

KARIN FLORENCIO LINS DE PAIVA FONTES

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE p26 FUSIONADA À
MBP PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

RECIFE

2017



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

KARIN FLORENCIO LINS DE PAIVA FONTES

PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE p26 FUSIONADA À
MBP PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

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

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Co-orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Prof.^a Dra. Ana Lisa do Vale Gomes

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

F683p Fontes, Karin Florencio Lins de Paiva
Produção da proteína recombinante p26 fusionada à MBP para diagnóstico da anemia infecciosa equina / Karin Florencio Lins de Paiva Fontes. – 2017.
83 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.

Coorientadores: Antonio Carlos de Freitas e Ana Lisa do Vale Gomes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Sistema de expressão heterólogo 2. Antígeno recombinante
3. Proteína ligante de maltose 4. Lentivírus I. Castro, Roberto Soares de, orient. II. Freitas, Antonio Carlos de, coorient. III. Gomes, Ana Lisa do Vale, coorient. IV. Título

CDD 636.089

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

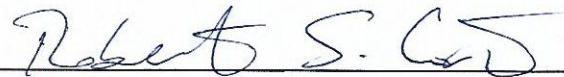
PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE p26 FUSIONADA À
MBP PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Tese de Doutorado elaborada por

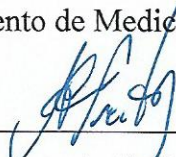
KARIN FLORENCIO LINS DE PAIVA FONTES

Aprovada em 30/08/2017

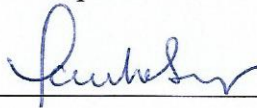
BANCA EXAMINADORA



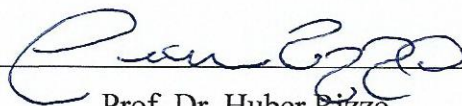
Prof. Dr. Roberto Soares de Castro
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



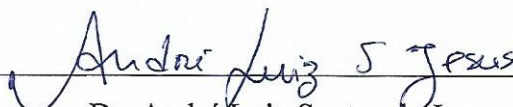
Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Co-orientador - Departamento de Genética da UFPE



Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia da UFRPE



Prof. Dr. Huber Rizzo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Dr. André Luiz Santos de Jesus
Departamento de Genética da UFPE

DEDICATÓRIA

À Tia Dida por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado Alan por sempre cuidar de mim e entender os “meus momentos”;

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

A minha amiga Ana Lisa por todo apoio mesmo na distância;

Ao meu grande amigo Cosme, por sua imensa capacidade de ser amigo, por sua cumplicidade, sinceridade e alegria;

A Serginho pela longa caminhada juntos, como um grupo, forte e de apoio mútuo;

Ao meu amigo André Luiz por estar ao meu lado em toda minha vida acadêmica de alguma forma;

Ao Professor Antonio Carlos de Freitas por ter me acolhido e dado a oportunidade de me juntar a seu grupo;

Aos meus colegas de laboratório da UFPE, minha pequena família, meus bons amigos, em especial à Anna Jéssica, Ana Paula e Laryssa Gomes;

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

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus da família Retroviridae e é considerada uma das viroses mais importantes em equinos no mundo. É uma infecção crônica, sem tratamento, prevalente em regiões de clima quente e úmido favorável à transmissão por insetos hematófagos. O diagnóstico oficial da doença é realizado através da detecção de anticorpos circulantes nos testes IDGA e ELISA. Visando aumentar a produção proteica e melhorar o desempenho dos testes sorológicos, a sequência do gene p26 foi otimizada com relação aos códons preferenciais para uso em *E. coli* e fusionada à proteína ligante de maltose com rendimento 2mg/ml de cultura celular. A proteína de fusão recombinante resultante (p26rec) foi detectada por SDS- PAGE e Western blot com anticorpo monoclonal anti-HIS. A p26rec do VAIE foi utilizada como antígeno no desenvolvimento e avaliação por IDGA e ELISA (IDGArec e ELISAre). Após a análise de 569 soros de equinos, foi determinada a sensibilidade diagnóstica (SeD) e a especificidade diagnóstica (SpD). O ponto de corte para o ELISAre (>29.51%) foi determinado pela análise da curva ROC. Para o IDGArec ambos a SeD e a SpD foram de 100% e para o ELISAre foram de 100% e 99,6% respectivamente. A p26rec vem se mantendo com título estável há mais de três anos armazenada a 4°C. Os resultados encontrados mostram o alto grau de confiança obtido com a p26rec nos testes IDGArec e ELISAre, podendo assim ser recomendados no diagnóstico sorológico da AIE.

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

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is caused by a lentivirus of the family Retroviridae and is considered one of the most important viruses in horses in the world. It is a chronic infection, untreated, prevalent in hot and humid climate regions favorable to transmission by hematophagous insects. The official diagnosis of the disease is made through the detection of circulating antibodies in the IDGA and ELISA tests. In order to increase protein yield and improve the performance of serological tests, the p26 gene sequence was optimized for preferred codons for use in *E. coli* and fused to maltose binding protein. The resulting recombinant fusion protein (p26rec) was detected by SDS-PAGE and Western blot with anti-HIS monoclonal antibody and used as an antigen in the development and evaluation to evaluate an IDGA and an ELISA (IDGArec and ELISArec) for the diagnosis of EIA. After analysis of 569 equine sera, diagnostic sensitivity (SeD) and diagnostic specificity (SpD) were determined. The cutoff point for ELISArec (> 29.51%) was determined by the ROC curve analysis. For IDGArec both SeD and SpD were 100% and for ELISArec were 100% and 99.6% respectively. The p26rec has been maintained with stable working dilutions for more than three years stored at 4 ° C. The results demonstrated the high degree of confidence obtained with p26rec in the IDGArec and ELISArec tests and could therefore be recommended in the serological diagnosis of the AIE.

Keywords: Heterologous expression system, recombinant antigen, core protein, lentivirus.

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura

Quadro 1	Número de focos de Anemia Infectiosa Equina nos estados brasileiros, entre 2010 a 2016.	21
Quadro 2	Principais fatores associados à transmissão do VAIE relacionados aos hábitos dos vetores e importância do homem como facilitador na transmissão do vírus	22
Quadro 3	Fases clínicas da infecção pelo Vírus da Anemia Infectiosa Equina	24
Quadro 4	Principais parceiros de fusão e suas características.	39

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	Estrutura do vírion do VAIE.	15
Figura 2	Ciclo retroviral, representação esquemática do ciclo viral do VAIE nas células hospedeiras.	18
Figura 3	Cinética de eventos após inoculação intravenosa de um equino com uma cepa patogênica de VAIE com uma dose infectante de 10^3 . A carga viral (cópias do vírus RNA/mL) é demonstrada pelo desenho de partículas virais. A primeira detecção de anticorpo anti-VAIE foi constatada a partir do primeiro episódio febril (+). Fonte: Issel; Foil (2015). Insetos hematófagos da família <i>Tabanidae</i> .	24

Artigo

Figura 1	SDS-PAGE da p26rec do VAIE	81
Figura 2	Western blot da p26rec do VAIE revelado com anticorpo anti-HIS (1:3000).	81

Figura 3	SDS-PAGE da purificação da p26rec com suas respectivas frações.	82
Figura 4	SDS-PAGE da clivagem da proteína p26rec digerida com o Fator Xa.	82
Figura 5	Comparação da IDGA entre a p26rec e kit comercial de IDGA.	83
Figura 6	Gráficos estatísticos da p26rec no ELISA.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

pr26	Proteína Recombinante p26
AMP	Ampicilina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
LB	Luria Bertani medium (meio Luria Bertani)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
IgG	Imunoglobulina do tipo G
MBP	Maltose Binding Protein (Proteína Ligante de Maltose)

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Genoma do VAIE	14
2.2 Mecanismos de replicação viral	16
2.3 A proteína p26 do VAIE	19
2.4 Epidemiologia	20
2.5 Patogenia e sinais clínicos	22
2.6 Técnicas de diagnóstico	26
2.7 Controle Oficial no Brasil	32
2.8 Sistemas utilizados para a produção de proteínas recombinantes	32
2.9 <i>Codon usage</i>	37
2.10 Proteínas de fusão	38
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4 ARTIGO CIENTÍFICO	65
ELISA e IDGA para diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina empregando p26 recombinante estabilizada como proteína de fusão	
5 APÊNDICE	81

1. INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença viral crônica, que causa grandes prejuízos para equideocultura devido à restrição do trânsito dos animais e participação em eventos esportivos (FRANCO; PAES, 2011). O impacto econômico direto da doença é devido à queda no desempenho dos animais e mortes; os efeitos indiretos incluem o aumento dos custos no manejo pecuário, tração e transporte e os custos de implementar medidas de controle da AIE. O rebanho nacional alcança mais de 5,5 milhões de cavalos, mesmo com a incorporação de máquinas de última geração e de ferramentas tecnológicas, o cavalo continua sendo decisivo para o desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas na grande maioria das propriedades produtivas nacionais. A atividade movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por três milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016).

Segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2017) o vírus da AIE (VAIE) é classificado na Família *Retroviridae*; Sub-família *Orthoretrovirinae*; Gênero *Lentivirus*. O VAIE compartilha características morfológicas, antigênicas e genéticas com outros retrovírus, como os vírus da imunodeficiência humana, bovina e felina (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004; WEIBLEN, 2007).

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

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

proteína nuclear viral), observados entre dez e quatorze dias após a infecção, atingindo pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90 (MONTELARO; BALL; RUSHLOW, 1993).

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

Com os avanços da engenharia genética a produção de proteínas recombinantes em diversos sistemas de expressão eucariotos e procariotos vem sendo empregada de forma eficiente e econômica para diversas finalidades. Dentre eles o mais utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, que apresenta várias vantagens: rápida expressão, alto rendimento, fácil cultivo e manipulação genética, e baixo custo para produção (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Entretanto, algumas proteínas não são expressas nesse sistema, são expressas fragmentadas, insolúveis ou pouco solúveis, ou são expressas em altos níveis, porém inativas devido à formação de corpúsculos de inclusão (TERPE, 2006; DEMAIN; VAISHNAV, 2009; PACHECO et al., 2012).

Parte desses problemas é resultado da incompatibilidade entre os códons da sequência a ser clonada e os códons preferenciais do genoma da *E. coli* (TERPE, 2006). Atualmente, com as facilidades da bioinformática e da síntese de genes é possível a otimização de códons da sequência gênica alvo através da substituição de códons, de modo a aumentar a produção proteica sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína codificada (WU et al., 2007).

Quando a *E. coli* é usada como sistema de expressão heterólogo para produção proteica, a introdução de um parceiro de fusão é muitas vezes necessária para ajudar no aumento da solubilidade (KOSOBOKOVA, SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016). As Proteínas ligantes de maltose (MBPs) são umas das proteínas de fusão mais utilizadas (SUN; TROPEA; WAUGH, 2011), promovendo também o correto dobramento da proteína alvo através da sua interação com a mesma, e prevenindo a sua autoassociação (KAPUST; WAUGH, 1999; FOX; KAPUST; WAUGH, 2001).

Com o intuito de produzir um antígeno recombinante que auxilie no diagnóstico da AIE, foi realizado este trabalho, cujos objetivos são descritos a seguir.

1.1 Objetivo geral

Produzir uma proteína p26 recombinante (p26rec) do VAIE em *Escherichia coli*.

1.2 Objetivos específicos

Produzir a p26rec do VAIE fusionada à MBP em *E. coli*;

Testar a p26rec na IDGA e no ELISA;

Padronizar a IDGArec e o ELISArec;

Avaliar os testes de IDGArec e ELISArec no diagnóstico da AIE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Genoma do VAIE

As retroviroses são causadas por uma grande família de RNA vírus envelopados com similaridades que incluem a estrutura, composição e propriedades replicativas. A principal característica da família é a estratégia de replicação que inclui como passos essenciais a transcrição reversa do RNA do vírion em DNA dupla fita e sua subsequente integração no DNA genômico da célula hospedeira (COFFIN, 1992 e 1996). Os vírions possuem de 80-100 nm de diâmetro, e seu envelope lipídico exterior incorpora e exhibe as glicoproteínas virais. O RNA do vírion possui entre sete e 12 kb em tamanho, é linear, de cadeia simples, não segmentado e de polaridade positiva (MURPHY et al., 1995).

O VAIE replica-se predominantemente em macrófagos (CLEMENTS; ZINK, 1996), possui como material genético duas fitas positivas de RNA, seu genoma possui 8,2 kb, sendo o menor e o mais simples de todos os lentivírus. As partículas virais do VAIE são pleomórficas esféricas e com diâmetro entre 90-140 nm (NAKAJIMA, et al., 1969; TAJIMA; NAKAJIMA; ITO, 1969), possui núcleo com forma cônica e a simetria capsidial é icosaédrica (CLEMENTS; ZINK, 1996). Possui os genes *gag*, *pol* e *env*, responsáveis pela formação de proteínas estruturais, polimerases, proteases e glicoproteínas do envelope, respectivamente; o gene *gag* (antígeno associado a grupo), codifica as principais proteínas internas: p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* (polimerase), designando a enzima transcriptase reversa, ribonuclease “H” e uma integrase, enzima de ligação ao DNA para auxiliar na integração ao genoma da célula do hospedeiro; já o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope, gp90 (superfície externa) e

gp45 (transmembrana) (Figura 1a) (HENDERSON et al., 1987; HUSSAIN et al., 1988; LEROUX et al., 2004).

O genoma viral possui também três fases de leitura aberta (*Open reading frames*) (ORFs); denominadas *tat*, *rev* e *s2*, responsáveis pela síntese de proteínas regulatórias, respectivamente cada ORF codifica: proteínas acessórias para ativação transcricional; regulação de *splicing* e de transporte do RNAm; e ação na replicação viral e virulência (CLEMENTS; ZINK, 1996; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004). Possuem ainda longos terminais de repetição (*Long Terminal Repeats*) (LTR), cujo papel é servir como local de início da transcrição, eles contêm três segmentos denominados U3 (sequência única, na extremidade 3'), R (sequencia em repetição) e U5 (sequência única, na extremidade final 5'). A região U3 contém vários elementos importantes para a transcrição viral (Figura 1b) (CARVALHO; DERSE, 1993).

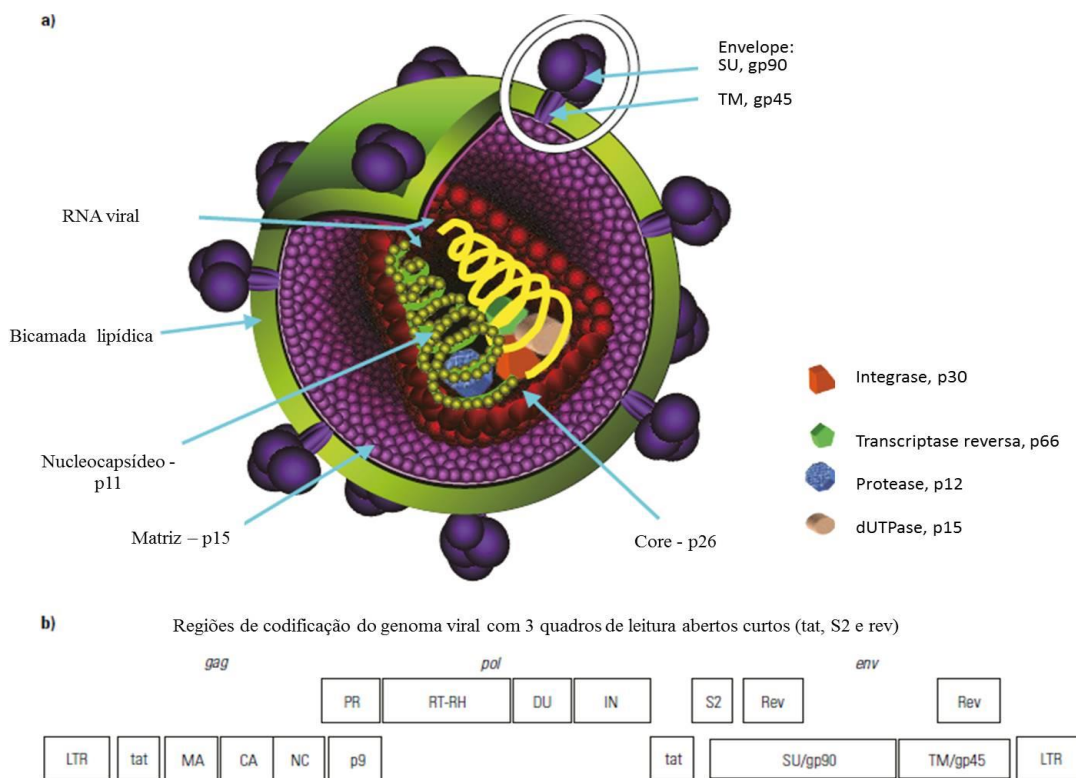


Figura 1. VAIE. a) Estrutura do vírus da anemia infecciosa equina demonstrando localização e identificação das proteínas; b) Provirus da anemia infecciosa equina, com repetições terminais longas e regiões codificadoras de proteínas (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *S2* e *rev*) com nomes de proteínas adicionados. Fonte: Adaptação de Issel; Foil, (2015).

As proteínas do gene gag, proteínas estruturais não glicosiladas, são menos predispostas à variação antigênica do que as glicoproteínas de superfície. A mais abrangente proteína do núcleo, a p26, induz uma forte resposta imune humoral na maioria dos equinos infectados, e é usada como base na maioria dos testes de diagnóstico sorológicos para o vírus (TRAUB-DARGATZ, IN: SELTON, 1993).

2.2 Mecanismos de replicação viral

Como organismos intracelulares obrigatórios, os vírus se utilizam da maquinaria celular hospedeira para transporte através da membrana, transcrição, *splicing*, transporte intracelular e síntese proteica. Qualquer ciclo viral pode ser dividido nas seguintes fases: Adsorção à membrana celular hospedeira, penetração no citoplasma, desnudamento do material genômico com liberação do complexo nucleoprotéico ou capsídeo, síntese de proteínas de fase precoce, replicação do genoma, síntese de proteínas de fase tardia, montagem viral e maturação e finalmente a liberação da nova partícula viral. Os vírions, partículas subvirais ou complexos nucleoprotéicos são transportados durante as três primeiras fases, a partir da superfície da célula hospedeira até o sítio de transcrição e replicação, assim como são transportados do sítio de síntese para o local de montagem e de volta à membrana celular hospedeira para a liberação da partícula viral (CUDMORE; RECKMANN; WAY, 1997; SODEIK, 2000; PLOUBIDOU; WAY, 2001; SMITH; ENQUIST, 2002). Devido ao trânsito de partículas maiores que 500 kDa ser restrito dentro do citoplasma, diferentemente de partículas menores cujo trânsito é mais livre, os vírus assim como as organelas celulares empregam energia para transporte direcionado. Os vírus utilizam dois tipos de estratégia para transporte dentro da célula: se apropriam do mecanismo de transporte de membrana ou interagem diretamente com a maquinaria de transporte do citoesqueleto (DÖHNER; SODEIK, 2005).

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

a produção de células cronicamente infectadas (TELESNITSKY; GOFF, 1993; BEBENEK; KUNKEL, 1993).

As células da linhagem monocítica/macrofágica são os principais alvos do VAIE, nelas acontecem a replicação viral (OAKS et al., 1998). Os monócitos do sangue periférico permitem a entrada do vírus e a transcrição reversa do RNA viral, porém não permitem a replicação viral; a diferenciação destes em macrófagos é um passo essencial para a replicação dos vírus e a expressão de proteínas virais (SELLON et al., 1992; MAURY, 1994). A replicação do VAIE acontece em macrófagos de diferentes tecidos como baço, fígado, pulmão, linfonodos e medula óssea (SELLON et al., 1992).

Os retrovírus, dentre eles o VAIE, penetram na célula por fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira. A primeira fase de entrada do vírus no macrófago dá-se através do co-receptor lentivírus equino 1 (ELR1), pertencente a família de receptores da classe do fator de necrose tumoral (TNFR). Para a definição das interações funcionais entre a proteína de superfície do VAIE (gp90) e seu receptor ELR1, estudos realizados por Zhang et al. (2005) revelam como determinante a ligação da gp90 ao ELR1. Mutações de aminoácidos individuais do segmento de CRD1 ELR1 indicaram o resíduo de aminoácido Leu70 no CRD1 como essencial para a ligação funcional da gp90 do VAIE e para a infecção pelo vírus das células alvo.

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

O VAIE contém dupla fita de RNA positivo e várias cópias da enzima transcriptase reversa. Depois de infectar a célula alvo, no caso o macrófago, a transcriptase reversa é utilizada para fazer as cópias iniciais de DNA a partir de RNA. Uma vez que uma cadeia de DNA foi sintetizada, uma cadeia de DNA complementar viral é feita. Estas cópias de cadeia dupla de DNA viral são inseridas no genoma da célula hospedeira, a integração do DNA de dupla fita no genoma celular dos macrófagos é então catalisada por uma enzima integrase codificada pelo vírus, pelas porções terminais dos LTRs. Esta integração é necessária para a síntese de novas moléculas de RNA viral pela célula hospedeira através da polimerase de RNA. Estas moléculas de RNA servem como modelos para fazer novas cópias do RNA viral cromossômico e servem também como RNA mensageiro. O RNA mensageiro é traduzido em proteínas virais que são usados para formar o envelope do vírus. Novas partículas virais são

montadas, a partir da membrana plasmática da célula hospedeira e são então libertadas (FLORES, 2007).

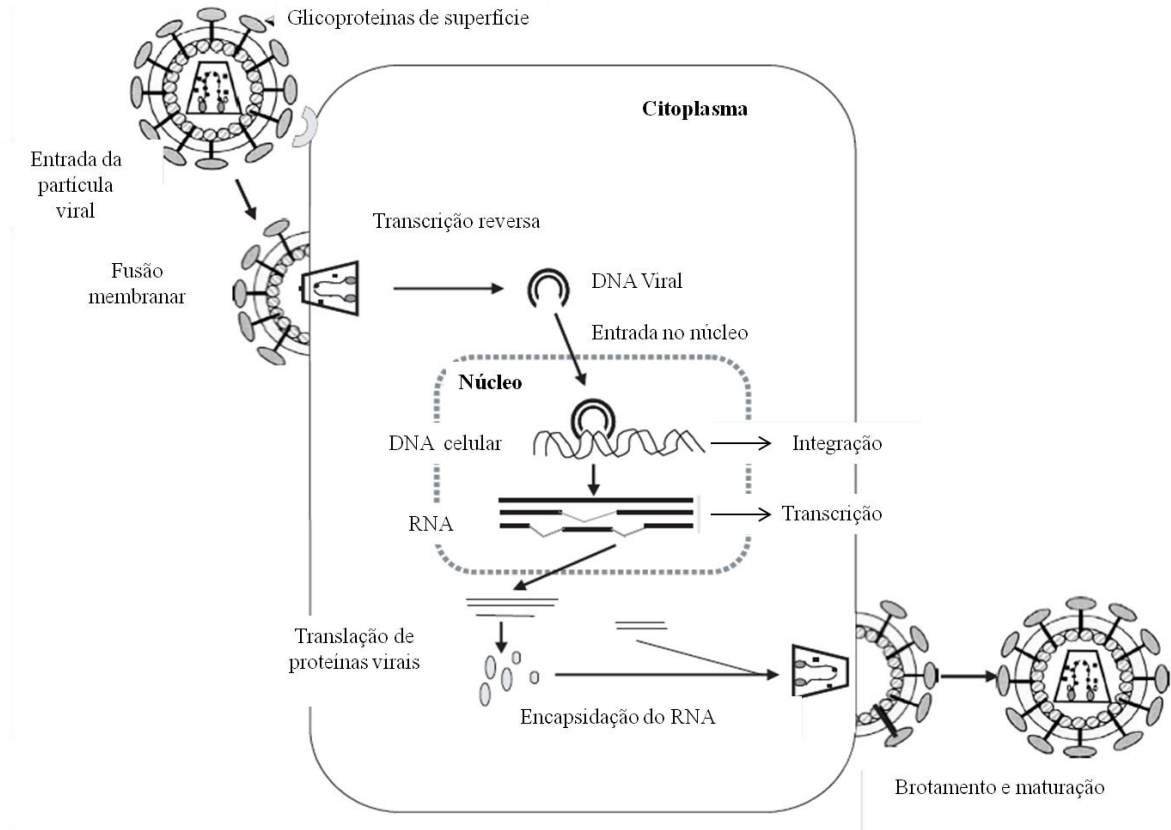


Figura 2. Ciclo retroviral, representação esquemática do ciclo viral do VAIE nas células hospedeiras. Fonte: Traduzido a partir de LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, (2004).

Um dos mecanismos fundamentais de persistência pelo VAIE, tal como observado com outros lentivírus, incluindo o HIV-1, é a variação genômica dinâmica resultante de alterações na antigenicidade do envelope devido a mutações nos genes que codificam as proteínas de membrana do vírus (MAURY et al., 2005). Alguns estudos também indicam a LTR viral, como um segundo gene variável do VAIE, sendo designada como região hipervariável (PAYNE et al., 2004). A variação genética é uma marca registrada dos retrovírus que se acredita ser uma consequência da baixa atividade de revisão da transcriptase reversa 3'-5' codificada pelo próprio vírus (OVERBAUGH; BANGHAM, 2001). As regiões LTR do VAIE são as mais variáveis do genoma viral em isolados de cultura de tecidos e em diferentes isolados de campo (LICHTENSTEIN, 1999; PAYNE et al., 1999). Um estudo examinou sete isolados *in vivo* e demonstrou que 45% das posições dos nucleotídeos dentro das LTRs variou entre eles (MAURY et al., 1997). Níveis semelhantes de variação foram

também encontrados em diferentes isolados de cultura de tecidos, estas alterações incluem mutações pontuais, inserções e deleções na região de cerca de 90 pb encontrada nas LTRs (MAURY et al., 1994).

2.3 A proteína p26 do VAIE

A principal proteína do núcleo do VAIE, a p26, é uma das principais proteínas imunogênicas estruturais persistentes durante todas as fases da infecção e também é altamente conservada antigenicamente entre isolados virais, sendo codificada pelo gene *gag* (HUSSAIN et al., 1988; SALINOVICH et al., 1986). Por estas razões, a detecção de anticorpos para p26 serve como base para os procedimentos de diagnóstico sorológicos para VAIE em equinos (COGGINS; NORCROSS; NUSBAUM, 1972; SHANE, ISSEL; MONTELARO, 1984).

Os primeiros e predominantes anticorpos produzidos por um animal infectado são contra a glicoproteína gp90, detectáveis entre sete e 10 dias após a infecção. Porém, como as mutações relacionadas com esta proteína são determinantes ao escape, muitos testes não a utilizam para o diagnóstico da AIE. A p26 é mais antigenicamente estável entre as linhagens do VAIE que as glicoproteínas gp45 e gp90 (MONTELARO et al., 1984).

O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína p26, observados entre 10 e 14 dias após a infecção, atingindo um pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90 (MONTELARO, BALL; RUSHLOW, 1993). Devido a sua sequência gênica ser extremamente conservada, a p26 é a proteína mais utilizada para a realização dos testes de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2013).

A proteína recombinante p26 (pr26) do VAIE foi obtida por Birkett et al. (1997) como proteína solúvel produzida em *E. coli*. Quando analisada por SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras, a proteína purificada migrou como um monômero de 26 kDa, evidenciando que a proteína não contém ligações dissulfeto intermolecular. Mesmo apresentando três resíduos de cisteína, a marcação dos grupos sulfidris livres com iodoacetamida sugere que nenhum dos três resíduos de cisteína de pr26 está envolvido em ligações dissulfeto intramoleculares. A Cromatografia por filtração em gel indicou que a proteína se mostra como um monômero em solução. Analisando o espectro de dicroísmo circular da proteína verifica-se a seguinte composição estrutural: 51% α -hélice, 15% β -folha, e 34% mostra-se de forma aperiódica. Espectroscopia de fluorescência revelou que os três

resíduos de triptofano em rp26 ocupam dois ambientes diferentes. Estes dados apoiam a conclusão de que a proteína encontra-se em sua conformação nativa.

2.4 Epidemiologia

A Anemia Infeciosa Equina é uma doença de distribuição mundial e está listada como uma das onze doenças específicas de equinos com notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (COOK, LEROUX; ISSEL, 2013). No Brasil, entre 2010 a 2016, foram notificados 28.229 focos. A distribuição do número de focos por Unidade Federativa, no período de 2010 a 2016, encontra-se disposta no quadro 1 (OIE, 2017).

Estudos epidemiológicos pontuais sobre a ocorrência da AIE já foram realizados em algumas regiões do Brasil com diferentes prevalências, tais como: 24,8% no Pantanal, MS (SILVA et al., 1999); 17,7% no estado do Pará (HEINEMANN et al., 2002); 0,07% e 3,1% e no estado de Minas Gerais (ALMEIDA, GONÇALVES; MARTINS, 2006; FIORILLO, 2011); 11,8% no estado de Mato Grosso (NOCITI et al., 2007). Na região Nordeste, Silva et al. (2013) determinaram uma prevalência de 3,1% no estado do Ceará, 2,8% no estado da Paraíba e 1,3% no Rio Grande do Norte.

A transmissão do VAIE pode ser vertical (intrauterina) ou horizontal, por meio de fômites contaminados (agulhas, freios, esporas e outros), leite materno, sêmen ou por insetos hematófagos (CRAIGO; MONTELARO, 2008). Dois tipos de transmissão horizontal são considerados: a) transmissão direta mecânica, quando o agente é transmitido diretamente entre os hospedeiros; b) transmissão indireta, quando ocorre transmissão do agente por vetores que carregam o vírus mecanicamente (ISSEL; FOIL, 2015).

A transmissão do vírus está principalmente relacionada com a transferência de sangue de um cavalo infectado a um sadio. Os insetos hematófagos desempenham o papel mais importante na cadeia de transmissão, atuando como vetores, implicados na transmissão mecânica, como exemplo, insetos hematófagos da ordem Diptera: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp., *Tabanus* sp., *Hybromitra* spp., sendo *Tabanus* sp., os principais responsáveis pela transmissão (COOK; COOK; ISSEL, 2009).

O risco de transmissão entre animais aumenta com a prevalência da doença na propriedade, a diversidade e abundância dos vetores associados à proximidade entre os mesmos (SILVA, ABREU; BARROS, 2001).

Quadro 1 - Número de focos de Anemia Infeciosa Equina nos estados brasileiros, entre 2010 a 2016.

Estado	Ano						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Acre	96	84	75	127	85	49	90
Alagoas	89	320	214	190	145	151	100
Amapá	6		6	10	4	16	12
Amazonas	21	11	12	17	9	15	20
Bahia	409		27	561	21	58	11
Ceará	548	198		561	999	1224	490
Distrito Federal	29	22	20	34	24	26	16
Espírito Santo	32	44	116	84	37	52	27
Goiás	215	181	200	308	166	155	122
Maranhão	538	589	710	660	578	106	407
Mato Grosso	205	465	884	394	958	489	345
Mato Grosso do Sul	266	184	211	154	110	99	101
Minas Gerais	186	220	208	153	164	182	124
Para	196	307	238	382	396	268	312
Paraíba	42	74	77	76	93	85	10
Paraná	19	27	20	34	12	20	15
Pernambuco	137	155	88	133	132	46	67
Piauí	293	259	222	280	302	273	226
Rio de Janeiro	143	152	126	114	109	80	31
Rio Grande do Norte	34	20	28	21	52	19	20
Rio Grande do Sul	3	6	5	157	9	59	56
Rondônia	212	159	214	238	115	113	79
Roraima	23	51	114	75	130	163	105
Santa Catarina	46	43	44	14	25	26	28
São Paulo	72	49	22				7
Sergipe	8	12	26	29	18	15	11
Tocantins	115	79	31	49	170	118	140

Fonte: OIE, 2017 (Adaptado). Acesso em 28 de julho de 2017.

Outras questões relacionadas com a transmissão do VAIE são: quantidade de vírus no ambiente (dose infectante); sobrevivência do agente no meio ambiente, hábitos alimentares dos insetos, quantidade de sangue transferida, densidade populacional de animais, proximidade de animais infectados e sadios e viremia do animal infectado (ISSEL; FOIL, 2015). Observam-se, na tabela 1, os principais fatores associados à transmissão do VAIE relacionados aos hábitos dos vetores e importância do homem como facilitador na transmissão do vírus.

Quadro 2 - Principais fatores associados à transmissão do VAIE relacionados aos hábitos dos vetores e importância do homem como facilitador na transmissão do vírus

Variáveis	Vetor			Homem*
	Tabanídeos	Mosca do estábulo	Mosquitos	
Importância geral	Alta	Alta	Mínima	Alta
Taxa de alimentação interrompida	Muito alta	Alta	Baixa	
Volume de sangue transferido	Alta	Baixa	Muito Baixa	Alta
Distância percorrida	Muito longa	Curta	Curta	Longa

*Fatores relacionados ao homem: utilização de seringas, equipamentos veterinários e transfusões sanguíneas.

Fonte: Issel et al. 2014.

2.5 Patogenia e sinais clínicos

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

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

A persistência viral provavelmente está ligada ao fato do vírus inserir uma cópia de DNA viral no DNA cromossomal dos macrófagos do hospedeiro, formando o provírus, que pode não ser manifestado por longo período de tempo, com baixa (ou nenhuma) transcrição

ou tradução de genes virais. Sem expressar o antígeno viral, a célula infectada não será reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro. Fatores imunossupressores como administração de corticóides, doenças que debilizem o sistema imunológico ou estresse, induzem ao retorno do aparecimento de alguns sinais clínicos (KONO et al., 1976; TUMAS et al., 1994; CRAIGO et al., 2002).

O desenvolvimento dos sinais clínicos do animal infectado varia na maioria das vezes, a depender da dose infectante, da estirpe viral e do *status* imunológico do hospedeiro (TIMONEY, GILLESPIE; SCOTT, 1988; FENNER et al., 1993; MURPHY et al., 1999). A AIE surge com uma progressão vigorosa que passa por três fases: aguda, crônica e inaparente (Figura 3, tabela 2). Dependendo da virulência e da dose infectante a doença aguda ocorre após um período de incubação de uma a quatro semanas, no entanto os sinais clínicos podem estar completamente ausentes ou limitados a um episódio febril leve e que não é detectado. Nesta fase, os sinais clínicos incluem além da febre, trombocitopenia, letargia e inapetência. Nos casos graves podem ocorrer anemia hemolítica, petéquias e epistaxe. Na fase crônica observa-se um quadro de anemia, trombocitopenia, perda de peso, edema e sinais neurológicos (ataxia e/ou encefalite) (ISSEL; FOIL, 2015). A anemia resultante de infecção por VAIE é normocítica e normocrômica, resultante de uma combinação de hemólise, eritrofagocitose e de uma redução na produção de eritrócitos (TRAUB-DARGATZ, 1993; JONES, HUNT; KING, 2004).

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

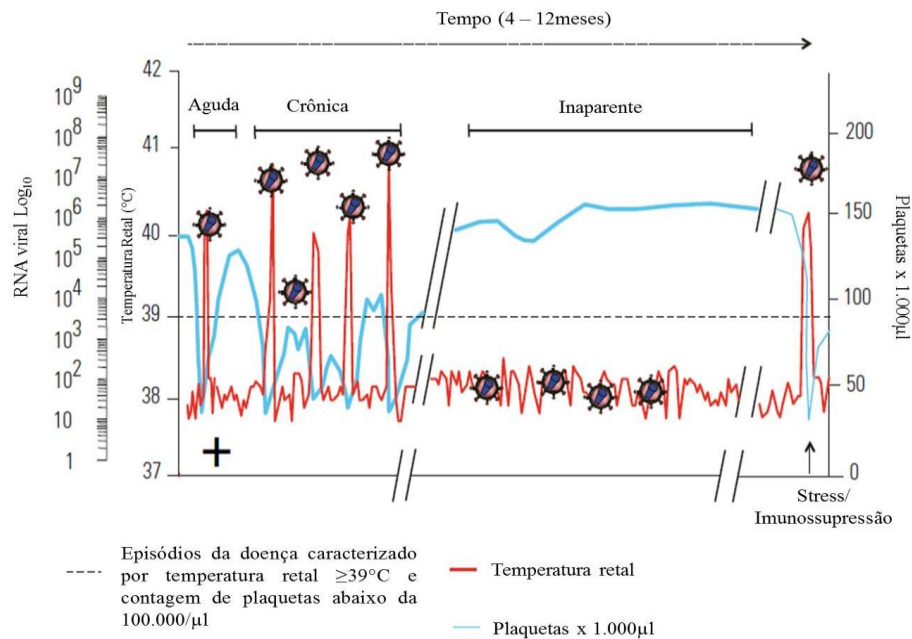


Figura 3. Cinética de eventos após inoculação intravenosa de um equino com uma cepa patogênica de VAIE com uma dose infectante de 10^3 . A carga viral (cópias do vírus RNA/mL) é demonstrada pelo desenho de partículas virais. A primeira detecção de anticorpo anti-VAIE foi constatada a partir do primeiro episódio febril (+). Fonte: Issel; Foil (2015)

Quadro 3. Fases clínicas da infecção pelo Vírus da Anemia Infecciosa Equina

Fase	Carga viral	Sinais clínicos predominantes
Aguda (transitória)	Alta ($\geq 5 \times 10^7$ cópias de RNA viral ou $\geq 10^5$ HID ₅₀ mL de sangue)	Febre (39°C) Trombocitopenia
Crônica (≥ 12 meses) (39°C)	Alta ($\geq 5 \times 10^7$ cópias de RNA viral ou $\geq 10^5$ HID ₅₀ mL de sangue)	Episódios de febre recorrentes Trombocitopenia Anemia Edema Depressão neurológica Caquexia Hemorragias petequiais
Inaparente	Baixa ($\leq 10^2$ cópias de RNA viral/mL sangue)	Sem sinais clínicos aparentes

Convenções: HID - Dose infectante por mL. Fonte: Issel; Foil, (2015).

A forma aguda da doença geralmente ocorre durante o início da infecção e termina frequentemente com a morte do cavalo no intervalo de três a 14 dias. Caracteriza-se por um início súbito, febre, depressão grave, perda de apetite e rápida deterioração da condição física. Uma profunda fraqueza pode resultar em incoordenação ou prostração. Icterícia e edema do abdômen, com ou sem hemorragias petequiais das membranas das mucosas na base da língua e na conjuntiva. A frequência e a intensidade dos sons cardíacos aumentam

consideravelmente, especialmente com exercício moderado. Secreção nasal amarelada ou sanguinolenta pode estar presente. Um aumento do baço pode ser verificado no exame retal. A forma aguda é caracterizada por baixos valores do hematócrito, como hemoglobina baixa e baixa contagem de células vermelhas do sangue, além de uma taxa de sedimentação elevada. A morte está usualmente relacionada com a gravidade da anemia (MCCLURE et al., 1982; COOK; ISSEL; MONTELARO, 1996; ETTINGER; FELDMAN, 1997).

Sinais neurológicos e lesões do sistema nervoso central têm sido associados à doença. Sinais clínicos, como: perda de peso, depressão, desorientação, andar em círculos e hipertermia são relatados (MCILWRAITH; KITCHEN, 1978; MCCLURE et al., 1982). Entre oito e 12 meses pós-infecção, os cavalos infectados normalmente avançam para uma fase crônica, geralmente sem apresentar sinais clínicos, presumivelmente devido ao desenvolvimento de imunidade do hospedeiro (CRAIGO; MONTELARO, 2008). Estes portadores inaparentes, porém, permanecem infectados por toda vida com a manutenção de níveis muito diferentes de replicação do vírus no estado estacionário em reservatórios monócitos rico tecido (HAMMOND et al., 2000; MONTELARO; BALL; RUSHLOW, 1993).

A forma crônica da doença pode seguir-se à forma aguda ou subaguda podendo retornar a estas a qualquer momento (SELLON, 1992; CRAWFORD et al., 1996). A maioria dos animais com diagnóstico de AIE encontra-se com a forma crônica da doença apresentando ciclos recorrentes de febre, perda de peso, anorexia, edema, leucopenia, anemia e trombocitopenia resultando em hemorragias, letargia e ataxia. Os episódios têm duração média de três a cinco dias com intervalos de semanas ou meses entre eles. Sinais neurológicos têm sido associados com a AIE (SILVA et al., 2004). A frequência e a severidade da doença diminuem com o tempo, após seis a oito episódios que acontecem nos primeiros 12 meses após a infecção, a maioria dos animais torna-se portador assintomático (HIRSH; ZEE, 2003).

Com isso a maior parte dos animais infectados com o vírus da AIE encontra-se na forma inaparente da doença. Estes animais não apresentam sinais clínicos, mesmo possuindo níveis detectáveis de anticorpos. Depois de muitos anos assintomáticos, alguns cavalos infectados cronicamente voltam a apresentar sinais clínicos, após estresse imunológicos associados a outras doenças graves (ISSEL; COGGINS, 1979).

Uma hipótese para a recorrência cíclica e persistência viral é que o sistema imune age sobre a população viral existente durante a infecção clínica (febre alta) na tentativa de eliminá-la. Quando o organismo consegue controlar esta infecção algumas variantes, que têm alterações confinadas ao envelope são selecionadas. Com o passar do tempo os episódios

febris recorrentes e a forma aguda da doença vão se tornando menos frequentes e o animal atinge o estado de portador assintomático (BOTTON; WEIBLEN, 1995).

2.6 Técnicas de diagnóstico

Os testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (COGGINS et al., 1970) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (SUZUKI; UEDA; SAMEJIMA, 1982) são testes confiáveis para a detecção de AIE em cavalos, exceto para os animais nos estágios iniciais da infecção e potros de fêmeas infectadas (TOMA, 1980). Embora, o ELISA detecte anticorpos mais precocemente e em títulos mais baixos do que o IDGA, os resultados positivos nos ELISA devem ser confirmados na IDGA, pois resultados falso-positivos têm sido registrados. Além disso, como a leitura da IDGA é feita com base na comparação das linhas de identidade do soro teste com um soro controle positivo, apresenta a vantagem de poder distinguir as reações inespecíficas das específicas (OIE, 2013). Por isto, a IDGA é recomendada como teste oficial para trânsito internacional de equídeos e ELISA como teste alternativo (OIE, 2013). No Brasil os testes oficiais para diagnóstico da AIE são IDGA e ELISA, sendo o IDGA o teste confirmatório (BRASIL, 2014).

As técnicas de imunoprecipitação, baseadas na quantificação de precipitados formados pela reação antígeno-anticorpo, começaram em 1897, Rudolf Kraus, em Viena, descreveu a observação de um fenômeno que consistia na formação de um precipitado no fundo de um tubo de ensaio dentro do qual haviam sido misturados soro anticolérico e filtrado de uma cultura de bacilo colérico (CAVALCANTI, 2013). E em 1905, Bechhold, na Alemanha, apresentou seus experimentos sobre imunoprecipitados em géis.

A difusão de uma substância solúvel em um meio fluido é um processo pelo qual a substância é transportada, de uma parte para outra. A difusão pode ser efetuada em meio gelificado, as técnicas de imunodifusão detectam a reação antígeno-anticorpo através da formação de precipitado. A imunodifusão pode ser simples ou dupla. Na imunodifusão simples, ou o antígeno ou o anticorpo permanecem fixados ao suporte e o outro se difunde, até haver a precipitação do complexo. Na imunodifusão dupla, tanto o antígeno como o anticorpo se movem, em uma direção ao outro, até haver a precipitação. Em ambos os casos, a difusão pode ser linear ou radial (FERREIRA; MORAES, 2013).

Na imunodifusão simples linear ou método de Oudin, o anti-soro é adicionado ao ágar, e colocado em tubo até formar uma coluna entre 35 à 45 mm de altura. Na imunodifusão simples radial, Mancini introduziu uma técnica onde o ágar é misturado com um anticorpo

específico para determinado antígeno e a mistura é colocada em placa de Petri ou lâmina de vidro, e no gel são feitos orifícios em que se colocam os antígenos testes. É realizada então uma incubação em câmara úmida até que ocorra a difusão (48 a 72 horas), sendo então determinada área do halo de precipitação formado.

Já na Imunodifusão dupla radial de Ouchterlony, tanto o antígeno quanto o anticorpo (soro) são colocados em orifícios no gel, caso haja identidade entre eles, a precipitação ocorrerá na região de equivalência quando o antígeno e o anticorpo se difundirem no ágar. O complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac) se apresentará na forma de uma linha ou um arco de precipitação. Cada linha em um espectro de precipitação corresponde a um par de antígeno-anticorpo. A ausência do antígeno ou do anticorpo é indicada pela ausência da linha. As linhas formadas podem ser completamente coalescentes, no caso de antígenos com os mesmos determinantes; podem apresentar um “esporão”, como no caso de antígenos parcialmente relacionados; ou podem se cruzar (ausência de identidade entre os antígenos) (FERREIRA; MORAES, 2013).

Posteriormente, Coggins e Norcross (1970) passaram a utilizar a IDGA para o diagnóstico da AIE, detectando anticorpos contra a principal proteína nuclear viral, a p26. Essa detecção ocorre pela visualização de uma linha de precipitação que ocorre a formação do complexo Ag-Ac na região de equivalência dos mesmos. Anticorpos precipitantes específicos podem ser detectados entre 14 e 45 dias pós-infecção (COGGINS; NORCROSS; NUSBAUM, 1972; ISSEL; COGGINS, 1979).

Os testes IDGA e ELISA podem ser feitos com a utilização de antígenos tanto de cultivo celular (BOUILLANT et al., 1986; COGGINS; NORCROSS; KEMEN, 1973; MALMQUIST et al., 1973) como de antígenos recombinantes (ALVAREZ et al, 2007; BIRKETT et al., 1997; PIZA et al., 2007; REIS; LEITE, 1994; REIS et al., 2012; COUTINHO et al, 2013).

Os antígenos do VAIE produzidos em bactérias, células de inseto ou em leveduras encontram aplicação prática como antígenos de alta qualidade para diagnóstico. Para uso como controle positivo no diagnóstico da AIE, pode ser utilizado o soro de um cavalo previamente infectado com o VAIE. Este soro deve produzir uma única linha de precipitação que é específico para o vírus. É essencial para o aparecimento da linha identidade de precipitação o equilíbrio entre as concentrações de antígeno e de anticorpo, a fim de assegurar a sensibilidade do teste. As concentrações dos reagentes devem ser ajustadas de modo a formar uma estreita linha de precipitação aproximadamente equidistante entre os poços contendo antígeno e soro (OIE, 2013).

Alguns artigos utilizando a IDGA mostram o desenvolvimento de antígenos para serem utilizados em testes diagnósticos para a AIE.

Alvarez et al. (2007) desenvolveram e validaram uma IDGA, para o diagnóstico de AIE utilizando como antígeno a proteína p26 do VAIE produzida em *E. coli*. O teste mostrou sensibilidade relativa diagnóstica e especificidade de 100% em comparação com IDGA comercial, na análise de 1.855 amostras de soro de campo. Além disso, com relação à especificidade analítica, os autores não observaram reações positivas frente a 35 amostras com anticorpos relacionados a outros agentes endêmicos e também com amostras hemolisadas.

Piza et al. (2007), utilizaram uma proteína recombinante p26 do VAIE expresso em *E. coli* como antígeno para padronizar um teste de IDGA. Neste trabalho foram utilizados para avaliação do teste de IDGA, soros de equinos divididos em três painéis: o painel A com 196 soros negativos de cavalos de um rebanho controlado (com realização de testes de IDGA para AIE a cada seis meses), o painel B com 194 soros negativos vindos de área endêmica do Pantanal / Mato Grosso do Sul e o painel C com 330 soros positivos vindos também do Pantanal. Como resultado foram encontrados as sensibilidade e especificidade relativas de 100% em ambos os parâmetros com relação ao kit comercial IdexxTM.

Singha, et al. (2013), utilizaram a proteína p26 recombinante expressa em *E. coli* para avaliação de IDGA, para o estudo foram utilizados 1.200 amostras. A SeD e a SpD na IDGA ELISA foram ambos de 100%.

Em trabalho de Paré e Simard (2004), foram avaliados dois IDGAs comerciais disponíveis em comparação com um kit IDGA de referência para o diagnóstico da AIE para uso regulatório no Canadá (IdexxTM). Para a análise dos dois IDGAs foram utilizadas 285 amostras positivas e 315 negativas, os kits de IDGA (EIA antibody test kit - VMRD, Washington, USA e o LAB-EZ/EIA da Synbiotics Corporation, California, USA) mostraram ser equivalentes, com uma sensibilidade e uma especificidade relativas de 98,9% e 100% (n=600) para o primeiro; e 100% e 100% (n=600) para o segundo.

Na década de 1960, o único imunoensaio realizado era o radioimunoensaio (RIE), configurando-se o único teste disponível para detecção de antígenos ou anticorpos marcados por radioisótopos. Como uma modificação e um avanço para o RIE, surgiu o trabalho de Wide e Porath (1966), onde é descrito o protocolo de adsorção de antígeno ou de anticorpo em uma matriz sólida.

Além disso, como alternativa para esta o RIE, levando-se em conta a instabilidade dos radioisótopos, risco operacional e elevados custos de biossegurança e com o descarte do

material radioativo, Avrameas e Uriel (1966) e Nakame e Pierce (1966), desenvolveram de forma independente, a marcação de anticorpos com enzimas. Em 1971, Eva Engvall e Peter Perlmann na Universidade de Estocolmo (Suécia), e Anton Schuurs e Bauke van Weemen (Países Baixos) publicaram artigos independentes que sintetizaram esses conhecimentos em métodos para realizar o teste imunoenzimático - o ELISA (ENGVALL; PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN; SCHUURS, 1971).

O princípio do ELISA é combinar a especificidade dos anticorpos com a sensibilidade dos ensaios enzimáticos, usando anticorpos ou antígenos conjugados a uma enzima. O ELISA pode ser usado para detectar a presença de antígenos ou de anticorpos. Em geral, o ELISA é apresentado algumas etapas básicas: adsorção do antígeno em placa de microtitulação, bloqueio dos sítios não específicos para evitar resultados falsos positivos, adição de anticorpo primário, adição de um conjugado que pode ser um anticorpo ou uma proteína conjugada a uma enzima, adição de substrato cromogênico adicionado para desenvolver uma reação de cor, a qual é medida por espectrofotômetro (KONEMAN, 2008).

O primeiro ELISA realizado como método diagnóstico para a AIE foi descrito por Suzuki, Ueda e Samejima, (1982), onde foi considerado um método sensível para a detecção de EIA. Foram testados soros de cavalos infectados experimentalmente com vírus da AIE por ELISA, fixação do complemento (CF) e testes de imunodifusão (IDGA). Verificando-se o ELISA era muito mais sensível do que os testes de CF e IDGA. Além disso, com o uso do ELISA, anticorpos específicos poderiam ser detectados em um estágio anterior de infecção do que por CF ou IDA.

Vários trabalhos foram realizados em busca do desenvolvimento de ELISAs para o diagnóstico da AIE, dentre estes alguns chegaram a mostrar conclusões relacionadas com a SeD e a SpD.

No trabalho de Soutullo et al. (2001), três peptídeos sintéticos derivados de proteínas de superfície do VAIE foram utilizados para o desenvolvimento de ELISAs para diagnóstico da AIE, dois derivados da gp90 e um da gp45. Foram utilizados para o trabalho soros de 140 cavalos naturalmente infectados com o VAIE e 167 soros negativos foram utilizados. Os valores de detectabilidade de animais positivos e de animais negativos encontrados foram de: utilizando apenas um dos derivados da gp90, 91% e 99% respectivamente (n=307 soros), com a utilização de um peptídeo derivado de gp45, 92% e 98% (n=286). Utilizando os dois peptídeos em conjunto os valores foram de 98% para ambos (n=278), demonstrando que em separado os peptídeos sintéticos apresentam menores valores de detecção entre os animais positivos e negativos.

Piza et al. (2007) utilizaram uma proteína recombinante p26 (fusionada com GST) do vírus da AIE expresso em *E. coli* como antígeno para padronizar um teste de IDGA e de ELISA indireto, utilizando 720 soros de equinos do Brasil. No trabalho foram utilizados três painéis de soros: painel A - 196 soros negativos para AIE vindos de área não endêmica controlada; painel B - 194 soros negativos de uma área endêmica e painel C- 330 soros positivos de uma área endêmica. Encontrando valores de SeD e SpD de 100% para IDGA e com relação ao ELISA (para soros negativos de áreas endêmicas) 100% e 93,3% respectivamente.

Também no Brasil, Reis et al. (2012) utilizaram a proteína de envelope recombinante gp90 marcada com poli-HIS, a qual foi expressa em *E. coli*, na avaliação de um ELISA. Foram utilizados 1.160 soros, encontrando-se valores de SeD e SpD 96,1% e 96,4% para o ELISA. Mais recentemente em Coutinho (2014) foi utilizada a proteína recombinante p26 recombinante marcada com poli-HIS e expressa pela primeira vez na levedura *P. pastoris* no desenvolvimento de um ELISA indireto com 805 amostras de soros equinos, onde 101 eram positivos para AIE e 704 eram negativos. Foram encontrados os valores de 97% para a SeD e de 97,9% para a SpD.

Em trabalho realizado na Índia (SINGHA et al., 2013) foi utilizada a proteína p26 recombinante e expressa em *E. coli* para avaliação de teste de ELISA indireto e de IDGA, para o estudo foram utilizadas 7.150 amostras de soros equinos no ELISA e 1.200 amostras na IDGA. A SeD e a SpD no ELISA foram de 100% e 98,6%, respectivamente, enquanto que para a IDGA foram encontrados 100% para ambas.

Em 2016 foi publicado na Itália um estudo (NARDINI et al., 2016) desenvolvido no Centro Nacional de Referência Italiano para a AIE (CRAIE, Roma, Itália) relatando o desenvolvimento e validação de um ELISA competitivo (ELISAc) com anticorpo monoclonal e proteína p26 recombinante do VAIE fusionada com tiorredoxina e expressa em *E. coli* para a detecção de anticorpos contra o VAIE. Para a determinação da SeD e da SpD foram utilizados 1.102 soros de equinos, dentre eles 857 positivos e 245 negativos testados por IDGA, com valores de 100% e de 82% respectivamente. No trabalho, o mesmo ELISAc foi também utilizado como teste de triagem para 96.468 amostras equíneas no programa de vigilância italiano para AIE, tendo sua especificidade diagnóstica estimada em 99,8%. Quando utilizados os critérios de validação segundo a OIE o teste mostrou uma SpD muito menor do que quando utilizada como teste de triagem sem validação (82% e 99,8%).

No trabalho de Pará e Simard (2004) foram avaliados quatro ELISAs comerciais disponíveis em comparação com um kit IDGA de referência para o diagnóstico da AIE para

uso regulatório no Canadá. O ELISA 1, o DiaSystems EIA CELISA, IdexxTM Laboratories, o qual utiliza a proteína p26 de VAIE, é um ELISA competitivo e demonstrou frente a 600 amostras, uma SeD e uma SpD de 100% e 93,3%; o ELISA 2, o ViraCHECK/EIA, Synbiotics Corporation, que também utiliza a p26 e é um ELISA indireto e os resultados encontrados foram de 100% para a SeD e 100% para a SpD (n=600). O ELISA 3, o SA-ELISA, Centaur, Kansas/ USA, utiliza a gp45, constitui-se um ELISA indireto e apresentou SeD de 86,6% e SpD de 100% (n=460) e o ELISA 4, o SA-ELISA-II, Centaur, utiliza dois antígenos em sua composição a p26 e a gp45, sendo um ELISA indireto e que apresentou 97,4% de SeD e 97,8% de SpD (n=583). Os três ELISAs dirigidos contra anticorpos para a proteína do núcleo p26 se apresentaram bem em comparação com o IDGA de referência, o único ELISA dirigido apenas contra anticorpos contra a gp45 produziu uma menor sensibilidade relativa.

Em trabalho de Nardini et al. (2017) foram analisados seis kits sorológicos comerciais de ELISA: o ELISA 1, um ensaio competitivo com p26 recombinante, o ELISA 2, um ensaio indireto com proteínas do gene gag e do gene env recombinantes, o ELISA 3, competitivo com p26 purificado, o ELISA 4, competitivo com p26 recombinante, o ELISA 5, indireto com antígeno não especificado e o ELISA 6, indireto com p26 recombinante. Todos apresentaram uma SpD relativa de 100% e SeD relativas de: 99,5%, 99,1%, 98,2%, 99,1%, 96,8% e 100%, respectivamente. Com base nos dados obtidos os autores sugerem o uso dos testes ELISA como teste de triagem ao IDGA e também a incorporação dos testes em uma via de diagnóstico em série para melhorar a eficácia de um plano de vigilância de equídeos na Itália.

Além dos testes de IDGA e ELISA podem ser utilizados alguns testes moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que tem sido descrita para a identificação do agente viral. Pela *nested* PCR consegue-se detectar o DNA proviral do VAIE a partir do sangue periférico de cavalos (NAGARAJAN; SIMARD, 2001). O método de PCR *nested* tem-se provado ser uma técnica sensível para detectar linhagens de VAIE em células brancas do sangue de cavalos infectados; o limite inferior de detecção é de tipicamente cerca de 10 cópias de DNA do genoma alvo (NAGARAJAN; SIMARD, 2001 e 2007). Também foram descritas reações de transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) para identificação do vírus (COOK et al., 2002). Os ensaios de PCR podem auxiliar na detecção da infecção por VAIE em algumas situações: em resultados conflitantes de testes sorológicos; na suspeita de infecção com resultados sorológicos negativos; como teste complementar à sorologia para confirmação de casos positivos; para o diagnóstico de infecções precoces e na confirmação do status de potros de éguas infectadas (SANTOS et al., 2011).

2.7 Controle Oficial no Brasil

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

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

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

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

Portaria n° 378, de 17 de dezembro de 2014, que versa sobre as normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de AIE. A partir desta norma o teste de IDGA e o ELISA são os métodos indicados pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) para o diagnóstico da AIE. Considera-se que os resultados positivos no teste de ELISA devem ser submetidos ao teste de IDGA e no caso de discordância entre os testes de ELISA e IDGA, prevalece o resultado obtido no teste de IDGA.

2.8 Sistemas utilizados para a produção de proteínas recombinantes

A indústria biotecnológica é relativamente jovem, começando com o lançamento comercial de insulina recombinante na década de 1980 (WALTHER et al., 2015). Um grande número de proteínas recombinantes é produzido por meio de engenharia genética, movimentando cerca de 50 a 60 bilhões de dólares anualmente no mundo (SCHMIDT, 2004),

com esta estratégia consegue-se produzir proteínas alvo em larga escala para atender as demandas das indústrias biofarmacêuticas. Para a produção de uma proteína recombinante deve-se escolher o melhor sistema de expressão, onde devem ser levados em conta certos pontos como a qualidade da proteína produzida, sua funcionalidade, a velocidade de produção e o rendimento obtido com cada sistema (DEMAIN, 2007; DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Quantidades elevadas de uma proteína específica dificilmente são obtidas a partir de células hospedeiras naturais. Assim, para uma produção elevada de uma proteína utiliza-se frequentemente a tecnologia do DNA recombinante em sistemas de expressão heterólogos. A maquinaria ribossomal, localizada no citoplasma é um excelente catalisador para a biossíntese de proteínas recombinantes (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). As proteínas podem ser produzidas em culturas de células de bactérias, leveduras, fungos, mamíferos, insetos ou plantas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

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

A *Escherichia coli* foi o primeiro hospedeiro utilizado para a expressão de genes recombinantes há quase 40 anos (COHEN, 1973), sendo um dos mais antigos e utilizados (TERPE, 2006). Nos últimos 15 anos, o seu uso como sistema de expressão manteve-se constante, tendo sido utilizado em aproximadamente 60% dos genes recombinantes desenvolvidos segundo pesquisa de periódicos indexados no PubMed. A situação ideal para a maioria dos fins de pesquisa e de produção em escala seria a obtenção da proteína recombinante expressa como produto solúvel e funcionalmente ativa e com alto rendimento (BANEYX, 1999; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

O sistema de expressão baseado em *E. coli* é um dos mais utilizados devido a sua relativa simplicidade, baixo custo e facilidade de cultivo em alta densidade, possuindo também uma genética bem conhecida e o grande número de ferramentas disponíveis compatíveis para a biotecnologia. A variedade de plasmídeos disponíveis, elementos utilizados para a fusão dos genes das proteínas e estirpes mutantes de *E. coli*, têm avançado as possibilidades do uso da bactéria (MAKRIDES, 1996; SWARTZ, 1996; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

Apresenta-se como um excelente sistema de produção de proteínas não-glicosiladas, sendo utilizado para a produção em larga escala de várias proteínas comercializadas. Além de

tudo a *E. coli* recombinante pode acumular proteínas em um total de até 80% de seu peso seco e sobrevive bem em várias condições ambientais (TERPE, 2006).

E. coli oferece um meio para a produção rápida e econômica de proteínas recombinantes, permitindo com isso nos últimos anos, uma elevada produção, o que ocasiona o desenvolvimento de estratégias para alcançar alto nível de expressão protéica, envolvendo aspectos como o design de vetores de expressão, a força do promotor (regulação da transcrição), estabilidade do mRNA, início e término da tradução, codon usage e fatores de fermentação disponíveis para manipulação das condições de expressão; estes apresentam-se como desafios para obtenção de alto rendimento protéico com custo otimizado (JANA; DEB, 2005).

Porém como todos os sistemas, este apresenta algumas desvantagens, como é o caso de seu crescimento em alta densidade celular que pode resultar em aumento da toxicidade devido à formação de acetato; algumas proteínas podem ser produzidas na forma de corpúsculos de inclusão, o que leva a alteração de solubilidade, perda de funcionalidade e dobramento errado (erro de *fold*ing) (FISCHER; SUMMER; GOODENOUGH, 1993), o sistema não consegue também produzir com eficiência pontes dissulfeto intramoleculares, além de não realizar glicosilação proteica (TERPE, 2006; SWARTZ, 1996).

Para tentar ultrapassar as limitações do sistema de produção proteica em *E. coli* e possível utilizar diferentes promotores gênicos para regular a produção proteica, usar diferentes linhagens de *E. coli*, diminuir a temperatura de produção em busca da não formação dos corpúsculos de inclusão, mudar o meio de cultivo (CHOU, 2007; WONG et al., 2008) e fazer uso de parceiros fusão (KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016). Além disso, cultivos da bactéria com alta densidade celular também podem levar à produção aumentada de acetato, que é tóxico para célula, este problema pode ser resolvido através da adição exponencial de glicose durante a fase de crescimento celular (FIESHKO, 1989).

Em geral, proteínas com pesos inferiores a 30 kD são expressos em sistema procariótico enquanto que proteínas com pesos maiores que 100 kDa em sistema eucariótico (RADER, 2008). A glicosilação também entra como fator para decidir qual o sistema a ser utilizado, proteínas não glicosiladas são geralmente produzidas em *E. coli* ou leveduras e constituem 40% do mercado de proteínas terapêuticas. Proteínas glicosiladas humanas são normalmente feitas em células de mamíferos, pois possuem um sistema de glicosilação semelhante à glicosilação de proteínas humana. Leveduras, fungos e células de inseto são geralmente incapazes de oferecer uma típica glicosilação de mamífero. No entanto, a levedura

metilotrófica, *Pichia pastoris*, tem sido geneticamente modificada para produzir um padrão de glicosilação semelhante ao humano (WALSH, 2003).

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

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

As leveduras metilotróficas mostram-se como excelentes hospedeiros para expressão heteróloga, pois seus promotores gênicos estão dentre os mais fortes e os que são mais estreitamente regulados nas leveduras. O crescimento celular consegue atingir uma alta densidade e o nível de expressão pode ser controlado pela simples manipulação do meio de cultivo, sendo a levedura mais utilizada a *P. pastoris* (GELLISON et al., 1992). Uma das vantagens sobre a *E. coli* é que ela é capaz de realizar a formação de pontes dissulfeto e consegue glicosilar proteínas sem que haja hiperglicosilação. Outra vantagem da *P. pastoris* é sua habilidade em secretar proteínas para o meio extracelular o que facilita o processo de purificação posterior da proteína alvo (CHOI et al., 2003). Uma das desvantagens em se trabalhar com a *P. pastoris* é que determinadas proteínas para que tenha seu folding correto necessita da ação de chaperonas, proteínas que auxiliam no enovelamento das mesmas que previnem a sua agregação (HAMILTON et al., 2006; DA SILVA e BORGES, 2011).

Como sistema de expressão heterólogo de proteínas, temos também as células de inseto, que são capazes de realizar modificações pós-traducionais mais complexas que as leveduras. Elas também possuem uma das melhores maquinarias para realização do *folding* de proteínas de mamíferos, sendo muito adequadas para sua produção de forma solúvel (AGATHOS, 1991). Os vetores mais utilizados para expressão recombinante em insetos são os baculovírus (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994; CASTRO et al., 1999), pertencentes à família *Baculoviridae*, capazes de infectar uma gama de hospedeiros artrópodes, dentre eles insetos da ordem díptera, lepidóptera e himenóptera (HERNIOU et al., 2004).

O sistema baculovírus de expressão é baseado na adição de genes exógenos no seu genoma no lugar de um gene não-essencial para a replicação, sob o comando de um forte promotor (MILLER, 1997; SMITH; VLAK; SUMMERS, 1983). Algumas vantagens desse sistema são: grande potencial para produção de proteínas heterólogas, em média de 10 a 100 mg de proteína por litro de cultura; realiza modificações pós-traducionais de maneira semelhante à que ocorre em células de mamíferos (CASTRO et al., 1999) e mostra-se capaz de acomodar genomas maiores que o próprio genoma selvagem, mais ou menos 100 kb de genes a mais (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994).

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

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

de quatro a cinco anos, a um custo de 60 a 100 milhões de dólares, além do processo de produção possuir um potencial para a contaminação do produto por vírus (BISBEE, 1993).

Existem numerosos trabalhos com a obtenção da proteína alvo com diferenças significativas em termos de rendimento proteico, a depender de fatores variados como a proteína alvo, se ela está fusionada ou não, a proteína de fusão utilizada, a temperatura de indução gênica, entre outros. O gene BbgIV, um derivado galactosídeo, foi produzido em *E. coli* DH5 α , em um biorreator, com um rendimento entre 71 e 75 mg por g de peso celular seco, o que representa 20 - 25% do total solúvel proteínas nas células (OSMAN et al., 2013).

Chow et al. (2006) utilizaram uma proteína de fusão ELP purificada de *E. coli* cultivada em frascos agitadores e conseguiram um rendimento de 1,6 g/L com um meio e condições de cultura otimizados, o que também levou a uma redução de 8 vezes no custo da proteína de fusão.

Em Lian et al. (2009) a expressão da proteína da membrana da aquaporina Z fusionada à MBP periplasmática, foram obtidas 200 mg/L de proteína. Trabbic-Carlson et al. (2004) conseguiram rendimentos de 25–30 mg/L da proteína - elastin like polypeptides (ELPs). Já Sivashanmugam et al. (2009) obtiveram rendimento de aproximadamente 40 mg/L de cultura; Spiridonova et al. 2007 conseguiram 3 mg de IL6/L.

Em relação a proteínas recombinantes do VAIE, Piza et al. (2007) obtiveram, após purificação em coluna de Glutathione - Sefarose 4B, um rendimento de 2,4 mg/mL de p26 de AIE recombinante fusionada com a GST, e Singha et al. (2013) conseguiram um rendimento final de p26 a recombinante purificada não fusionada de 10 mg/L de cultura bacteriana induzida.

2.9 Codon usage

Genes expressos tanto em sistemas procariotas como eucariotas apresentam uma utilização não-aleatória de códons sinônimos (GOUY; GAUTIER, 1982; GUTMAN; HATFIELD, 1989), cada organismo possui um uso preferencial de códons para a formação das proteínas.

A análise sistemática dos padrões de uso de códons em *E. coli* levou a algumas observações: há uma tendência de uso de um ou dois códons para quase todas as famílias de códons degenerados; alguns códons são frequentemente utilizados em todos os genes, por exemplo, CCG é a codificação mais utilizada para síntese de prolina; genes com alta taxa de expressão apresentam um maior grau de preferência de códons do que os de baixa expressão;

a frequência de uso de códons sinônimos geralmente reflete a abundância de seus respectivos tRNAs. Estas observações sugerem que genes heterólogos com códons que raramente são utilizados por *E. coli* podem não expressar proteínas de forma eficiente (IKEMURA, 1985; DE BOER; KASTELEIN, 1986).

Os níveis de expressão gênica dependem de alguns fatores, tais como as sequências dos genes promotores e dos elementos reguladores, porém um dos principais fatores é a adaptação dos códons do gene a ser produzido ao sistema de expressão escolhido para produção da proteína (LITHWICK; MARGALIT, 2003). No processo de criação de uma sequência de ácido nucleico que vai ser inserido em um novo hospedeiro para expressar certa proteína em grandes quantidades, a otimização de códons com relação ao uso preferencial é geralmente um dos primeiros passos (VALLEJO; RINAS, 2004).

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

2.10 Proteínas de fusão

Um grande empecilho para produção de proteínas recombinantes em *E. coli* é a sua tendência à formação de corpúsculos de inclusão (LILIE; SCHWARZ; RUDOLPH, 1998), pois apenas 25% das proteínas produzidas em sistemas de expressão bacterianos apresentam-se na forma solúvel (PACHECO et al., 2012). Assim, quando a *E. coli* é usada como sistema heterólogo de escolha para produção proteica, a introdução de um parceiro de fusão é muitas vezes necessária para ajudar no aumento da solubilidade proteica, utilizados desde 1994 com os experimentos de Nygren, Stahl e Uhlen. Desde esta época o uso de proteínas de fusão vem aumentando (ESPOSITO; CHATTERJEE, 2006; KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016).

Algumas características das proteínas de fusão são: proteger as proteínas alvo contra proteólise intracelular (JACQUET et al., 1999; MARTINEZ et al., 1995), aumentar a solubilidade (DAVIS et al., 1999; KAPUST; WAUGH, 1999; SØRENSEN, SPERLING-PETERSEN; MORTENSEN, 2003; AUSTIN; NALLAMSETTY; WAUGH, 2009), simplificar a purificação e expressão de proteínas recombinantes (STEVENS, 2000) e

também proporcionar aumento nos níveis de produção proteica (FOX; WAUGH, 2003; SUN; TROPEA; WAUGH, 2011).

Quadro 4. Principais parceiros de fusão e suas características.

PARCEIROS DE FUSÃO	SEQUENCIA (resíduos de aminoácidos)	MATRIZ	CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO
Poli-HIS (resíduo de histidina)	nH (n=2-12, em geral 6)	Íons metálicos (Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺)	20-250 mM imidazole ou pH baixo
Poli -ARG (resíduo de arginina)	nR (n=5-6, em geral 5)	20-250 mM imidazole ou pH baixo	NaCl até 400 mM pH > 8.0
Epítipo c-myc	EQKLISEEDL (11)	Anticorpo monoclonal com epítipo anti-Myc	pH baixo
Epítipo FLAG	DYKDDDDK (8)	Estreptavidina	pH 3.0 ou 2,5 mM EDTA
Proteína aceptora de Biotina	GLNDIFEAQKIEWHE (15)	Avidina ou estreptavidina modificada	2 mM D-biotina
Strep-tag (marca de ligação com a estreptavidina)	WSHPQFGG (8)	Estreptavidina modificada (Strep-Tactin)	2 mM biotina, em condições suaves
Strep-tag II (marca de ligação modificada com a estreptavidina)	WSHPQFEK (8)	Estreptavidina modificada (Strep-Tactin)	2,5 mM Destiobiotina,
Proteína ligante de Calmodulinabinding protein (CBP)	KRRWKKNFIAVSAA NRFKKISSSGAL (26)	Calmodulina	EGTA ou EGTA with 1 M NaCl
Marca de ligação com celulose	27-189	Celulose	Guanidina-HCl ou uréia > 4 M
Proteína ligante de maltose (MBP)	396	Amilose	Maltose
Glutathiona S-transferase (GST)	211	Glutathiona	5-10mM glutathiona reduzida
Tiorredoxina (TRX)	108	óxido de fenilarsina	β-mercaptoetanol

Fonte: KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, (2016). Adaptado.

As proteínas de fusão ligam-se às proteínas alvo por um sítio de reconhecimento de uma protease específica, para posterior separação, caso haja esta necessidade. Dentre os parceiros de fusão existem tanto sequências curtas de aminoácidos (tais como poli His, poli Arg, FLAG, c-Myc, Strep-tag) quanto proteínas (Tais como MBP, GST e TRX) (BUCHER; EVDOKIMOV; WAUGH, 2002; KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016) (Tabela 3).

As Proteínas ligantes de maltose (MBPs) são umas das proteínas de fusão mais utilizadas (SUN; TROPEA; WAUGH, 2011). Pertencem a uma família de proteínas periplásmicas de ligação de soluto que interagem com açúcares e aminoácidos (TAM; SAIER, 1993), envolvidas na captação de soluto ou na quimiotaxia (EVDOKIMOV et al., 2001; DIEZ et al., 2001). São grandes proteínas periplasmáticas com peso molecular na faixa dos 43 kDa, muito estáveis (RIGGS, 2000). Apesar de estar presente em vários tipos de organismos tais como *Pirococcus furiosus*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia pestis*, dentre outros; apenas as MBPs de *E. coli* vem sendo largamente utilizadas em pesquisa e desenvolvimento proteômico (HAMMARSTRÖM et al., 2002; FOX; WAUGH, 2003).

Quando utilizada no contexto de fusão, a MBP promove a solubilidade da proteína alvo demonstrando atividade intrínseca de chaperona (KAPUST; WAUGH, 1999; BACH et al., 2001; FOX; KAPUST; WAUGH, 2001). A MBP Promove o correto dobramento da proteína alvo através da sua interação com a mesma e previne a sua autoassociação. Este papel passivo da MBP no dobramento de proteínas está correlacionado com a grande área hidrofóbica exposta na sua superfície, a qual é responsável pelo contato com outras proteínas na via de transporte da maltose (KAPUST; WAUGH, 1999; FOX; KAPUST; WAUGH, 2001).

Assim, a fenda hidrofóbica da MBP é apontada como o local onde o polipeptídeo fusionado interage com o parceiro de fusão (NALLAMSETTY; WAUGH, 2007). A presença desta fenda pode explicar por que apenas certas proteínas solúveis como a MBP, por exemplo, atuam como agentes de solubilização. Mais ainda, a MBP apresenta certa flexibilidade conformacional com a fenda; assim ela pode ajustar a sua forma para acomodar uma gama de diferentes peptídeos (COSTA et al., 2014).

Existem sugestões de que a MBP funciona com uma função de chaperona, sequestrando seus intermediários dobráveis propensos à agregação, impedindo sua auto associação e consequente formação dos corpúsculos de inclusão (KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016; RARAN-KURUSSI; WAUGH, 2012; FOX; KAPUST;

WAUGH, 2001). A capacidade de promover a solubilidade de seus parceiros de fusão não é um atributo exclusivo da MBP.

Proteínas fusionadas com MBP possuem afinidade por resina de amilose imobilizada (PATTENDEN; THOMAS, 2008), mas esta ligação é altamente dependente da natureza desta mesma proteína, uma vez que a interação de ambas pode bloquear ou reduzir a interação com a amilose (PRYOR; LEITING, 1997). As dificuldades encontradas na purificação através deste método corroboram a hipótese de que as proteínas alvo interagem com a MBP através do seu local de ligação (FOX; KAPUST; WAUGH, 2001).

Para melhorar a produção de proteína solúvel, sua purificação e a recuperação da proteína nativa são utilizadas várias estratégias em conjunto com MBP, como por exemplo, a fusão 6HIS-tag-MBP (NALLAMSETTY et al., 2005).

Com relação à marcação com a HIS-tag, um polipeptídeo que consiste em diversas resíduos de histidina, um dos mais frequentemente utilizados como parceiro de fusão. Servindo para detecção, etapa única de purificação, e dependendo do número de resíduos aumentando a estabilidade na ligação com seu agente de purificação, no caso resina de metais iônicos. HIS-tag é uma pequena sequência que não causa mudança de carga elétrica da proteína associada, não interfere na sua migração durante a transferência, não interfere no dobramento correto da proteína, conseqüentemente não alterando sua função biológica após purificação (CARSON et al., 2007; CHEN; LI; YUAN, 2015).

O sistema de fusão com a HIS-tag na produção, purificação e detecção de proteínas recombinantes é utilizada em vários sistemas de expressão proteica, tais como com o uso de bactérias (ANDERSEN; LEKS; SCHWARTZ, 2013; ROBICHON et al., 2011) de levedura (COUTINHO et al., 2013), de plantas (ZVEREVA et al., 2009) e com células de mamíferos (PAJECKA et al., 2014; PRADEAU-AUBRETON et al., 2010).

Em termos comparativos, o parceiro de fusão MBP mostra ser melhor que a glutatona S-transferase (GST) (FOX; WAUGH, 2003) e que a tioredoxina (TRX) como fomentador de solubilidade (KAPUST; WAUGH, 1999).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATHOS, S. N. Production scale insect cell culture. **Biotechnology Advances**, 9:51-68, 1991.

ALMEIDA, V. M. A.; GONCALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58(2):141-148, 2006.

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A.; RODRIGUEZ, S.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. **Veterinary Microbiology**, 121:344-351, 2007.

ANDERSEN, D. C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 117–123, 2002.

ANDERSEN, K. R.; LEKSA, N. C.; SCHWARTZ, T. U. Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from Histag purification, **Proteins**, 81:1857-1861, 2013.

AUSTIN, B. P.; NALLAMSETTY, S.; WAUGH, D. S. Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Methods in Molecular Biology**, 498:157-72, 2009.v

AVRAMEAS, S.; URIEL, J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles**, 262:2543-2545, 1966.

BACH, H., MAZOR, Y.; SHAKY, S.; SHOHAM-LEV, A.; BERDICHEVSKY, Y.; GUTNICK, D. L.; BENHAR, I. *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. **Journal of Molecular Biology**, 312, 79–93, 2001.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, 10(5):411-421, 1999.

BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The fidelity of retroviral reverse transcriptases. In: **Reverse transcriptase**, 85–102, 1993.

BIRKETT, A. J.; YÉLAMOS, B.; RODRÍGUEZ-CRESPO, I.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1339(1):62-72, 1997.

BISBEE, C. A. Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, 13: 8–10, 1993.

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

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

BRASIL, 1981. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional De Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Portaria n° 200, de 18 de agosto de 1981.

BRASIL, 1992. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional De Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Portaria n° 84, de 19 de outubro de 1992. Diário Oficial da União de 22/10/1992, Seção 1, Página 14874, 1992.

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

BRASIL, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional De Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, Instrução Normativa nº 15, de 02 de Abril de 2008. Diário Oficial da União, nº 65, Seção 1, p. 2, 04.04.2008.

BUCHER, M. H.; EVDOKIMOV, A. G.; WAUGH, D. S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrinbinding protein. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 58, 392-397, 2002.

CARSON, M., JOHNSON, D. H., MCDONALD, H., BROUILLETTE, C., AND DELUCAS, L. J. Histag impact on structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 63, 295-301, 2007.

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

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

CAVALCANTI, J. M. *A Trajetória Científica de Rudolf Kraus (1894-1932) entre Europa e América do Sul*: Elaboração, produção e circulação de produtos biológicos. 2013. 284f. Tese (Doutorado em História das Ciências e da Saúde) - Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz. Rio de Janeiro. 2013.

CHEN, Z.; LI, Y.; YUAN, Q. Study the effect of Histag on chondroitinase ABC I based on characterization of enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, 78: 96-101, 2015.

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

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

CHOW, D. C.; DREHER, M. R.; TRABBIC-CARLSON, K.; CHILKOTI, A. Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in *E. coli*. **Biotechnology Progress**, 22(3): 638-646, 2006.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. **Clinical Microbiology Reviews**, 9:(1) 100-117, 1996.

COFFIN, J. M. Structure and classification of retroviruses. In: *The Retroviridae* (Ed. J.A. Levy pp. 19–49. Plenum Press, New York, 1992.

COFFIN, J. M. Retroviridae and their replication In *Virology* (ed. B.N. Fields et al.), pp. 1767–1848. **Raven Press**, New York, 1996.

COGGINS L.; NORCROSS N.L.; NUSBAUM S.R. Diagnosis of equine Infectious anaemia by immunodiffusion test. **American Journal of Veterinary Research**, 33:11-18, 1972.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anaemia. **Cornell Veterinary**, 60:330-335, 1970.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; KEMEN, M. J. The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. **Equine Infectious Diseases**, 3rd International Conference. Basel, Karger, 177–186, 1973.

COHEN, S.N.; CHANG, A.C.; BOYER, H.W.; HELLING, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70(11):3240-3244, 1973.

COOK, R. F.; COOK S. J.; ISSEL, C. J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious Anaemia. In. MAIR, T. S.; HUTCHINSON, R. E. **Equine Veterinary Journal** Cambridgeshire, 56-70, 2009.

COOK, R. F.; COOK, S. J.; BERGER, S. L.; LEROUX, C.; GHABRIAL, N. N.; GANTZ, M.; BOLIN, P. S.; MOUSEL, M. R.; MONTELARO, R. C.; ISSEL C. J. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. **Virology**, 313(2):588-603, 2003.

COOK, R. F.; ISSEL, C. J.; MONTELARO; R. C. Equine infectious anemia virus. In: Studdert R (ed.) **Viral Diseases of equines**. Amsterdam : Elsevier, 1996.

COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia vírus in 2013: A review. **Veterinary Microbiology**, 167:181–204, 2013.

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

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in: the novel Fh8 system. **Frontiers in Microbiology**, 5:63, 2014.

COUTINHO, L. C. A. Uso da proteína recombinante p26 do vírus da anemia infecciosa equina produzida em *Pichia pastoris* para testes diagnósticos, 2014. Tese, p. 110.

COUTINHO, L. C. A.; JESUS, A. L. S.; FONTES, K. F. L. P.; COIMBRA, E. C.; MARIZ, F. C.; FREITAS, A. C.; MAIA, R. C. C.; CASTRO, RS. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, 191(2):95-100, 2013.

CRAIGO J. K.; LEROUX, C.; HOWE, L.; STECKBECK, J. D.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. **Journal of General Virology**, 83(6):1353-1359, 2002.

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

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

CUDMORE, S.; RECKMANN, I.; WAY, M. Viral manipulations of the actin cytoskeleton. **Trends in Biochemical Sciences**, 5:142–148, 1997.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein and Peptide Letters Journal**, 18(2):132-142, 2011.

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

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

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

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

DIEZ, J.; DIEDERICHS, K.; GRELLER, G.; HORLACHER, R.; BOOS, W.; WELTE, W. The crystal structure of a liganded trehalose/maltose-binding protein from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* at 1.85 Å. **Journal of Molecular Biology**, 305:905-915, 2001.

DÖHNER, K.; SODEIK, B. The role of the host cytoskeleton for viral replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 285:67-108, 2005.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, 8(9): 871-874, 1971.

ESPOSITO, D.; CHATTERJEE, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:353-358, 2006.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Sistema Gastrointestinal – Seção X. In: Tratado de Medicina Interna Veterinária; Editora Manole, 4 ed., v. 2, São Paulo, p. 1663- 1666, 1997.

EVDOKIMOV, A. G.; ANDERSON, D. E.; ROUTZAHN, K. M.; WAUGH, D. S. Structural basis for oligosaccharide recognition by *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. **Journal of Molecular Biology**, 305, 891-904, 2001.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. Veterinary virology, Second Edition, Academic Press, San Diego, USA, p. 666, 1993.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes: 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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

FIORILLO, K. S. Prevalência de anemia infecciosa equina em haras de Minas Gerais. Dissertação (Programa de Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2011, 47 p.

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

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

FOX, J. D.; KAPUST, R. B.; WAUGH, D. S. Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. **Protein Science**, 10, 622–630, 2001.

FOX, J. D.; WAUGH, D. S. Maltose-binding protein as a solubility enhancer. **Methods in Molecular Biology**, 205:99-117, 2003.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C. Anemia infecciosa eqüina. **Veterinária e Zootecnia**, 18(2): 197-207, 2011.

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

GOEDDEL, D. V. Systems for heterologous gene expression. **Methods in Enzymology**. 185: 3-7, 1990.

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

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

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

GUTMAN, G. A.; HATFIELD, G. W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 86, 3699-3703, 1989.

HAMILTON, S. R.; DAVIDSON, R. C.; SETHURAMAN, N.; NETT, J. H.; JIANG, Y.; RIOS, S.; BOBROWICZ, P.; STADHEIM, T. A.; LI, H.; CHOI, B. K.; HOPKINS, D.;

WISCHNEWSKI, H.; ROSER, J.; MITCHELL, T.; STRAWBRIDGE, R. R.; HOOPES, J.; WILDT, S.; GERNGROSS, T. U. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. **Science**, 313(5792):1441-1443, 2006.

HAMMARSTRÖM, M., HELLGREN, N., BERG, S. V. D., BERGLUND, H. AND TORLEIF HÄRD. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. **Protein Science**, 11(2): 313–321, 2002.

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

HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; DE SOUZA, M. C. C.; GOTTI, T.; FERREIRA, F.; HOMEM, V. S. F.; NETO, J. S. F.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; CUNHA, E. M. S.; RICHTZENHAIN, L. J. Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 39(1), São Paulo, 2002.

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

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

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464p.

HODGSON, J. Expression systems: a user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. **Biotechnology**, 11(8):887-893, 1993.

HUSSAIN, K.A.; ISSEL, C.J.; RWAMBO, P.M.; ARNIZAUT, A.B.; BALL, J.M.; SCHMORR, K.L; MONTELARO, R.C. Identification of gag precursor of equine infectious

anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26. **Journal of General Virology**, 69: 1719–1724, 1988.

IKEMURA, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. **Molecular Biology and Evolution**, 2:13-34, 1985.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses - The Online (10th) Report of the ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/. Acesso em: 07 de Setembro de 2017.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasts. **Revue Scientifique Et Technique**, 34(2):513-23, 2015.

ISSEL, C. J., COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 74 (7): 727-733, 1979.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H.; HOROHOV, D. W. Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 30(3):561-577, 2014.

JACQUET, A.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; CHAUDOIR, S.; BOLLEN, A.; BIEMANS, R. Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. **Protein Expression and Purification**, 17 (3): 392-400, 1999.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67(3):289-298, 2005.

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

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

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

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. **National Institute of Animal Health Quarterly**, 16:8-15, 1976.

KOSOBOKOVA, E. N.; SKRYPNIK, K. A.; KOSORUKOV, V. S. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. **Biochemistry (Moscow)**, 81(3):187-200, 2016.

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

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**, 25:485-512, 2004.

LIAN, J.; DING, S.; CAI, J.; ZHANG, D.; XU, Z.; WANG, X. Improving aquaporin Z expression in *Escherichia coli* by fusion partners and subsequent condition optimization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 82:463-470, 2009.

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

LICHTENSTEIN, D. L.; RUSHLOW, K. E.; COOK, R. F.; RAABE, M. L.; SWARDSON, C. J.; KOCIBA, G. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Replication in vitro and in vivo of

an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. **Journal of Virology**, 69:2881–2888, 1995.

LILIE, H.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, 9: 497-501, 1998.

LIM, W. S.; PAYNE, S. L.; EDWARDS, J. F.; KIM, I.; BALL, J. M. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. **Virology**, 332(1):295-306, 2005.

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

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, 60(3):512-38, 1996.

MALMQUIST, W. A.; BARNETT, D.; BECVAR, C. S. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. **Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung**, 42: 361-370, 1973.

MAPA, 2016. LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016.

MARTINEZ, A.; KNAPPSKOG, P. M.; OLAFSDOTTIR, S.; DØSKELAND, A. P.; EIKEN, H. G.; SVEBAK, R. M.; BOZZINI, M.; APOLD, J.; FLATMARK, T. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. **Biochemical Journal**, 2:589-597, 1995.

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

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

MAURY, W.; THOMPSON, R. J.; JONES, Q.; BRADLEY, S.; DENKE, T.; BACCAM, P.; SMAZIK, M.; OAKS, J. L. Evolution of the Equine Infectious Anemia Virus Long Terminal Repeat during the Alteration of Cell Tropism. **Journal of Virology**, 79 : 5653-5664, 2005.

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

MCCLURE, J. E.; LAMERIS, N.; WARA, D. W.; GOLDSTEIN, A. L. Immunochemical studies on thymosin: Radioimmunoassay of thymosin alpha 1. **Journal of Immunology**, 128: 368-372, 1982.

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

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

MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In *The Viruses*, vol. 2, Retroviridae, pp. 257–360. Edited by J. A. Levy. New York : Plenum. 1993.

MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C. J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. **Journal of Biological Chemistry**, 16:10539–10544, 1984.

MURPHY FA, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, STUDDERT MJ. *Veterinary Virology*. 3^o ed. San Diego: Academic Press, 1999. 629 p.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (editors) (1995). *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vienna & New York : Springer-Verlag.

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

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

NAKAJIMA, H.; TAJIMA, M.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. III. Purification and electron microscopic observation of the virus. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, 28:348-360, 1969.

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

NAKANE P. K.; PIERCE, G. B. Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 14(12):929-31, 1966.

NALLAMSETTY, S.; AUSTIN, B. P.; PENROSE, K. J.; WAUGH, D. S. Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His(6)-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. **Protein Science**, 14, 2964–2971, 2005.

NALLAMSETTY, S.; WAUGH, D. S. Mutations that alter the equilibrium between open and closed conformations of *Escherichia coli* maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 364, 639–644, 2007.

NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SCICLUNA, M. T. Evaluation of six serological ELISA kits available in Italy as screening tests for equine infectious anaemia surveillance. **BMC Veterinary Research**, 13:105, 2017.

NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SIMULA, M.; SCICLUNA, M. T. Validation according to OIE criteria of a monoclonal, recombinant p26-based, serologic competitive enzyme-linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 28(2):88-97, 2016.

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**, 29:165-167, 2007.

NYGREN, P. A.; STAHL, S.; UHLEN, M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing, **Trends in Biotechnology**, 12, 184-188, 1994.

OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. B. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **Journal of Virology**, 72: 7263–7269, 1998.

OIE, 2013. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.5.6. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf. Acesso em: 17 de Setembro de 2017.

OIE, 2017. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia. Detailed country (ies) disease incidence. Number of new outbreaks reported. Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail. Acesso em: 28 de julho de 2017.

OIE, 2017. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>. Acesso em: 14 de Agosto de 2017.

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

OSMAN, A.; TZORTZIS, G.; RASTALL, R.; CHARALAMPOPOULOS, D. High yield production of a soluble bifidobacterial β -galactosidase (BbgIV) in *E. coli* DH5 α with improved catalytic efficiency for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61(9): 2213-2223, 2013.

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

PACHECO, B.; CROMBET, L.; LOPPNAU, P.; COSSAR, D. A. Screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Protein Expression and Purification**, 81: 33-41, 2012.

PAJECKA, K.; NIELSEN, C. W.; HAUGE, A.; ZAGANAS, I.; BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; PLAITAKIS, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. Glutamate dehydrogenase isoforms with N-terminal (His)₆- or FLAG-tag retain their kinetic properties and cellular localization. **Neurochemical Research**, 39, 487-499, 2014.

PARÉ, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 68:254-258, 2004.

PATTENDEN, L. K.; THOMAS, W. G. Amylose affinity chromatography of maltosebinding protein: purification by both native and novel matrix-assisted dialysis refolding methods, **Methods in Molecular Biology**, 421, 169-189, 2008.

PAYNE, S. L.; PEI, X. F.; JIA, B.; FAGERNESS, A.; FULLER, F. J. Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, 78:2478-2485, 2004.

PAYNE, S. L.; LA CELLE, K.; PEI, X. F.; QI, X. M.; SHAO, H.; STEAGALL, W. K.; PERRY, S.; FULLER, F. Long terminal repeat sequences of equine infectious anaemia virus are a major determinant of cell tropism. **Journal of General Virology**, 80 (3):755-759, 1999.

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**, 78:239-245, 2007.

PLOUBIDOU, A.; WAY, M. Viral transport and the cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, 13(1):97-105, 2001.

PRADEAU-AUBRETON, K.; RUFF, M.; GARNIER, J-M.; SCHULTZ, P.; DRILLIEN, R. Vectors for recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia virus Ankara. **Analytical Biochemistry**, 404, 103-105, 2010.

PRYOR, K. D.; LEITING, B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double- affinity fusion system. **Protein Expression and Purification**, 10:309-319, 1997.

QIU, J. Protein expression systems. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, 18: 17–40, 1998.

RADER, R. Expression Systems for Process and Product Improvement. A Perspective on Opportunities for Innovator and Follow-On Product Developers. **BioProcess International**, 6:4-9, 2008.

RARAN-KURUSSI, S.; WAUGH, D. S. The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltosebinding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. **PLoS One**, 7(11): e49589, 2012.

REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. A.; FERRAZ, I. B. F.; CARVALHO, A. F.; KROON, E. G.; FERREIRA, P. C. P.; LEITE, R. C. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. **Journal of Virological Methods**, 180:62–67, 2012.

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

RIGGS, P. Expression and Purification of Recombinant Proteins by Fusion to Maltose-Binding Protein. **Molecular Biotechnology**, 15, 51-63, 2000.

ROBICHON, C.; LUO, J.; CAUSEY, T. B.; BENNER, J. S.; SAMUELSON, J. C. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* proteincontamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, 77:4634-4646, 2011.

SALINOVICH, O.; PAYNE, S. L.; MONTELARO, R. C.; K A HUSSAIN, K. A.; ISSEL, C. J.; SCHNORR, K. L. Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine infectious anemia virus during persistent infection. *Journal of Virology*, 1: 71-80, 1986.

SANTOS, E. M.; MOTTA, P. M. C.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63(2), 2011.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65(4): 363-72, 2004.

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

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

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

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

SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F.; CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, A. Frequência de anemia infecciosa equina em equinos nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará durante o ano de 2010. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 50(1):12-17, 2013.

SILVA, R. A. M. S.; BARROS, A. T. M.; COSTA NETO, A. A.; LOPES, N.; CORTADA, V. M. C.; MATSUURA, T. M. S. M.; FELDENS, O.; MORI, A. E.; MADUREIRA, J.; SANTOS, S. A. A. P.; BANDINI, O. 2004. Programa de prevenção e controle da anemia infecciosa equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense. Documentos 68, Embrapa Pantanal, Corumbá. 17p.

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

SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal . Embrapa Pantanal, Circular Técnica 29, Corumbá, 32 pp.

SINGHA, H.; GOYAL, S. K.; MALIK, P.; KHURANA, S. K.; SING, R. K. Development, evaluation, and laboratory validation of immunoassays for the diagnosis of equine infectious anemia (EIA) using recombinant protein produced from a synthetic p26 gene of EIA virus. **Indian Journal of Virological**, 24(3):349-356, 2013.

SIVASHANMUGAM, A.; MURRAY, V.; CUI, C.; ZHANG, Y.; WANG, J.; QIANQIAN, L. I. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science**, 18(5):936-948, 2009.

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

SMITH, G. A.; ENQUIST, L. W. Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of mammalian cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 18:135-161, 2002.

SODEIK, B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. **Trends in Microbiology**, 8:465-472, 2000.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, 4(1):1, 2005.

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

SOUTULLO, A.; VERWIMP, V.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. **Veterinary Microbiology**, 79:111-121, 2001.

SPIRIDONOVA, V. A.; LYGINA, A. S.; ANOHINA, M. M.; TUPITSYN; N. N. **Preparation of functionally active recombinant human interleukin-6. Biochemistry-Moscow**, 72(4):424-429, 2007.

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

SUN, P.; TROPEA, J. E.; WAUGH, D. S. Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidinetagged maltosebinding protein as a fusion partner, **Methods in Molecular Biology**, 705, 259-274, 2011.

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

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

TAJIMA, M.; NAKAJIMA, H.; ITO, Y. Electron microscopy of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, 4:521-527, 1969.

TAM, R.; SAIER, M. H. JR. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **Microbiology Reviews**, 57(2):320-346, 1993.

TELESNITSKY, A.; GOFF, S. P. Strong stop strand transfer during reverse transcription. In: Skalka AM, Goff SP, editors. *Reverse Transcriptase*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993. pp. 49-83, 1993.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 72:211-223, 2006.

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

TOMA, B. Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée. **Recueil de Médecine Veterinaire**, 156: 55-63, 1980.

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

TRABBIC-CARLSON; K.; MEYER, D. E.; LIU, L.; PIERVINCENZI, R.; NATH, N.; LABEAN, T.; CHILKOTI, A. Effect of protein fusion on the transition temperature of an

environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity? **Protein Engineering, Design and Selection**, 17(1):57-66, 2004.

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

TUMAS, D. B.; HINES, M. T.; PERRYMAN, L. E.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. 1994. Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses. **Journal of General Virology**, 75(5): 959-68.

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

VAN WEEMEN, B. K.; SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 15 (3):232-236, 1971.

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

WALTHER, J.; GODAWAT, R.; HWANGA, C.; ABE, Y.; SINCLAIR, A.; KONSTANTINOVA, K. 2015. The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production. **Journal of Biotechnology**, 213:3–12.

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

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

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

WIDE, L.; PORATH, J. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 130(1):257-260, 1966.

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

WROTNOWSKI, C. Animal cell culture; novel systems for research and production. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, 18(3):13-37, 1998.

WU, G.; ZHENG, Y.; QURESHI, I.; ZIN, H. T.; BECK, T.; BULKA, B.; FREELAND S. J. SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. **Nucleic Acids Research**, 35:76-79, 2007.

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J.; LI, F.; MONTELARO, R. C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102: 9918-9923, 2005.

ZVEREVA, A. S.; PETROVSKAYA, L. E.; RODINA, A. V.; FROLOVA, O. Y.; IVANOV, P. A.; SHINGAROVA, L. N.; KOMAROVA, T. V.; DOROKHOV, Y. L.; DOLGIKH, D. A.; KIRPICHNIKOV, M. P.; ATABEKOV, J. G. Production of biologically active human myelocytokines in plants. **Biochemistry (Mosc)**, 74(11):1187-1194, 2009.

1

4. ARTIGO CIENTÍFICO

ELISA e IDGA para diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina empregando p26 fusionada à proteína ligante de maltose - MBP

Karin Florencio Lins de Paiva Fontes¹, Luiz Cosme da Silva Júnior¹, André Luiz Santos de Jesus², Sérgio Alves Do Nascimento¹, Daniel Praseres Chaves³, José Wilton Pinheiro Junior¹
Antonio Carlos de Freitas², Roberto Soares de Castro^{1,*}

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

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

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

***Autor para correspondência:**

Roberto Soares de Castro. Email: robertosoarescastro@gmail.com

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE.
Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n-Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900, Brasil.

¹ Artigo formatado para a revista *Journal of Virological Methods*

Resumo

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus da família Retroviridae e é considerada uma das viroses mais importantes em equinos no mundo. É uma infecção crônica, sem tratamento, prevalente em regiões de clima quente e úmido favorável à transmissão por insetos hematófagos. O diagnóstico da doença normalmente é realizado através da detecção de anticorpos circulantes nos testes IDGA e ELISA. Visando aumentar a produção proteica e melhorar o desempenho dos testes sorológicos, a sequência do gene p26 do vírus AIE foi otimizada com relação aos códons preferenciais para uso em *E. coli* e fusionada à proteína ligante de maltose (MBP). A proteína de fusão recombinante resultante (p26rec) foi detectada por SDS- PAGE e Western blot com anticorpo monoclonal anti-HIS. A p26rec do VAIE foi utilizada como antígeno no desenvolvimento e avaliação de uma IDGA e um ELISA (IDGArec e ELISAreC) para o diagnóstico da AIE. Para avaliação da sensibilidade analítica (SeA), limite de detecção, foi empregado o soro padrão OIE, enquanto que para avaliação da especificidade analítica (SpA) foram testados soros de 32 equinos vacinados contra Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza Equina (três cepas), Herpesvírus equino tipos 1 e 4, tétano e 13 serovares de *Leptospira interrogans*, bem como de sete equinos vacinados contra garrotilho. Na IDGArec o antígeno p26rec apresentou linha de identidade única quando testado frente ao soro de referência, reagindo até o limite de detecção preconizado pela OIE; não foram observadas reações inespecíficas nos testes dos soros dos animais vacinados. No ELISAreC o ponto de corte, definido com base na análise da Curva ROC (Receiver Operating Characteristic), foi $PP > 29,51$, com área sob a curva de 1,00 (IC 95%, de 0,99 a 1,00; $p < 0,0001$) o que corresponde ao desempenho de um teste de acurácia quase perfeita em relação à IDGA. Sob essas condições, o soro de referência OIE reagiu positivamente, já os soros dos animais vacinados reagiram negativamente. As características diagnósticas (SeD e SpD) dos testes IDGArec e ELISAreC foram avaliadas em relação a 288 soros positivos e 281 negativos na IDGA realizada com antígeno comercial. Para o IDGArec ambas a SeD e a SpD foram de 100% e para o ELISAreC foram de 100% e 99,6% respectivamente. Os resultados encontrados demonstram o alto grau de confiança obtido com a p26rec nos testes IDGArec e ELISAreC, podendo assim ser recomendados para o diagnóstico sorológico da AIE.

Palavras-chave: Sistema de expressão heterólogo, antígeno recombinante, proteína ligante de maltose, lentivírus.

Introdução

A Anemia Infeciosa Equina (AIE) é uma das doenças infecciosas mais importantes que afeta equídeos, com distribuição quase mundial, especialmente em regiões úmidas e montanhosas de clima tropical e subtropical, onde existem grande diversidade e abundância de vetores (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013). A AIE faz parte da lista de doenças da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2017a).

Causada por um retrovírus envelopado (vírus da AIE - VAIE), pertencente à família Retroviridae, gênero Lentivírus, a AIE se propaga principalmente através do movimento de animais portadores, geralmente assintomáticos (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013). Nas criações endêmicas, o VAIE é transmitido por insetos hematófagos, principalmente tabanídeos, e fômites contaminados com o vírus (ISSEL; FOIL, 2015).

A AIE é caracterizada por infecção persistente, que evolui desde quadros assintomáticos a agudos, subagudos ou crônicos, com episódios febris recorrentes, trombocitopenia, anemia, perda de peso e edema das partes inferiores do corpo. Os animais que sobrevivem aos ataques clínicos agudos evoluem a um estado crônico com infecção inaparente (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Como não existem vacinas nem tratamento específico para a AIE, o controle da doença é feito pelo isolamento ou eliminação de animais positivos, geralmente detectados por testes sorológicos (ISSEL et al., 2014). Os testes recomendados pela OIE para diagnóstico da AIE são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (teste de Coggins) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Amostras positivas no ELISA devem ser reanalisadas na IDGA para confirmação do diagnóstico, pois resultados falsos positivos têm sido observados no ELISA (OIE, 2017b). Atualmente tem sido proposta a inclusão do Western blot como teste confirmatório no caso de divergência entre os resultados do ELISA e da IDGA (ISSEL et al., 2014).

A estrutura antigênica do VAIE é formada por duas glicoproteínas (gp) do envelope, gp 90 (superfície) e gp 45 (transmembranar), e quatro proteínas estruturais, p15, p26 (core), p11 e p9 (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013). O principal antígeno empregado nos testes de IDGA e ELISA para diagnóstico da AIE é a p26 (OIE, 2017b), pois é a proteína mais abundante da partícula viral, alvo de intensa resposta imunológica do hospedeiro, é altamente conservada entre as diferentes amostras virais e é antigenicamente mais estável do que as gp (MONTELARO et al., 1984). Os animais infectados apresentam anticorpos anti-p26 entre 10

e 14 dias após a infecção, atingindo um pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observado para gp90 (MONTELARO; BALL; RUSHLOW, 1993).

Para fins diagnósticos a p26 foi inicialmente produzida a partir de baço de equino naturalmente infectado (COGGINS; NORCROSS, 1970) e, posteriormente, de cultura de leucócitos equinos (NAKAJIMA; KONO; USHIMI, 1971). Malmquist, Barnett e Becvar, em 1973 utilizaram além de cultura de células de leucócitos equina, células de baço embrionário equino e de pele equina; Já Montelaro et al. em 1984 usaram células de rim equino fetal e Bouillant et al. em 1986, célula timo canina. cultivo de células. Mais recentemente, como peptídeos sintéticos (BALL et al., 1992; SOUTULLO et al., 2001) ou proteínas recombinantes, produzidas em sistemas de expressão heterólogos, como *Escherichia coli* (ARCHAMBAULT et al., 1989; ALVAREZ et al., 2007; PIZA et al., 2007), células de inseto (KONG et al., 1997) e *Pichia pastoris* (COUTINHO et al., 2013).

A solubilidade e a estabilidade proteica são aspectos importantes na produção, purificação, formulação e armazenamento de proteínas recombinantes. (JOSEPH et al., 2015). A expressão de proteínas fusionadas possibilitam simplificar os procedimentos de purificação, aumentar a expressão e solubilidade da proteína desejada, facilitar o dobramento protéico, bem como prevenir a proteólise (KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016). Uma das proteínas de fusão frequentemente empregada é a proteína de ligação à maltose (MBP), que atua aumentando a produção, solubilidade e estabilidade da proteína recombinante (DE MARCO et al., 2004; COSTA et al., 2014; WALPER et al., 2014; KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um IDGA e um ELISA para diagnóstico da AIE, empregando p26 recombinante fusionada à MBP produzida em *E. coli*.

Material e métodos

Síntese e clonagem do gene p26 do VAIE para expressão em *E. coli*

A sequência do gene sintético foi desenhada com base na sequência do gene p26 selvagem da cepa viral Wyoming (GeneBank – N° de acesso NC_001450), com otimização dos códons preferenciais utilizados por *E. coli* e do seu conteúdo GC, e acréscimo de poli-HIS (seis histidinas) na porção C-terminal para posterior detecção e purificação. O gene foi sintetizado pela Epoch Biolabs (Texas, EUA) e fornecido no plasmídeo pBluescript II SK(-).

O gene sintético foi modificado por PCR para inserir terminais de restrição das enzimas *EcoRI* e *BamHI* visando sua ligação ao vetor de expressão pMAL-c4x (New England Biolabs), após digestão com essas enzimas. A construção obtida foi empregada na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α . As células transformadas foram semeadas em placas de meio de cultura sólido Luria-Bertani (LB) acrescido de ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ e incubadas a 37°C, por 16 horas para crescimento dos transformantes, resistentes ao antibiótico.

As células de *E. coli* transformadas foram analisadas para verificar a correta inserção do gene, por meio da digestão com *EcoRI* e *BamHI* e posterior sequenciamento, realizado com o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1.

Transformação de *E. coli* e produção da proteína p26rec

A construção plasmidial extraída de células *E. coli* DH5 α , foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL-21 Star (Invitrogen) visando a produção da proteína recombinante. Colônias recombinantes, selecionadas pela resistência à ampicilina, foram cultivadas em meio LB à 37 °C, para produção proteica em maior escala. A indução da expressão gênica foi feita com Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,2 mM durante 4 horas a 25 °C. O cultivo foi centrifugado a 5.500 x g durante 20 minutos a 4 °C, o pellet foi ressuscitado em 25 mL de tampão fosfato salino (PBS) com 10 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), e sonicado, por seis ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto. Após centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante, contendo p26rec, foi recolhido e estocado a -20 °C.

Purificação e clivagem da proteína p26rec

A proteína p26rec foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel (QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System, Qiagen). A proteína p26rec foi clivada pela digestão com o fator Xa (New England Biolabs) como protease para separação da MBP da p26 ligada a Poli-HIS.

SDS-PAGE e Western blot

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com o método de O'Farrell (1975). As amostras proteicas foram acrescidas de tampão de amostra Laemmly 2X. As amostras fervidas por 8 minutos foram aplicadas no gel. O gel de empilhamento foi de acrilamida a 4% e o gel de corrida a 15%. Os géis foram corados com Azul de Coomassie

(Sigma). Para o Western blot, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, foi realizado um bloqueio da membrana com leite em pó desnatado (LPD) em tampão PBS. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-HIS conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:3.000 em PBS, seguido da adição do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/azul nitro tetrazólio (NBT-BCIP).

Quantificação proteica

A concentração da proteína purificada foi calculada a partir da intensidade de cada banda, em gel de poliacrilamida, comparativamente à intensidade de bandas de albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL, através do programa Kodak[®] Digital Science 1D Image Analysis Software (Kodak).

Avaliação da estabilidade da p26rec

A p26rec foi estocada a 4 °C e avaliada para verificação de sua estabilidade de longa duração – 3 anos. Ao final deste período a p26rec foi submetida a um estresse térmico, por aquecimento a 70°C por 30 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo por 10 minutos e centrifugação por 12.000 x g por 10 minutos (DE MARCO, 2004). Em seguida, o sobrenadante foi titulado no ELISA.

IDGArec

A IDGA foi realizada conforme recomendação do Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres (OIE, 2017b), em placa de petri empregando-se agarose 1% (p/v) em solução tampão borato de sódio (108 mM, pH 8,6) e 25 µL do antígeno e dos soros controle positivo e testes. O antígeno p26rec foi titulado em diluições duplas frente ao soro padrão OIE (Laboratory for Equine Diseases/ANSES - French agency for food, environmental and occupational health safety) e usado como duas unidades precipitantes (1 UP = maior diluição que reagiu positivamente com o soro OIE).

Como controles negativo e positivo foram utilizados pool de cinco soros equinos negativos e positivos, respectivamente, definidos através da IDGA. O soro controle positivo foi titulado, em diluições duplas, frente ao antígeno previamente titulado.

ELISAreC

Para a padronização do ELISAreC, a concentração do antígeno e diluições dos soros foram definidas de forma a se obter as melhores condições de diferenciação entre soros positivos e negativos. Foram utilizados como controles negativo e positivo os mesmos soros

da IDGA. O antígeno foi diluído seriadamente (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600) e titulado frente às diluições dos soros (1/50, 1/100 e 1/200). O conjugado de proteína G - peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado na diluição de 1/100.000.

Para o teste ELISA, placas de poliestireno foram sensibilizadas com o antígeno p26rec diluído 1/800, e incubadas a 37 °C por 2 h. Foram realizadas três lavagens com PBS-0,1% tween 20 (PBS-T) e as placas foram incubadas a 37 °C por 1 h com 200µL de PBS-4% LPD para bloqueio, e lavadas três vezes com PBS-T. As amostras de soro foram diluídas 1/100 em PBS-2% LPD, e incubadas a 37 °C por 1 h, e foram distribuídos 100µL em cada poço, seguindo de incubação a 37 °C por 1 h. Após novas lavagens com PBS-T, 100µL do conjugado de proteína G - peroxidase diluído 1/100.00 foram distribuídos por poço e as placas incubadas a 37 °C por 45 min e posteriormente lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, 50µL de TMB (Sigma-Aldrich®) por 5 min e interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada com espectrofotômetro a 450nm. O controle de qualidade das placas é representado pela adição em cada uma das mesmas dos controles internos, representados pelo soro controle positivo (SCP), soro controle negativo (SCN) e pelo branco da reação.

Para avaliação da sensibilidade analítica (SeA) da IDGA, limite de detecção, foi empregado o soro padrão OIE (2x concentrado, 1x e diluído 1:2), enquanto que para avaliação da especificidade analítica (SpA) da IDGA e do ELISA foram testados soros de 32 equinos vacinados contra Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza Equina (três cepas), Herpesvírus equino tipos 1 e 4, tétano e 13 serovares de *Leptospira interrogans*, bem como de sete equinos vacinados contra garrotilho.

O número mínimo de amostras positivas ($n = 239$) e negativas ($n = 239$) necessário para estimativa da sensibilidade (SeD) e da especificidade (SpD) diagnósticas da IDGArec e do ELISAreC, relativamente à IDGA comercial, foi determinado conforme a fórmula $n \geq z^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (BANO et al., 2010), considerando: $z = 2,58$ para 99% de intervalo de confiança; $p = 0,90$ (para 90% de SeD e SpD); $e = 0,05$ (5% de erro). Foram utilizadas 288 soros equinos positivos e 281 negativos para AIE, previamente submetidos à IDGA para diagnóstico da AIE, conforme preconizado pelo Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (BRASIL, 1992), empregando kit comercial (Bruch).

Para a coleta dos soros controle positivos utilizados neste trabalho foi formado processo junto ao comitê de ética no uso animais (CEUA) da UFRPE de número 011680/2011-DO3.

A SeD e SpD da IDGArec e do ELISArec foram calculadas relativamente aos resultados da IDGA comercial, como: $Se = a/(a + c)$; $Sp = d/(b + d)$; a = número de animais verdadeiro positivos, b = número de animais falso positivos; c = número de animais falso negativo; d = número de animais verdadeiro negativo (BANOO et al., 2010).

O resultado de cada amostra testadas no ELISArec, em DO, foi convertido em percentagem de positividade (PP), calculada relativamente à densidade ótica do Soro Controle Positivo (100%), de acordo com o consenso definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS/FAO) e Agência Internacional de Energia Nuclear (IAEA) para expressão de resultados de ELISA indireto (WRIGHT et al., 1993).

O ponto de corte do ELISArec foi determinado por meio da análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (METZ, 1978; ZWEIG; CABELL, 1993) considerando o valor da pp que resultou em SeD e SpD máximas, e, conseqüentemente maior índice de Youden (YOU DEN, 1950) e maior área sob a curva ROC (ZHOU et al., 2002).. A análise da curva ROC bem como o gráfico de dispersão dos soros testes foram realizadas empregando o software MedCalc (MedCalc Statistical Software version 17.6). Os resultados estão apresentados com 95% de intervalo de confiança.

Resultados

Clonagem do gene p26 do VAIE e produção da p26rec em *Escherichia coli*

O gene p26 do vírus da AIE foi sintetizado com otimização dos códons para expressão em *E. coli*. Com base no sequenciamento dos clones, a diferença no códon usage foi diminuída de 35,14% para 12,81%, através da otimização da sequência do gene p26.

Em seguida, o gene sintético foi clonado no vetor pMAL-c4X. A proteína recombinante p26rec, apresenta a proteína p26do VAIE no centro, a MBP na porção N-terminal e poli-HIS na porção C-terminal, com peso molecular total previsto de 68,5 KDa. A análise da p26rec revelou, em gel SDS-PAGE, a presença de bandas correspondentes ao peso esperado, no extrato proteico de culturas de *E. coli* induzidas (Figuras 1 e 2).

Após a purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel, uma proteína de aproximadamente 70 KDa foi detectada nas cinco frações de eluição, com maiores concentrações proteicas nos dois primeiros eluatos (Figura 3). A clivagem dessa proteína com o fator Xa resultou, em gel SDS-PAGE, em duas bandas mais intensas correspondentes à proteína p26 e à MBP, aproximadamente com 26 kDa e 42,5 kDa, respectivamente (Figura 4).

A quantificação da proteína p26rec purificada pela resina de níquel demonstrou rendimento de 2 mg/mL de cultura.

Estabilidade proteica da p26rec

A p26rec demonstrou possuir estabilidade a 4 °C durante o período avaliado de três anos, mantendo sua imunoreatividade e títulos na IDGArec e no ELISArec. Após ser submetida a 70 °C ocorreu redução na DO de 0,73 para 0,29, na diluição de trabalho do ELISArec (1:800).

Padronização e avaliação da sensibilidade (SeA) e da especificidade (SpA) analíticas dos testes com antígeno p26rec (IDGArec e ELISArec)

Após as devidas titulações na IDGA o antígeno p26rec apresentou linhas de identidade únicas quando testado frente ao soro de referência OIE, reagindo até o limite de detecção preconizado pelo Laboratório de Referência da OIE. Adicionalmente, não foram observadas reações inespecíficas do antígeno p26rec no teste dos soros de equinos vacinados contra Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza Equina (3 cepas), Herpesvírus equino tipos 1 e 4, tétano e 13 serovares de *Leptospira interrogans*, diferente do que foi observado na IDGA de parte dos animais vacinados quando testados com o antígeno comercial, onde houve a formação de diversos padrões de linhas inespecíficas (Figura 4). Os soros de equinos vacinados contra garrotilho não mostraram reações inespecíficas em ambos os testes de IDGA.

O ELISArec foi padronizado por titulações do antígeno e soros de forma a se obter a maior relação DO de soros positivos/DO de soros negativos. O antígeno foi empregado na diluição de 1:800 e soro 1:100 e conjugado 1:100.000. O ponto de corte do ELISArec, definido com base na análise da Curva ROC, foi $PP > 29,51$ (Figura 5- A e B), com área sob a curva de 1,00 (IC de 0,99 a 1,00; $p < 0,0001$) e índice de Youden de 0,99. Sob essas condições, o soro de referência OIE reagiu positivamente, já os soros dos animais vacinados reagiram negativamente.

Avaliação da sensibilidade (SeD) e da especificidade (SpD) diagnósticas dos testes com antígeno p26rec (IDGArec e ELISArec)

As características diagnósticas (SeD e SpD) dos testes IDGArec e ELISArec foram avaliadas tomando como referência os resultados obtidos com a IDGA realizada com antígeno comercial. A IDGArec apresentou 100% de SeD e 100% de SpD relativas. Todos os 288

soros positivos na IDGA comercial mostraram resultados positivos no ELISArec, enquanto que dos 281 negativos, 280 foram negativos e um positivo no ELISArec, correspondentes a SeD de 100,00% (IC de 98,7 a 100,0%) e SpD de 99,64% (IC de 98,0% a 100,0%).

Discussão

O processo de produção da p26 para diagnóstico da AIE tem evoluído consideravelmente, sobretudo com os avanços da tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a produção de proteínas em sistemas de expressão heterólogos (JANA; DEB, 2005). O sistema escolhido foi a bactéria *E. coli* devido ao baixo custo e facilidade de cultivo em alta densidade, possuindo também uma genética bem conhecida e um grande número de ferramentas disponíveis, como, por exemplo, linhagens modificadas e vetores de expressão (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Alguns autores utilizaram esse sistema para produção da proteína p26 do VAIE empregando gene nativo (ALVAREZ et al, 2007; PIZA et al, 2007) ou sintético (SINGHA et al., 2013). Neste trabalho foi utilizado gene sintético com otimização de códons para uso em *E. coli* e a fusão com a proteína MBP.

O emprego da tecnologia de síntese de genes permite a realização de modificações nas sequências dos genes nativos e sua expressão sem necessidade de manipular agentes infecciosos. O gene p26 do VAIE foi sintetizado com os códons mais comumente utilizados por *E. coli*, para maximizar sua expressão. Isto pode ter contribuído para o alto rendimento dos cultivos, com produção de cerca de 2 mg de proteína recombinante/mL de cultura bacteriana induzida, comparado aos trabalhos anteriores, que clonaram o gene sem otimização dos códons e obtiveram de 0,01 a 0,1 mg/mL de cultura (ALVAREZ et al., 2007; SINGHA et al., 2013).

Deve-se considerar, também, como fator favorável ao elevado rendimento da p26rec a sua fusão com MBP, que tem ação de chaperona, com incremento da solubilidade da proteína fusionada, proteção contra proteólise intracelular e, conseqüentemente, maior rendimento da proteína de interesse (KAPUST; WAUGH, 1999; BACH et al., 2001; NOMINE et al., 2001; FOX; WAUGH, 2003; GOH et al., 2003; PLANSON et al., 2003; KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016). A estabilidade proteica é um dos aspectos mais importantes na produção e armazenamento de proteínas recombinantes (JOSEPH et al., 2015). Em estudo anterior, a p26 expressa em *P. pastoris* fusionada a poli-HIS (COUTINHO et al., 2013) apresentou baixa estabilidade a 4 °C. Já a p26rec tem se mostrado altamente estável, pois tem mantido alto título (1:800), conservada a 4 °C há mais de três anos, no mesmo

tampão empregado por Coutinho et al. (2013). A estratégia de expressar a p26 fusionada à MBP, além da poli-HIS, deve ter influenciado na sua estabilização, pois tem sido demonstrado que proteínas fusionadas à MBP mantêm atividade mesmo após tratamento térmico de 70 °C.

Nesse estudo, a p26rec foi engenheirada para permitir a purificação por cromatografia de afinidade, empregando-se colunas com resina de amilose ou de níquel, com afinidade à MBP e à histidina, respectivamente. A MBP é uma grande proteína periplasmática (43 kDa) altamente solúvel de *E. coli* que atua como um potenciador de solubilidade (KAPUST; WAUGH, 1999; FOX; KAPUST; WAUGH, 2001). O Motivo mais convincente para escolher MBP como de parceiro fusão, ao invés de alguma outra marca de afinidade, é a sua notável capacidade de aumentar a solubilidade de seus parceiros de fusão (KAPUST; WAUGH, 1999). A purificação da p26rec utilizando resina de amilose resultou em baixa taxa de recuperação. Isto corrobora a hipótese de que certas proteínas alvo interagem com a MBP através do seu sítio de ligação (FOX; KAPUST; WAUGH, 2001). Em contrapartida, a purificação utilizando a resina de níquel mostrou alta taxa de recuperação da p26rec. Assim, deduz-se que a fusão à MBP promoveu a produção de proteína solúvel, e que a fusão à poli-HIS foi útil para a purificação e a recuperação da p26rec, conforme a estratégia definida com base em Nallamsetty et al. (2005).

Apesar dos avanços obtidos com a PCR a sorologia continua sendo a única opção viável para diagnóstico da AIE (ISSEL et al., 2014). Ainda não foi demonstrado se as técnicas baseadas em PCR são sensíveis o suficiente para detectar os níveis extremamente baixos de ácidos nucleicos específicos do VAIE presentes em alguns animais portadores assintomáticos, nem se os primers (e ou sondas) utilizadas nestes ensaios estão localizados em regiões altamente conservadas do genoma do vírus, bem como se variações nessas sequências alterariam a sensibilidade de detecção do VAIE. O teste empregado na maioria dos países é a IDGA, porém em alguns países tem sido adotado o ELISA, geralmente associado à IDGA como teste confirmatório, conforme preconizado pela OIE (2017b). Por isto, o antígeno p26rec foi produzida com a finalidade de uso nos testes de IDGArec e ELISArec, que foram avaliados quanto às características analíticas e diagnósticas, conforme preconizado pela OIE (2017b).

O antígeno p26rec apresentou na IDGArec linhas de identidade semelhantes ao antígeno nativo e reagiu até o limite de detecção preconizado pelo Laboratório de Referência da OIE. Além disso, tanto na IDGArec como no ELISArec não foram observadas reações inespecíficas da p26rec com soros de equinos vacinados, ao contrário do antígeno comercial,

que apresentou diversos padrões de linhas inespecíficas na IDGA de equinos vacinados. As reações inespecíficas representam um problema frequente nos ELISA para diagnóstico da AIE, pois dificultam a interpretação e levam à necessidade de confirmação com outro teste, como IDGA ou Western blot (OIE, 2017b).

As características diagnósticas da IDGArec e do ELISAreC foram avaliadas em relação à IDGA realizada com antígeno comercial, empregando número de amostras calculado para avaliar um teste com SeD e SpD de 90% ou mais. A IDGArec apresentou 100% de SeD e 100% de SpD e o ELISAreC, SeD de 100,00% e SpD de 99,64%. Esses valores estão próximos aos previamente relatados para IDGA, SeD de 100% e SpD de 100% (ALVAREZ et al., 2007 e SINGHA, et al., 2013) e ELISA (SeD de 96,1% a 100% e SpD de 93,3% a 98,6%) (PIZA et al., 2007; REIS et al., 2012; SINGHA, et al., 2013, COUTINHO et al., 2013).

O ponto de corte (PP>29,51), calculado com base na análise da Curva ROC, foi definido com base no índice de Youden, que foi consistentemente definido, uma vez que os totais de amostras positivas (n = 288; 50,62%) e de amostras negativas (n = 281; 49,38%) foram equivalentes, condição essencial para proporcionar igual peso da Se e da Sp no cálculo do índice (SCHISTERMAN et al., 2005). Em alguns estudos, como Singha et al. (2013) e Reis et al. (2012), a limitação para avaliação dos testes para diagnóstico da AIE foi a quantidade ou a proporcionalidade entre amostras positivas e negativas.

Conclusão

Com base nesses resultados conclui-se que a p26rec produzida pelo sistema de expressão *E. coli* fusionada à MBP demonstrou ser altamente estável, solúvel e imunoreativa especificamente com anticorpos anti-p26. A IDGA desenvolvida com a p26rec, quando comparada à IDGA com antígeno nativo do VAIE (kit comercial), apresentou 100% de SeD e SpD, enquanto que o ELISA mostrou 100% e 99,6% de SeD e SpD, respectivamente. É necessário avaliar a p26rec no WB como alternativa de confirmação diagnóstica.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Biovetech (PAPPE - 2008; Proc APS 0338-5.05/08). Bolsas foram concedidas pela

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem ao Dr. Hans Aymeric do laboratório de doenças equinas (Maisons-Alfort, France) por fornecer gentilmente o soro de referência da OIE anti-VAIE e ao Ministério da Agricultura pela permissão de importação. Parte dos experimentos foi realizada no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia experimentais (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Vet. Microbiol.* 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.* 27, 1167-1173.
- Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D.L., Benhar, I. 2001. *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J. Mol. Biol.* 312, 79-93.
- Ball, J. M., Rushlow, K. E., Issel, C.J., Montelaro, R.C. 1992. Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious anemia virus by using synthetic peptide strategies. *J. Virol.* 66, 732-742.
- Banoo, S., Bell, D., Bossuyt, P., Herring, A., Mabey, D., Poole, F., Smith, P. G., Sriram, N., Wongsrichanalai, C., Linke, R., O'Brien, R., Perkins, M., Cunningham, J., Matsoso, P., Nathanson, C.M., Olliaro, P., Peeling, R.W., Ramsay, A. 2010. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. The TDR diagnostic evaluation panel. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, S21–S31.
- Bouillant, A.M.P., Nelson, K., Ruckerbauer, C.M., Samagh, B. S., Hare W.C.D. 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.
- Brasil, Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abasendimento. Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Portaria nº 84, de 19 de outubro de 1992. Diário Oficial da União de 22/10/1992, Seção 1, Página 14874. 1992.
- Coggins, L., Norcross, N.L. 1970. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Veterinary*, 60(2): 330-335.
- Cook, R.F., Leroux, C., Issel, C. J. 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Vet. Microbiol.* 167(1-2), 181-204.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L. 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8system. *Front. Microbiol.* 5, 63.
- Coutinho, L.C.A., Jesus, A.L., Fontes K.F.L.P., Coimbra, E.C., Mariz, F.C., Freitas, A.C., Maia R.C.C., Castro, R.S. 2013. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods.* 191(2), 95-100.
- De Marco, A., Casatta, E., Savaresi, S., Geerlof, A. 2004. Recombinant proteins fused to thermostable partners can be purified by heat incubation. *J. Biotechnol.* 107, 125-133.
- Fox, J. D., Kapust, R.B., Waugh, D.S. 2001. Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci.* 10(3): 622-30.
- Fox, J.D., Waugh, D.S. 2003. Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol. Biol.* 205, 99-117.
- Goh, L.L., Loke, P., Singh, M., Sim, T.S. 2003. Soluble expression of a functionally active *Plasmodium falciparum* falcipain-2 fused to maltosebinding protein in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* 32, 194-201.

- Issel, C.J., Foil, L.D. 2015. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasties. *Rev. Sci. Tech.* 34(2), 513-523.
- Issel, C.J., Cook, R.F., Mealey, R.H., Horohov, D.W. 2014. Equine Infectious Anemia in 2014: Live with It or Eradicate It? *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 561-577.
- Jana, S., Deb, J.K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(3), 289-298.
- Joseph, B.C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., Manjunath, S.R. 2015. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*. *J. Cell Sci. Ther.* 6, 221.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668-1674.
- 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.* 41, 975-980.
- Kosobokova, E.N., Skrypnik, K.A., Kosorukov, V.S. 2016. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. *Biochem. (Mosc)* 81(3):187-200.
- Leroux, C., Cadore, J-L., Montelaro, R.C. 2004. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.*, 25, 485-512.
- Malmquist, W.A., Barnett D., Becvar C.S. 1973. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42, 361-370.
- Metz, C.E. 1978. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 8(4), 283-298.
- 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.* 16, 10539-10544.
- Montelaro, R.C., Ball, J.M., Rushlow, K.E. 1993. Equine retroviruses, p.257-359. In: Levy (Ed.), *The Retroviridae*. Plenum Press, New York.
- Nakajima, H., Kono, Y., Ushimi, C. 1971. Characterization of precipitating antibody in equine infectious anemia. *J. Immunol.* 107, 889-894.
- Nallamsetty, S., Austin, B.P., Penrose, K.J., Waugh, D.S. 2005. Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 14(12), 2964-2971.
- Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J.F., Weiss, E., Trave, G. 2001. A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: Application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Eng.* 14, 297-305.
- O'Farrell, P.H. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- OIEa - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>. Acesso em: 14.08.2017.
- OIEb - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. Disponível em: www.oie.int. Acesso em: 12.08.2017.
- Piza, A.S.T., Perira, 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. *Prev. Vet. Med. Preventive Veterinary Medicine*, 78, 239-245.
- Planson, A.G., Guijarro, J.I., Goldberg, M.E., Chaffotte, A.F. 2003. Assistance of maltose binding protein to the in vivo folding of the disulfide-rich C-terminal fragment from Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42, 13202-13211.
- Reis, J.K.P., Rejane, S., Diniz, R.S., Haddad, J.P.A., Ferraz, I.B.F., Alex, F., Carvalho, A.F., Kroon, E.G., Ferreira, P.C.P., Leite, R.C. 2012. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods*, 180:62-67.
- Schisterman, E.F., Perkins, N.J., Liu, A., Bondell, H. 2005. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology*, 16(1), 73-81.
- Singha, H., Goyal, S.K., Malik, P., Khurana, S. K., Raj, K., Singh, R.K. 2013. Development, evaluation, and laboratory validation of immunoassays for the diagnosis of equine infectious anemia (EIA) using recombinant protein produced from a synthetic p26 gene of EIA virus. *Indian J. Virol.*, 24(3):349–356.
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4(1), 1.
- Soutullo, A., Verwimp, V., Riveros, M., Pauli, R., Tonarelli, G. 2001. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Veterinary Microbiology*, 79, 111-121.
- Walper, S.A., Battle, S.R., Lee, P.A.B., Zabetakis, D., Turner, K.B., Buckley, P.E., Calm, A.M., Welsh, H.S., Warner, C.R., Zacharko, M.A., Goldman, E.R., Anderson, G.P. 2014. Thermostable single domain antibody-maltose binding protein fusion for *Bacillus anthracis* spore protein BclA detection. *Anal Biochem.*, 447, 64–73.
- Wright, P. F., Nilsson, E., Van Rooij, E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H. 1993. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, Paris, 12(2), 435-450.
- Youden, W.J. 1950. An index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3, 32-35.
- Zhou, X.H., Obuchowski, N.A., Mcclish, D.K. 2002. *Statistical methods in diagnostic medicine*. Wiley-Interscience.
- Zweig, M.H., Campbell, G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry*. 39, 561-577.

5. APÊNDICE

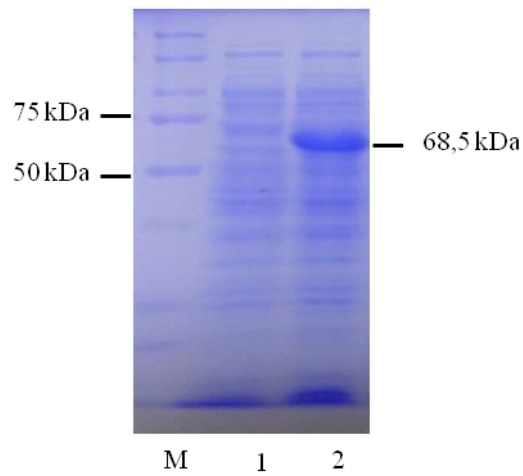


Figura 1. SDS-PAGE da p26rec do VAIE. M- marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards - Biorad), 1- controle negativo da expressão (vetor sem o inserto da p26rec) e 2 - p26rec do VAIE.

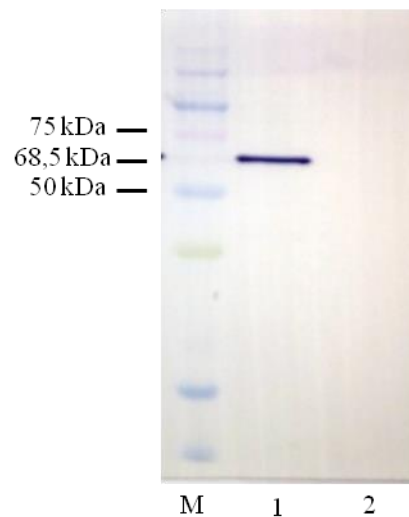


Figura 2. Western blot da p26rec do VAIE revelado com anticorpo anti-HIS (1:3000). M- marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375), 1- p26rec e 2- controle negativo da expressão (vetor sem o inserto da p26rec).

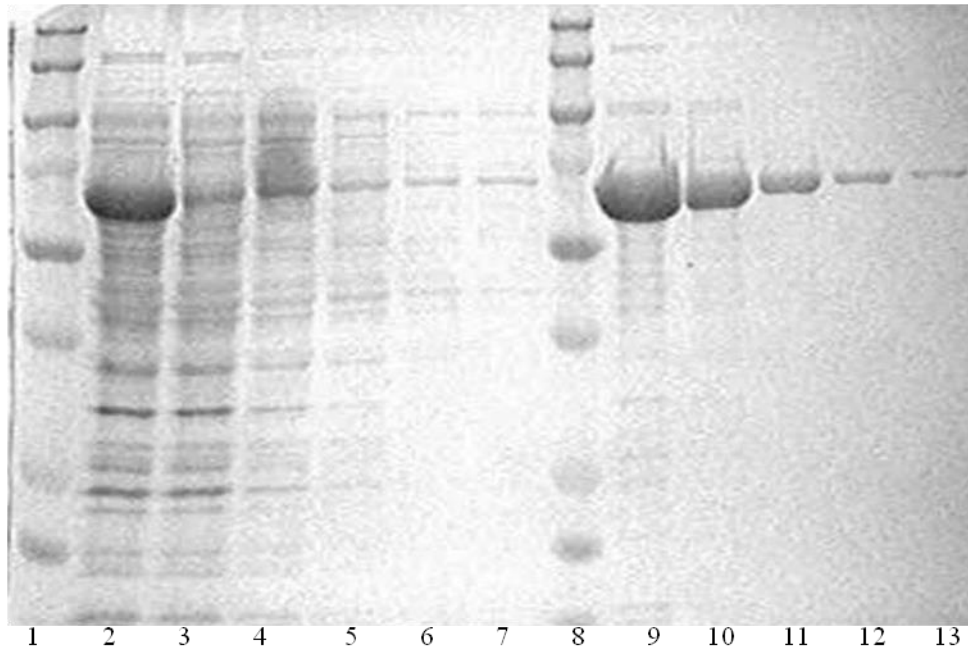


Figura 3. SDS-PAGE da purificação da p26rec com suas respectivas frações. 1- Marcador de peso molecular (MPM) (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards - Biorad), 2- Indução de p26rec; 3-Pellet da indução de p26rec ; 4- Flowthrough de p26rec; 5- 1º Lavado; 6- 2º Lavado; 7- 3º Lavado; 8- MPM; 9- 1º Eluato; 10- 2º Eluato; 11- 3º Eluato; 12- 4º Eluato; 13- 5º Eluato.

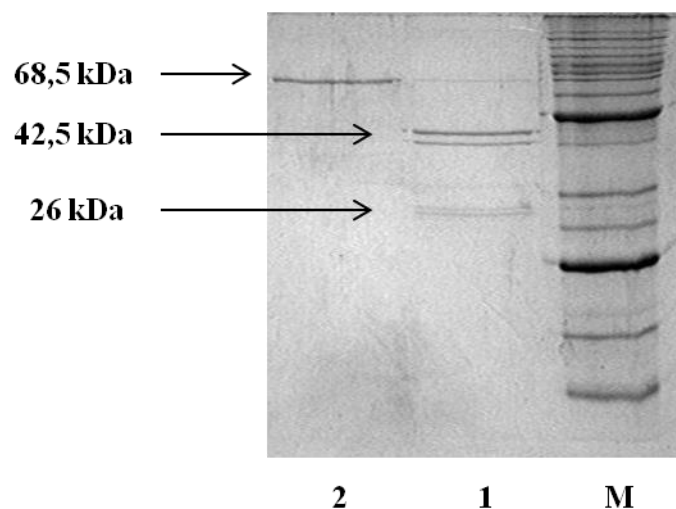


Figura 4. SDS-PAGE da clivagem da proteína p26rec digerida com o Fator Xa. 1- p26rec; 2 – p26rec digerida com o Fator Xa com bandas da p26 com 26 kDa e da MBP com 42,5 kDa e M- marcador de peso molecular para proteínas (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen).

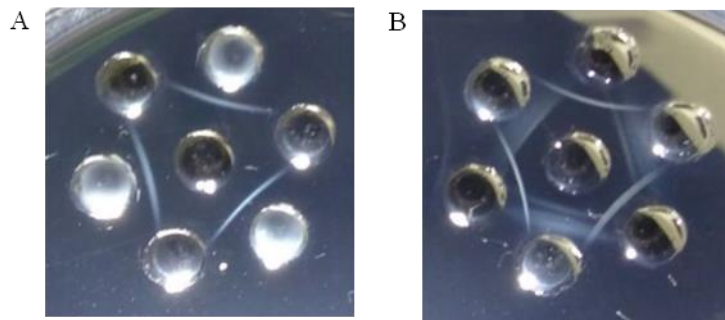


Figura 5. Comparação da IDGA entre a p26rec (A) e kit comercial de IDGA (B). A- antígeno p26rec frente a três soros negativos de animais vacinados, ausência de formação de linhas inespecíficas. B- Antígeno comercial com formação de linhas inespecíficas frente aos mesmos animais.

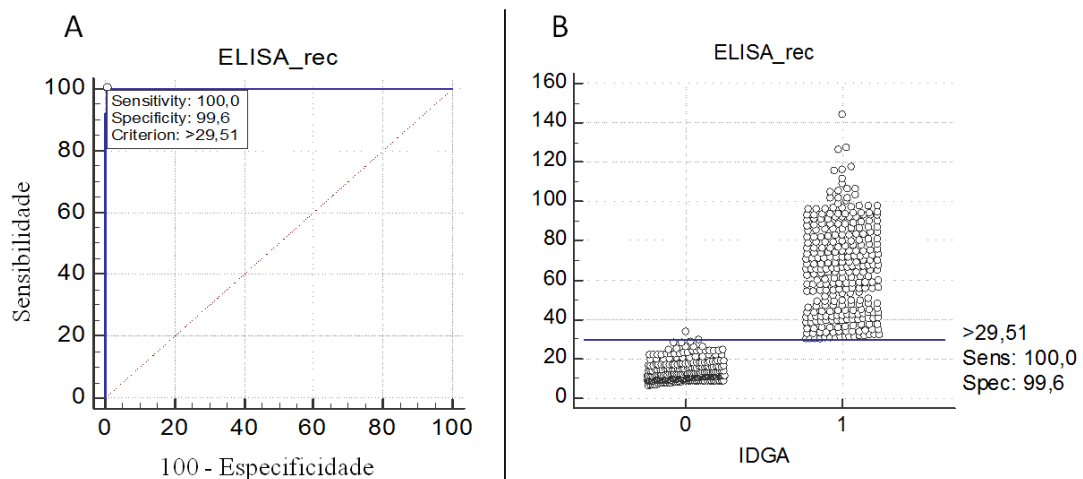


Figura 6. Gráficos estatísticos dap26rec no ELISA. A - Curva ROC do ELISA da p26rec com base em 288 soros positivos e 281 soros negativos utilizados para determinação do ponto de corte do ELISAre. Criterion = Ponto de corte = >29,51. B - Gráfico de dispersão dos percentuais de positividade (PP) dos soros utilizados no teste ELISAre com p26rec. Negativas – PPs das amostras negativas e Positivas- PPs das amostras positivas.