Cross reaction of recombinant equine infectious anemia virus antigen to heterologous strains and application for serological survey among horses in the field. **Microbiol. Immunol.** 45 (1), 45–50, 2001.
- SHEN, S.; SULTER, G.; JEFFRIES, T.W.; CREGG, J.M.. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 216, p. 93-102, 1998.
- SHULER M. L.; KARGI F. **Utilizing Genetically Engineered Organism.** In: Bioprocess Engineered: Basic Concepts, 2 nd edition, Prentice Hall, 2001,
- SILVA, R. A. et al.; Ocorrência da anemia infecciosa no Estado do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1. Niterói, 1968. **Anais...** Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. P. 173-182.
- SILVA, M. F.; GOMES, T.; DIAS, A. S.; MARQUES, J. A.; JORGE, L. M.; FAÍSCA, J. C.; PIRES, G. A.; CALDEIRA, R. M. Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 103-110, 2003.
- SINHA, J. S.; PLANTZ, B. A.; INAN, M.; MEAGHER, M.M. **Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon -  $\tau$ .** DigitalCommons@University of Nebraska – Lincoln, 2004. Disponível em <http://digitalcommons.unl.edu/chemengbiochemeng/2>.
- SKEHEL, J. J., e D. C. WILEY. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.** 69:531–569, 2000.

- SODEN, D. M.; O'CALLAGHAN, J. DOBSON, A. D. W. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. **Microbiology**, 148:4003–4014, 2002.
- SOUZA, H.M.. **Expressão do gene L1 do Papilomavírus bovino tipo 4 em células da levedura *Pichia pastoris***. 2007. 74 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 49-59, 2003.
- SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R.G.; KROPP, K.E.; BLANKENSHIP, D.T.; TSAY, J.; SIMTH, P.L.; WIERSCHKE, J.D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997.
- STEINMAN, R., DOMBROWSKI, J., O'CONNER, T., MONTELARO, R.C., TONELLI, Q., LAWRENCE, K., SEYMOR, C., GOODNESS, J., PEDESON, N., ANDERSON, P.R. **J. Gen. Virol.** 71,701–706, 1990.
- STEPHENS R.M., Casey J.W., Rice N.R., Equine infectious anemia virus gag and *pol* genes: relatedness to visna and AIDS virus, **Science** 231: 589–594, 1986.
- SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Curr. Opin Biotechnol**, 7: 517–524, 1996.
- TAKEGAWA, K., TOHDA, H., SASAKI, M., IDIRIS, A., OHASHI, T., MUKAIYAMA, H., GIGA-HAMA, Y., KUMAGAI, H. Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. **Biotechnol Appl Biochem** 53:227–235, 2009.
- TASHJIAN, R.J. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 184:282-288, 1984.
- TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W. Hagan and bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. 8. ed. Ithaca, NY: **Cornell University Press Ithaca**, 1988.
- TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 20-22, 2002.

- US Food and Drug Administration 2010. Product approval information — licensing action. US Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/cber/products/gardasil.htm>.
- VALLÉE, H.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval, C. R. **Acad. Sci.** 139: 331–333, 1904.
- VASSILEVA, A.; CHUGH, D.A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N.. Effect of copy number on the expression levels of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 71-80, 2001.
- WATERHAM HR, DIGAN ME, KOUTZ PJ, LAIR SV AND CREGG JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, 186:37–44, 1997.
- WATSON, J. D.; BAKER, T.A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia Molecular do Gene**. 5ed. Porto Alegre : Artmed, 2006.760p.
- WEGNER, G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, 7: 279-283.
- WILLEMS, L.; BURNY, A.; COLLETE, D.; DANGOISSE, O.; DEQUIEDT, F.; GATOT, J.S.; KERKHOFS, P.; LEFEBVRE, L.; MREZAK, D.; PEREMANS, T.; PORTETELLE, D.; TWIZERE, J.C.; KETTMANN. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. **Aids Research and Human Retroviruses**, v.16, n.16, p.1787-1795, 2000.
- WILLIAMS, DL., ISSEL, CJ., STEELMAN, CD., ADAMS, WV., BENTON, CV. Studies with equine infectious anemia virus: Transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, 42(9):1469-1473, 1981.
- WURM, F.; BERNARD, A.. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 156-159, 1999.
- XIE, J.; ZHOU, Q.; DU, P.; GAN, R.; YE, Q.. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostan production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 210-216, 2005.
- ZHANG, J.; TEMIN, H.M. Rate and mechanism of non homologous recombination during a single cycle of retroviral replication. **Science**, v.259, p.234-238, 1993.

ZHANG, P.; NOURI, M.; BRANDSMA, J.L.; IFTNER, T.; STEINBERG, B.M..

Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. **Virology**, v. 263, p. 388-394, 1999.

ZHANG, W.; BEVINS, M.A.; PLANTZ, B.A.; SMITH, L.A.; MEAGHER, M.M..

Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, Serotype A. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 1-8, 2000.

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

#### 4 – ARTIGO

Production of p26 protein of Equine Infectious Anemia Virus in *Pichia pastoris*.

**Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho<sup>1</sup>, André Luiz Santos de Jesus<sup>2</sup>, Karin Florêncio Lins de Paiva Fontes<sup>1</sup>, Eliane Campos Coimbra<sup>2</sup>, Antonio Carlos de Freitas<sup>2</sup>, Rita de Cássia Carvalho Maia<sup>1</sup>, Roberto Soares de Castro<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE, Brasil.

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

Autor para correspondência:

Roberto Soares de Castro

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

Fone: (55)(81) 33206426

Email: [rscaastro@dmv.ufrpe.br](mailto:rscaastro@dmv.ufrpe.br)<sup>1</sup>

## Abstract

Equine Infectious Anemia (EIA) is an important lentivirose in horses, characterized by a chronic and degenerative profile, causing many economic losses. Positive animals for Agar Gel Immunodifusion (AGID) assay remain so throughout life, what justifies the great concern and disease surveillance. The aim of this study was to use *Pichia pastoris* yeast cells for expression of *p26 gag* region of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) for diagnostic uses. With this purpose the EIAV *p26* gene was sintetized and codon-optimized for expression in *P. pastoris*. The insert was cloned into pPICZ $\alpha$ A expression vector after appropriate enzymatic digestion. *P. pastoris* cells transformed with the construction pPICZ $\alpha$ Ap26 were induced to product the p26 recombinant protein under the regulation of *AOX1* promoter by adding methanol to the culture medium. Analysis of *p26* gene expression was performed by RT-PCR and the production of recombinant protein was evaluated by Dot blotting and AGID assay. Although there have been hundreds recombinant proteins produced in eukaryotes, this is the first report of EIAV *gag p26* protein production in yeast cells.

**Key-words:** *Pichia pastoris*, EIAV, expression, p26, AGID.



## 1. Introduction

Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease of horses caused by a macrophage-tropic Lentivirus is a member of *Retroviridae* family (Craig et al., 2009). The EIA is recognized as the most important viral disease in horses, due to persistent infection and its severe degenerative form (Harrold et al., 2000). The disorder is mainly distributed in areas of hot and humid climate, reflecting their main form of transmission, made by hematophagous insects of the *Tabanidae* family (Issel and Foil, 1984). Infected animals are a constant source of infection, whereas more than 95% are asymptomatic and there is still no effective treatment or vaccine against the disease, laboratory diagnosis plays a decisive role in the control and prevention of this illness (Ferraz et al., 1998).

The detection of antibodies to EIAV through serological tests such as AGID (Coggins Test) and ELISA are recommended by the World Organization for Animal Health (OIE) as official tests for international equine transit (OIE, 2010). The main serological tests were developed for antibodies against the p26 protein, which represents about 40% of EIAV total proteins (Montelaro et al., 1982; Kong et al., 1997). The main serological tests were developed for antibodies against the p26 protein, which represents about 40% of EIAV total proteins (Montelaro et al., 1982; Kong et al., 1997). Although the antibody titers against p26 are lower than those produced against the viral glycoproteins, the use of p26 as antigen in serological probes is justified for its immunogenicity (Leroux et al., 2004). Furthermore, this protein is highly conserved among different viral strains from different geographic locations, with a maximum of 12% of genetic variability (Hussain et al., 1988; Zhang et al., 1999).

Most studies on the diagnosis of EIA report the production of viral antigens from cell cultures infected with EIAV (Montelaro et al., 1984; Bouillante et al., 1986; Kings and Leite, 1994). However, host proteins present in the test antigen can produce interference,

contributing to obtain conflicting results (Alvarez et al., 2007a). Some works have been performed in order to produce EIAV p26 protein in heterologous expression systems, such as *Escherichia coli* (Piza et al., 2007) and insect cells (Kong et al., 1997). These systems are characterized by being more secure, efficient and capable of producing a purified antigen, suggesting greater homogeneity in the production, unlike the system of antigen production in cell culture (Rossmann and Horvath, 1989; Bürki et al., 1992). It is reported that recombinant EIAV p26 antigens are reliable reagents for the serologic diagnosis of EIA (Archambault et al., 1989; Birkett et al. 1997, Jin et al., 1999, Alvarez et al., 2007b).

Although the *E. coli* expression system is considered simple and inexpensive, it is known for its limitations on the ability to perform post-translational modifications. In addition, protein expressed in prokaryotes systems often produce insoluble aggregates known as inclusion bodies (Cereghino and Cregg, 2001; Pokoj et al., 2010, Porro et al., 2010). Alternatively, it can be used *Pichia pastoris*, a methylotrophic yeast, mesophilic, homotrophic, facultative anaerobic, naturally haploid in vegetative state and that is multiplied by multilateral budding (Cereghino and Cregg, 2000). The *Pichia pastoris* expression system has several advantages over the others heterologous expression systems, including the easy genetic manipulation and the ability to produce and secrete high levels of heterologous proteins in media of low cost, from which are easily retrieved (Macauley-Patrick et al., 2005). Additionally, there are reports confirming that the yield of recombinant proteins derived from *P. pastoris* yeast cells is much higher than the results obtained in the *E. coli* system (Pokoj et al., 2010).

Hundreds of recombinant proteins have been produced in eukaryote cells; however, this is the first report of EIAV *gag* p26 protein production in yeast cells.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Cloning of synthetic EIAV *p26* gene**

The EIAV *p26* gene was codon-optimized for expression in *P. pastoris*, through the Epoch Biolabs (Texas, USA), based on the sequence of Wyoming strain viral genome deposited in GeneBank (access number NC\_001450). This synthetic gene was cloned into pBluescript II SK plasmid, containing basically the optimized gene sequence fused to poly-histidine tag in the C-terminal portion, to facilitate immunodetection of the protein.

The *P. pastoris* strain used was X-33, wild type genotype, Mut<sup>+</sup> phenotype (methanol utilization plus) (Invitrogen). For the expression, it was used pPICZ $\alpha$ A vector (Invitrogen), constituted by a  $\alpha$ -Factor signal sequence in order to secrete the protein, the *AOX1* promoter, the *AOX1TT* termination region and the *Sh ble* gene that confers resistance to the zeocin<sup>TM</sup> drug.

Competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells were transformed with the constructs containing the codon-optimized EIAV *p26* gene. After plasmidial DNA extraction with commercial kit (Qiagen), it was performed a digestion reaction with *XhoI* and *NotI* restriction enzymes (Promega). The released insert by enzymatic reaction was cloned into the expression vector, previously digested with the same enzymes, generating the pPICZ $\alpha$ Ap26 construction. *P. pastoris* cells were transformed by electroporation with the expression cassette linearized by digestion with the *SacI* restriction enzyme and grown on plates containing YPDS medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbitol, 2% agar) supplemented with 100 $\mu$ g/ml zeocin (Invitrogen).

The recombinants obtained by zeocin selection were analyzed for the presence of the expression cassette by colony PCR with the following conditions: initial denaturation at 94°C for 4 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. For this amplification, it was used the  $\alpha$ -FactorF, *AOX1F* and *AOX1R* primers, provided in EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, 2007).

## 2.2 - Production of recombinant EIAV p26 protein in *P. pastoris*

The production of recombinant p26 was evaluated based on the immunodetection of the protein and RT-PCR from *P. pastoris* cells induced by methanol. Initially, we performed a screening of 100 transformants in deep well plates with 1 ml of MGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 1% glycerol), distributed in each well. After 24 hours of growth in glycerol, the cells were harvested and resuspended in MMY medium (the same composition of MGY, except that 0.5% methanol instead of glycerol). After 24 and 48 hours, it was added to the medium methanol to a final concentration of 1%. The supernatants were quantified and subjected to Dot blotting assay using anti-His antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:10000.

Two clones (1 and 2) showed more intense reaction in the Dot blotting assay and they were selected for induction in baffled flasks in accordance with the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit Manual. The induction assay was performed into an orbital shaker at 28°C with agitation speed of 200 rpm for 72 hours. Every 24 hours, 1% methanol was added and aliquots were collected for analysis of growth curve, pH variation, presence of RNA and protein detection. As negative control, it was used *P. pastoris* strain X-33 transformed with pPICZA $\alpha$  expression vector without insert.

Total RNA from *P. pastoris* recombinants induced by methanol was extracted using a commercial kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The EIAV p26 mRNA was detected by RT-PCR using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). For RT-PCR, we designed the oligonucleotide primers p26F 5'-TGAGGAGATGAACGCTTTC-3' and p26R 5'-GCCTTTGGCTTACCGATC-3', based on the codon-optimized nucleotide sequence of the gene, which flanks a central region of the

*p26* gene, producing a 300 bp fragment. Finally, clones 1 and 2 were submitted to new Dot blotting assay with 0.6 µg of protein.

### 2.3 AGID

For the Agar Gel Immunodiffusion assay, it was used the recombinant p26 antigen recovered from 80 ml of centrifuged supernatant (10000g for 5 min), 4- and 80-fold concentrated in 40% PEG 6000 solution (Vetec Química Fina, São Paulo, Brazil) diluted in 1x PBS using dialysis membrane (Thomas Scientific, USA / Canada) and PMSF (10mM). The antigen-antibody reaction in 1% agarose gel (Invitrogen) was obtained using a standard positive serum (Bruch, São Paulo, Brazil). As a negative control it was used supernatant from *P. pastoris* transformed with the pPICZαA expression vector.

### 3. Results

The optimization of the *p26* gene for expression in *P. pastoris* resulted in a range of 21% from the nucleotide sequence of the reference viral strain. In cloning process, after overnight incubation, we observed the growth of *E. coli* DH5α colonies transformed with the pPICZαAp26 construction in medium containing zeocin. Enzymatic digestion of recombinant plasmid DNA resulted in the release of 750 and 3600 bp fragments from the *p26* gene and the pPICZαA expression vector, respectively (Fig. 1a), indicating the pPICZαAp26 construction, which was confirmed by sequencing.

*P. pastoris* cells transformed with the pPICZαAp26 construction were submitted to colony PCR using the α-FactorF and AOX1R primers. The analysis revealed the amplification of a 1050pb fragment (Fig. 1b), corresponding to 300pb from α-Factor plus 750pb from the *p26* gene. In the PCR reaction using AOX1F and AOX1R, a fragment of 2.2 Kb was amplified, referring to the *AOX1* gene (Fig. 1c) indicating the Mut<sup>+</sup> phenotype.

During the period of induction the growth rate of the recombinants ranged from  $2.5 \times 10^8$  to  $2.7 \times 10^9$  cells/ml while the pH varied between 5.5 to 6.3 in the end of 72 hours of

induction. The RT-PCR of *P. pastoris* cells resulted in a 300 bp fragment covering the central region of the nucleotide sequence that encodes the EIAV p26 protein (Fig. 1d), confirming the presence of *p26* mRNA in yeast. Besides, the p26 protein was immunodetected by Dot blotting assay (Fig. 2).

The AGID serological test using recombinant p26 antigen 4x and 80x concentrated showed precipitation lines due to the reaction of the recombinant antigen with the antibody in standard serum used in both concentrations. This result suggested the recovery of significant levels of protein, and demonstrated its biological activity.

#### **4. Discussion**

The pPICZ $\alpha$ Ap26 construction was integrated into the *P. pastoris* genome and confirmed by colony PCR. The heterologous gene expression, in turn, was detected by RT-PCR, Dot blotting and AGID, confirming the *p26* gene transcription and protein production. Such levels can vary widely depending on their characteristics. It is known that some genes do not express measurable amount of protein in *P. pastoris*, due to marks of transcriptional termination, represented by A-T rich regions, which produce truncated mRNA (Romanos, 1995). In order to minimize limitations regarding the A-T content and increase the levels of protein expression, *p26* gene was synthesized using preferred codons for *P. pastoris* with 55% A-T content, a percentage considered capable to enhance the expression levels (Sreekrishna et al., 1997).

The positivity of Dot blotting assay indicates that p26 was expressed in its integrity, once the poly-histidine tag responsible for antigen / antibody reaction is fused to the C-terminal recombinant protein. Additionally, the Dot blotting results show that the protein was secreted, which is highly desirable for future stages of its purification (Romanos et al., 1992).

The induction was performed in classic culture medium recommended for *P. pastoris*, in baffled flasks with agitation, in order to increase aeration, starting from a concentration of 0.5% methanol, reaching a maximum of 1%. Besides the genomic adjustments, phenotypic variables, especially growth conditions such as temperature, pH, aeration, ionic concentration and cell density, can influence the quality and quantity of protein. The high cell density can limit the availability to dissolved oxygen, its increase leads to the formation of intracellular vacuoles rich in soluble proteases capable to reduce the quality of protein (Sinha et al. 2004; Bahrami et al. 2007). All these parameters must be set, but especially the concentration of available methanol in the medium, which can negatively affect the transcription rates of the heterologous gene (Cereghino, 2002). The methanol metabolism demands high rates of oxygen and may have an inhibitory effect above 1% to the final concentration (Glieder and Hartner, 2006).

Several studies confirm the success of the *P. pastoris* expression system, both as regards the production of proteins extra and intracellularly, as in what concerns the insertion of expression cassette, which can be integrative or episomal (Hasslacher et al. 1997, Li et al. 2003; Bazan et al., 2009). Although the expression of heterologous proteins in *P. pastoris* can be successfully performed in flasks, it is clear that production levels are higher with the use of fermenters, where it is possible the precise control of culture conditions (Cereghino et al., 2002). Although not conducted in these conditions, detectable levels of p26 were observed by Dot blotting in supernatants from recombinant induced by methanol. The results obtained with AGID, besides confirming the production of recombinant protein, suggest that p26 is found in significant levels in view of the positive results of tests using lower concentrations of the supernatant. Additionally, this result also confirms the biological activity of the recombinant protein, a highly desirable characteristic typically associated with eukaryotes products (Macauley-Patrick et., 2005).

## **Conclusions**

The *P. pastoris* system expression was able to produce the EIAV *gag* p26 protein. However, it is necessary to improve the bioprocesses involved in the achievement and recovery of p26 antigen so that it can be used in diagnostic tests such as AGID and ELISA, providing an alternative to those produced in cell culture or others heterologous expression systems (Reis and Cerqueira, 1994, Kong et al. 1997, Alvarez et al. 2007b; Piza et al., 2007).

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco State (FACEPE), the Financier of Studies and Projects (FINEP) (PAPPE - 2008; Proc APS 0338-5.05/08) and the Biovetech. We thank all staff at the Laboratory of Molecular and Experimental Therapy Studies (LEMTE), Federal University of Pernambuco (UFPE), for the availability of facilities and excellent technical support.



## Attachments

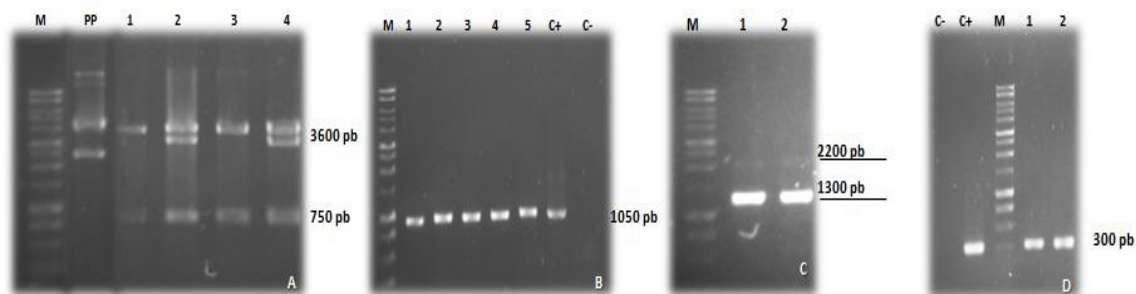


Figure 1. Cloning and expression of EIAV p26 protein. (A) Enzymatic Reaction: release of 750pb fragment (EIAV *p26* gene) and 3600pb fragment (pPICZ $\alpha$ A expression vector) by digestion with XhoI / NotI enzymes; M - 1Kb molecular marker (Ludwig Biotec); PP - pPICZ $\alpha$ A expression vector only; 1-4 - plasmid DNA samples extracted from *E. coli*. (B) Colony PCR of *P. pastoris* X-33/pPICZ $\alpha$ Ap26 using  $\alpha$ -FactorF and AOX1R primers: amplification of a 1050pb fragment (300pb from  $\alpha$ -Factor + 750pb from *p26* gene); C+ - pPICZ $\alpha$ Ap26 plasmid; C- - water, negative control. (C) Colony PCR of *P. pastoris* X-33/pPICZ $\alpha$ Ap26 using primers AOX1F and AOX1R: amplicons of 1300 bp (588pb from vector + 750 of the insert) and 2200pb regarding the AOX1 gene from *P. pastoris*; 1 and 2 - *P. pastoris* transformants. (D) RT-PCR of *P. pastoris* X-33/pPICZ $\alpha$ Ap26 colonies after 72 hours of methanol induction using p26F and p26R primers: amplicon of 300 pb, relative to the central region of the nucleotide sequence that encodes the EIAV p26 protein; 1 and 2 - *P. pastoris* transformants; C- - water, negative control ; C+ - pPBSP26 plasmid.

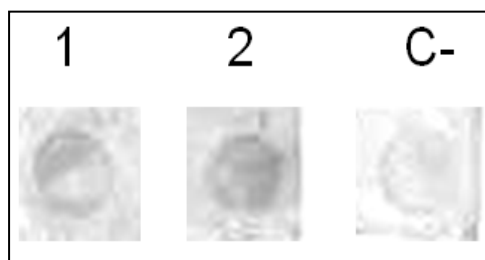


Figure 2. Immunodetection reactions of p26 protein by Dot blotting. Aliquots of supernatant from clones 1 and 2 after 72 hours of methanol induction quantified in 0.6 $\mu$ g by Bradford method. Aliquot of supernatant from the negative control (*P. pastoris* transformed with expression vector only). Immunodetection performed with anti-His antibody conjugated to alkaline phosphatase, dilution 1:10000.

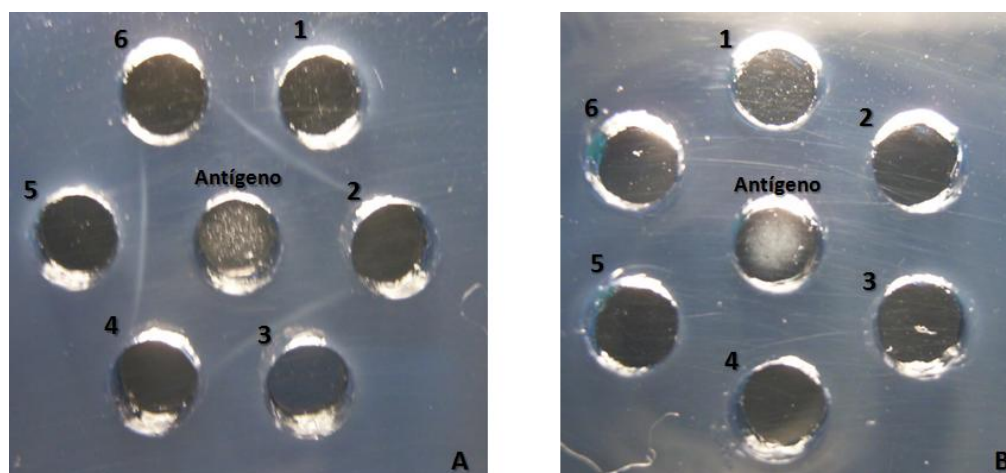


Figure 3. Agar gel immunodiffusion with recombinant EIAV p26. Lines of precipitation resulted from the antigen / antibody reaction in agarose plate. (A) In the central well, 20  $\mu$ l aliquots of the recombinant antigen (80x concentrated supernatant); wells 1,3 and 5 - aliquots of 20  $\mu$ l of positive standard serum; wells 2,4 and 6 - no sample. (B) Negative control (supernatant of *P. pastoris* transformed with expression vector only), no precipitation lines. Readings were taken with 48 hours of reaction.

## References

- Alvarez, I.; Gutierrez, G.; Ostund, E.; Barrandeguy.; Trono, K., 2007. Western Blot Assay Using Recombinant *p26* Antigen for Detection of Equine Infectious Anemia Virus-Specific Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 12, p. 1616-1648.
- Alvarez, I.; Gutierrez, G.; Vissani, A.; Rodriguez, S.; Barrandeguy M.; Trono, K., 2007. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant *p26* antigen. *Veterinary Microbiology* 121 : 344–351.
- Archambault d., Wang z., Lecal J.C., Gazit A., Yaniv A., Dahlberg J.E.; Tronick S.R., 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, 1167–1173.
- Bahrami, A.; Shojaosadati, S. A.; Khalilzadeh, R.; Saedinia, A. R.; Farahani, E. V.; Mohammadian-Mosaabad, J., 2007. Production of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by *Pichia pastoris*. *Iranian Journal of Biotechnology*, vol. 5, No. 3.
- Bayrakyat, E. Effects of ph on human growth hormone production by *pichia pastoris* considering the expression levels of regulatory genes. 2009. 182 f. Dissertação (Master of Science in Chemical Engineering Department), Middle East Technical University Turkey, Ankara, Turquia.
- Bazan SB, Chaves A, Muniz A, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho P. L., 2009. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch. Virol.* 154: 1609-1617.
- Birkett, A.J.; Yéamos, B.; Crespo, I. R.; Gavilanes, F.; Peterson, D. L., 1997. Cloning expression purification, and characterization of the major core protein (*p26*) from equine infectious anemia virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1339, p. 62-72.
- Bouillant A.M.; Nielsen K.; Ruckerbauer G.M.; Samagh B.S.; Hare W.C., 1986. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*, 13: 309–321.
- Bürki, F., Rossmanith, W., Rossmanith, E., 1992. Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.* 33:353–360.
- Cereghino J. L.; Cregg J. M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology* 24: 45-66.
- Cereghino J.L. e CREGG J. M. 2001. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24:45-66.
- Cereghino, G.L., 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. current opinion in biotechnology, v. 13, p. 329-332.
- Craigio, J.K., Barnes, S., Zhang, B., Cook, J. S., Howe, L., Issel, J. C., Montelaro, R.C., 2009. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology*, 6:95.
- Ferraz, I.B.F. Vírus da anemia infecciosa equina: amplificação por PCR do DNA proviral da gp90, comparação com o teste de Elisa e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras, 1998. Tese (doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Gellissen, G.; Hollenberg, C.P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review., 1997. *Gene*, v. 190, p. 87-97.
- Harrold S.M., Cook S.J., Ccook R.F., Rushlow K.E., Issel C.J., Montelaro R.C., 2000. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J. Virol.* 74 : 3112–3121.
- Hartner, F. S. e Glieder, A., 2006. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microbial cell factories*. 5:39
- Hasslacher, M.; Schall, M.; Hayn, M.; Bona, R.; Rumbold, K.; Luckl, J.; Griengl, H.; Kohlwein, S.D.; Schwab, H. , 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein expression and purification*, v. 11, p. 61-71.
- Hong, F.; Meinander, N.Q.; Jonsson, L.J., 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 79, n. 4, p. 438-449.
- Hussain, K.A.; Issel, C.J.; Rwambo, P.M.; Arnizaut, A.B.; Ball, J.M.; Schnorr, K.L. Montelaro, R.C. , 1988. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, *p26*, *J. Gen. Virol.* 69: 1719–1724.
- Invitrogen. *Pichia* expression kit. , 2002. A manual of methods for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. Catalogue n K1710-01. San Diego, USA: Invitrogen Co.
- Issel C.J., Foil L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 293–297.

- Jahic, M.; Wallberg, F.; Bollok, M.; Garcia, P.; Enfors, S., 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories*, v. 2, n. 1, p. 6.
- Jin, Z.; Jin, L.; Peterson D. L., Lawson, C. L. J., 1999. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26. *Mol. Biol.* 286: 83 – 93.
- Kong X. K., Pang H., Sugiura T., Sentsui H., Onodera T., Matsumoto Y., Akashi H., 1997. Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.*, v.41, p.975–980.
- Leroux, C.; Cadoré J. L.; Montelaro, R. C. , 2004. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research*, v. 35, p. 485-512.
- Li, P.C.; Zhang, X.G.; Zhou, L.; Zeng, Y., 2003. Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, v. 17, n. 4, p. 310-314.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; Mcneil, B.; Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, p.249-270.
- Montelaro, R. C.;Lohrey, N.; Parekh, B.; Blankeney, E.W. e Issel, C. J. 1982. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia. *J. Virol.* 42: 1029-1038.
- Montelaro R.C., Parekh B., Orrego A. & Issel C.J.,1984. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, v.16, p.10539–10544.
- OIE (Organização mundial de saúde animal). Manual of standards diagnostic tests and vaccines. [www.oie.int](http://www.oie.int). 2010.
- Piza, A.S.T.; Pereira, A.R.; Terreran, M.T.; Mozzer, O.; Tanuri, A.; Brandão, P.E.; Richtzenhain, L.J., 2007. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Preventive Veterinary Medicine*, v.78, p.239-45.
- Pokoj, S.; Lauer, I.; Fötish, K.; Himly, M.; Nari, A.; Enrique, E.;Miguel-Moncin, M. M. S.; Lidholm, Jonas; Vieths, S.; Scheurer, S. 2010 *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer protein. *Protein expression and purification*, 69: 68-75.
- Porro, D.; Gasser, B.; Fossati, T.; Maurer, M.; Brnanduardi, P.; Sauer, M.; Mattanovich, D. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: When are these systems better than bacterial production systems? *Appl. Microbiol. Biotechnol. Online First™*, p. 1-10, 2 Dezembro 2010.
- Reis, J. K. P. e Leite, R. C.1994. Otimização da produção e estabilização do antígeno do vírus da anemia infecciosa equina, para uso diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*v.46, n. 4, p: 380-385.
- Romanos, M.; Scorer, C.A.; Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, v. 8, p. 423-488.
- Romanos, M., 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 527-533.
- Rossmannith, W., and E. Horvath. 1989. A western blot for the serological diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Med. B* 36:49–56.
- Sinha, J. S.; Plantz, B. A.; Inan, M.; Meagher, M.M. 2004. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon -  $\tau$ . *DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln*. Disponível em <http://digitalcommons.unl.edu/chemengbiochemeng/2>.
- Sreekrishna, K.; Brankamp, R.G.; Kropp, K.E.; Blankenship, D.T.; Tsay, J.; Simth, P.L.; Wierschke, J.D.; Subramaniam, A.; Birkenberger, L.A. , 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, v. 190, p. 55-62.
- Zhang W., Auyong D.B., Oaks J.L., Mcguiret.C.,1999. Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes, *Virology*, 261: 242–252.

## 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste experimento obteve-se a construção do cassete de expressão pPICZ $\alpha$ Ap26, que foi integrado ao genoma celular da linhagem X-33 da levedura *Pichia pastoris*. A presença do RNAm do gene *p26* foi detectada por RT-PCR e a produção da proteína foi confirmada por Dot Blot com anticorpo anti-His.

Novos estudos serão realizados como intuito de melhor conhecer a dinâmica da produção da proteína recombinante p26 de VAIE em *Pichia pastoris*. Faz-se necessário padronizar e otimizar os bioprocessos envolvidos neste sistema para obter um antígeno estável, purificado, capaz de ser útil para fins diagnósticos. Pretendemos ainda investigar os níveis de transcrição dos RNAm de *p26*, através da quantificação por *q*PCR, durante cada fase no processo indutivo. Além disso, iremos direcionar o uso da técnica PCR em tempo real para detecção do genoma de VAIE em animais sintomáticos e assintomáticos em diferentes tecidos.