

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus
bovino tipo 1 e 5 em *Pichia pastoris*

Bárbara Couto Roloff

Pelotas, 2014

BÁRBARA COUTO ROLOFF

Clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em
Pichia pastoris

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora acadêmica: Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben
Orientador de estágio: Dr. Leonardo Garcia Monte

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R755c

Roloff, Bárbara Couto

Clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em *Pichia pastoris* / Bárbara Couto Roloff. – 46f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Cláudia Pinho Hartleben ; co-orientador Leonardo Garcia Monte.

1.Biotecnologia. 2.Herpesvírus bovino. 3.Glicoproteína E. 4.*Pichia pastoris*. 5.Diagnóstico. 6.mAbs. I.Hartleben, Cláudia Pinho. II.Monte, Leonardo Garcia. III.Título.

CDD:

636.2083

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Leonardo Garcia Monte, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Bianca Sica Siedler, Universidade Federal de Pelotas

*Aos meus pais, Marilce e Sigmar e
ao meu noivo, Henrique, pelo incentivo
incondicional, dedicação e apoio constante.*

Agradecimentos

A Deus, pelas conquistas alcançadas e por ter me concebido sabedoria e serenidade para enfrentar os momentos difíceis.

À minha família, minha mãe Marilce Couto, meu pai Sigmar Roloff e meu irmão Henrique Roloff, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, e por representarem a base de tudo que conquistei. Amo vocês!

Ao meu noivo Henrique Padilha, por todo amor, companheirismo e dedicação em me ouvir, por acreditar em mim, me aconselhar e me incentivar sempre.

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores ao Núcleo de Biotecnologia do CDTEC, pela dedicação em capacitar seus estudantes.

À orientadora acadêmica Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben, pela confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos, pela oportunidade de aprender e crescer durante o tempo de estágio.

Ao orientador de estágio Dr. Leonardo Garcia Monte, pelos ensinamentos transmitidos durante este período de estágio, que certamente contribuíram para realização dos trabalhos.

À Msc. Bianca Sica Siedler pelas oportunidades proporcionadas, pelo incentivo e conhecimentos adquiridos, dividindo as alegrias e frustrações, sempre acreditando no meu potencial. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos!

Aos demais colegas do Laboratório de Imunodiagnóstico, por todo o auxílio dedicado para realização deste trabalho, pela amizade, ajuda, palavras de incentivo, estímulo e pelo convívio agradável.

Às amigas que a Biotecnologia me deu, Marina, Júlia e Gabriela que estiveram sempre comigo durante esses 4 anos de graduação, dividindo as alegrias, as preocupações e os trabalhos, pela amizade e companheirismo; e a todos os demais amigos e colegas da faculdade pelos momentos agradáveis de convivência e amizade durante esse período.

Muito obrigada!

*"Se as coisas são inatingíveis... ora! Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!"*
(Mario Quintana)

Resumo

ROLOFF, Bárbara Couto. **Clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em *Pichia pastoris***. 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) causam perdas significativas para a pecuária, por serem importantes patógenos que afetam bovinos causando diversas doenças, tais como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), conjuntivite, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), além de reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e meningoencefalite. Estes vírus, pertencentes à família *Herpesviridae*, possuem a capacidade de estabelecer latência no hospedeiro, o que torna difícil a previsão de surtos, especialmente em áreas endêmicas. O BoHV-1 apresenta distribuição mundial, já o BoHV-5 é mais prevalente principalmente no Brasil e na Argentina. O controle dos BoHV tem sido realizado através da utilização de vacinas e, devido a relação antigênica existente entre BoHV-1 e BoHV-5, acredita-se que ocorra proteção cruzada entre estes vírus. O genoma dos BoHV-1 e BoHV-5 contém aproximadamente 70 genes, cujos produtos gênicos incluem, entre outros, glicoproteínas. No envelope viral encontram-se inseridas dez glicoproteínas, alvos para a resposta imunológica do hospedeiro e responsáveis pelas interações vírus-célula. Deleções de genes que codificam glicoproteínas não essenciais na replicação viral *in vitro* ou *in vivo*, representam uma estratégia interessante e vem sendo aplicadas no desenvolvimento de vacinas diferenciais (DIVAs), baseadas na indução de uma resposta imune que pode ser sorologicamente diferenciada da resposta induzida pela infecção natural. DIVAs com deleção do gene que codifica a gE foram desenvolvidas e vem sendo testadas no Brasil, no entanto, o diagnóstico diferencial associado a estas vacinas não foi até o momento desenvolvido. Para tal, a produção da gE recombinante é um importante passo para produção de mAbs para posterior utilização em ELISA de bloqueio diferencial. A levedura haplóide e metilotrófica *Pichia pastoris*, por ser um organismo eucarioto simples, proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, sendo um modelo biológico promissor para a produção de proteínas recombinantes de eucariotos. Neste trabalho, o gene codificador para gE foi obtido ligado ao vetor de clonagem pUC18 e, após propagação e linearização, foi inserido no vetor de expressão pPICZαB. Posteriormente, foi realizada a transformação de *P. pastoris* KM71H, e a expressão da proteína foi analisada em meio de cultivo sólido e líquido através de *dot blot*. Os resultados sugerem que houve a expressão da rgE, porém se faz necessária a realização de outros testes para triagem da presença da proteína. Após a confirmação da expressão, sua antigenicidade será avaliada frente a soros de animais naturalmente infectados com BoHV e animais vacinados com uma cepa de BoHV gE⁻.

Palavras chave: herpesvírus bovino; glicoproteína E; *Pichia pastoris*; diagnóstico; mAbs

Abstract

ROLOFF, Bárbara Couto. **Cloning and expression of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 and 5 in *Pichia pastoris***. 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) cause significant losses to livestock, to be important pathogens affecting cattle causing various diseases, such as infectious bovine rhinotracheitis (IBR), conjunctivitis, infectious pustular vulvovaginitis (IPV), infectious pustular balanoposthitis (IPB), also embryonic death, abortion, temporary infertility, birth of weak calves and meningoencephalitis. These viruses belonging to the *Herpesviridae* family, have the ability to establish latency in the host, which makes it difficult to prediction of outbreaks, especially in endemic areas. The BoHV-1 has a worldwide distribution, as BoHV-5 is more prevalent mainly in Brazil and Argentina. The control of BHV has been accomplished through the use of vaccines, and because of antigenic relationship existing between BoHV-1 and BoHV-5, it is believed that cross protection takes place between these virus. The genome of BoHV-1 and BoHV-5 contains approximately 70 genes, whose gene products include, among others, glycoproteins. In the viral envelope are inserted ten glycoproteins, targets for the host immune response and responsible for virus-cell interactions. Deletions in genes coding for non-essential glycoproteins in *in vitro* or *in vivo* viral replication, and represent an interesting strategy has been applied to the development of differential vaccines (DIVAs), based on the induction of an immune response that can be serologically distinguished from the response induced by natural infection. DIVAs with a deletion of the gene encoding gE have been developed and are being tested in Brazil, however, the differential diagnosis associated with these vaccines has not been developed yet. To this end the production of recombinant gE is an important step for the production of mAbs for subsequent use in a differential blocking ELISA. The haploid and methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a simple eukaryotic organism, provides the expression of proteins with post-translational modifications, is a promising biological model for production of recombinant proteins in eukaryotes. In this work, the gene encoding gE was obtained attached to the cloning vector pUC18, and after propagation and linearization, was inserted into the expression vector pPICZαB. Subsequently, was performed the of *P. pastoris* KM71H, and protein expression was analyzed in a solid and liquid culture by dot blot. The results suggests that was the expression of rgE, but it is necessary to perform other tests to screen for the presence of rgE. After confirmation of expression, antigenicity will be evaluated against sera from animals naturally infected with BoHV and vaccinated with a strain of BoHV gE⁻.

Keywords: bovine herpesvirus; glycoprotein E; *Pichia pastoris*; diagnosis; mAbs

Lista de Figuras

Figura 1	Mapa do vetor de expressão pPICZ α B.....	23
Figura 2	Análise da propagação do vetor pUC/gE.....	29
Figura 3	Análise da propagação do vetor pPICZ α B.....	30
Figura 4	Análise da digestão enzimática dos vetores pUC/gE e pPICZ α B.....	30
Figura 5	Análise da integridade do gene codificador para a gE após purificação.....	31
Figura 6	Triagem dos clones recombinantes através da extração plasmidial por lise alcalina com SDS.....	32
Figura 7	Triagem dos clones recombinantes através da extração plasmidial por kit comercial.....	32
Figura 8	Análise da digestão enzimática dos possíveis clones recombinantes.....	33
Figura 9	Extração do DNA plasmidial com kit comercial para análise da concentração.....	34
Figura 10	Análise da linearização do vetor pPICZ α B/gE com a enzima ScaI...	34
Figura 11	Análise da precipitação do DNA para posterior transformação de <i>P. pastoris</i>	35
Figura 12	Avaliação da expressão da rgE em <i>P. pastoris</i>	36
Figura 13	Análise da expressão da rgE em meio líquido, através da reação em <i>dot blot</i> com <i>pool</i> anti-BoHV como anticorpo primário.....	37
Figura 14	Análise da expressão da rgE em meio líquido, através da reação em <i>dot blot</i> com anti-histidina como anticorpo primário.....	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ω : ohm

μF : microfarads

μg : microgramas

μL : microlitro

AOX1: álcool oxidase 1

AOX2: álcool oxidase 2

BMGY: *buffered glycerol-complex medium*

BMMY: *buffered methanol-complex medium*

BoHV: herpesvírus bovino

BoHV-1: herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-5: herpesvírus bovino tipo 5

DAB: 3,3'-*diaminodbenzidine*

DIVAs: *differentiating infected from vaccinated animals*

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O.: densidade ótica

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

g: gramas

g/L: gramas por litro

gB: glicoproteína B

gC: glicoproteína C

gD: glicoproteína D

gE: glicoproteína E

gG: glicoproteína G

gH: glicoproteína H

gI: glicoproteína I

gK: glicoproteína K

gL: glicoproteína L

gM: glicoproteína M

IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina

IPV: vulvovaginite pustular infecciosa

IPB: balanopostite pustular infecciosa

Kb: quilobases

kDa: quilodaltons
kV: quilovolt
L: litros
LB: Luria-Bertani
mAbs: anticorpos monoclonais
mL: mililitro
Mut⁺: *methanol utilization plus*
Mut_s: *methanol utilization slow*
NaCl: cloreto de sódio
pb: pares de base
PBS: *phosphate buffered saline*
pH: potencial hidrogeniônico
rpm: rotações por minutos
SNC: sistema nervoso central
YPD: *yeast extract peptone dextrose medium*

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 Revisão Bibliográfica.....	15
3.1 Herpesvírus bovino.....	15
3.2 Glicoproteínas.....	18
3.3 Estratégias para o controle dos BoHV.....	20
3.4 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão de proteínas heterólogas.....	21
4 Metodologia.....	24
4.1 Clonagem do gene codificador para gE.....	24
4.1.1 Propagação dos vetores pUC/gE e pPICZαB.....	24
4.1.2 Digestão dos vetores pUC/gE e pPICZαB.....	24
4.1.3 Ligação do gene codificador para a gE ao pPICZαB.....	25
4.1.4 Triagem das colônias recombinantes.....	25
4.2 Preparo de células competentes de <i>Pichia pastoris</i>	25
4.3 Preparo do DNA plasmidial.....	26
4.4 Transformação de <i>P. pastoris</i>	26
4.5 Triagem de colônias recombinantes por <i>dot blot</i>	27
4.5.1 Seleção dos clones secretores da rgE.....	27
4.5.2 Avaliação da expressão da rgE.....	28
5 Resultados.....	29
5.1 Clonagem do gene codificador para gE.....	29
5.2 Preparo do DNA plasmidial.....	33
5.3 Transformação de <i>P. pastoris</i>	35
5.4 Triagem de colônias recombinantes.....	35
6 Discussão.....	38
7 Conclusões e Perspectivas.....	39
Referências.....	40

1 Introdução

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5), pertencentes a subfamília *Alphaherpesvirinae*, são geneticamente e antigenicamente muito semelhantes (DAVISON et al., 2009). Estes vírus caracterizam-se por apresentar ciclo replicativo curto, com rápida disseminação *in vitro*, e pela indução de lise nas células infectadas (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Além disso, possuem capacidade de infectar células epiteliais e nervosas, estabelecendo infecção latente em neurônios de gânglios do sistema nervoso, sendo as células epiteliais os principais alvos para a replicação viral *in vivo* (ROIZMAN et al., 1992; DELHON et al., 2003).

O BoHV-1 é responsável, principalmente, por doenças respiratórias e infecções genitais (FAVIER et al., 2012), já o BoHV-5, por casos de meningoencefalite (ROELS et al., 2000), causando perdas significativas para a pecuária. O BoHV-1 apresenta distribuição mundial, enquanto o BoHV-5 é mais prevalente na América do Sul, principalmente Brasil e Argentina (ZAJAC et al., 2010). O controle dos BoHV tem sido realizado através da utilização de vacinas vivas e inativadas (VAN OIRSCHOT et al., 1996) e, devido a relação antigênica existente entre BoHV-1 e BoHV-5, que apresentam homologia de, aproximadamente, 80% (DELHON et al., 2003), acredita-se que ocorra proteção cruzada entre estes vírus (ZAJAC et al., 2006).

As vacinas disponíveis comercialmente são, em sua grande maioria, inativadas e formuladas com cepas de BoHV-1, devido a identidade aminoacídica de aproximadamente 82% entre as proteínas dos BoHV-1 e BoHV-5 (DELHON et al., 2003; LEVINGS & ROCH, 2013). Os métodos de diagnóstico utilizados atualmente, apresentam reações cruzadas entre soros de animais vacinados e naturalmente infectados. Desta forma, vacinas diferenciais (DIVAs) que apresentem características detectáveis em testes de diagnóstico vem sendo desenvolvidas, a fim de facilitar o controle e erradicação do BoHV, sendo a gE um alvo importante para estes fins (ACKERMANN & ENGELS, 2006; FRANCO et al., 2007; BRUM et al., 2010).

A produção da gE recombinante é de grande importância para a posterior produção de anticorpos monoclonais (mAbs) que serão utilizados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de bloqueio diferencial, tornando possível a diferenciação

dos animais vacinados com vacinas gE-deletadas e animais infectados a campo. Para tal, a levedura *Pichia pastoris* é um sistema de expressão eficaz, pois apresenta vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, como a produção de proteínas com modificações pós-traducionais, fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO et al., 2002).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi obter a glicoproteína E recombinante do herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV) e 5 (BoHV-5) utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos

- Propagação dos vetores pUC/gE e pPICZ α B;
- Digestão dos vetores pUC/gE e pPICZ α B com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI*;
- Ligação do gene codificador para gE ao vetor pPICZ α B;
- Propagação do vetor pPICZ α B/gE em *E. coli* DH5 α ;
- Triagem das colônias recombinantes através da extração do DNA plasmidial;
- Preparo de células competentes de *Pichia pastoris*;
- Preparo do DNA plasmidial para transformação de *P. pastoris*;
- Transformação de *P. pastoris* por eletroporação;
- Seleção de clones secretores da rgE através de *dot blot* de colônias;
- Avaliação da expressão da rgE por *dot blot*.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Herpesvírus bovino

Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de 200 vírus isolados de diferentes espécies, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (THIRY et al., 2006). Os vírus pertencentes à esta família estão entre os maiores vírus da natureza, adaptando mecanismos muito específicos, não apenas para evadir as defesas do hospedeiro e usurpar a maquinaria da célula infectada na produção das progênes virais, como para silenciar a sua própria replicação lítica durante as infecções latentes (COHRS & GILDEN, 2001).

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5), pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e são geneticamente e antigenicamente muito semelhantes (DAVISON et al., 2009). A estrutura destes vírus consiste em: um núcleo contendo DNA linear de fita dupla, envolto por um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 160 capsômeros; uma substância amorfa de proteínas denominada tegumento; e pelo envelope fosfolipídico contendo espículas glicoproteicas na superfície, que são glicoproteínas responsáveis pelas interações vírus-célula, e possuem entre 100-200nm de diâmetro (THIRY et al., 2006; ZAJAC et al., 2010).

Os vírus pertencentes a subfamília *Alphaherpesvirinae* caracterizam-se por apresentar ciclo replicativo curto, com rápida disseminação *in vitro*, e pela indução de lise nas células infectadas (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Além disso, possuem capacidade de infectar células epiteliais e nervosas, estabelecendo infecção latente em neurônios de gânglios do sistema nervoso, sendo as células epiteliais os principais alvos para a replicação viral *in vivo* (ROIZMAN et al., 1992; DELHON et al., 2003).

Descrito pela primeira vez por FRENCH (1962) na Austrália, o BoHV-5 foi previamente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1 (DELHON et al., 2003) devido às extensas reações sorológicas cruzadas observadas entre ambos. No entanto, as diferenças epidemiológicas, genômicas e antigênicas destes

dois vírus, além da associação do BoHV-5 com encefalites, fizeram, em 1992, com que este último fosse reclassificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, recebendo então a denominação atual (ROEHE et al., 1997; DELHON et al., 2003). Tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5 são vírus neurotrópicos, mas apenas o BoHV-5 é capaz de se replicar no sistema nervoso central (SNC) e induzir a doença neurológica (DELHON et al., 2003).

O BoHV-1 está associado a doença respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), conjuntivite, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), além de reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e meningoencefalite (VIEIRA et al., 2003). Já o BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite herpética (ROELS et al., 2000), enfermidade de curso geralmente fatal, que atinge principalmente animais jovens (GOMES et al., 2002). Quando acomete animais adultos, o BoHV-5 leva ao desenvolvimento de infecção subclínica ou enfermidade moderada (ASHBAUGH et al., 1997; CASCIO et al., 1999; ZAJAC et al., 2006). O aborto, por sua vez, pode ocorrer em decorrência da infecção pelas duas cepas virais (WEIBLEN, 1989), ou mesmo através da utilização de vacinas vivas modificadas (DONKERSGOED & BABIUK, 1991).

A transmissão dos herpesvírus em ruminantes se dá, comumente, de forma direta, através de aerossóis ou pelo contato próximo entre animais infectados. A transmissão indireta pode ocorrer via comida ou água contaminados, sêmen na inseminação artificial ou ordenha mecânica (MAIDANA et al., 2011). Após o contato com a mucosa de um animal suscetível, os herpesvírus estabelecem uma replicação inicial em células epiteliais locais, como a cavidade nasal, orofaringe, conjuntiva e trato genital. Essa replicação causa a lise dessas células, levando as manifestações clínicas da infecção: congestão local, presença de secreções e lesões na mucosa, que variam na gravidade entre vesiculares e erosivas (ENGELS & ACKERMANN, 1996; VOGEL et al., 2003). Após a replicação primária, o vírus invade as terminações nervosas. Ele é transportado ao longo dos axônios até os corpos neurais dos gânglios sensoriais ou autônomos para o estabelecimento da latência (CAIXETA, 2008).

Os animais infectados pelo vírus, mesmo assintomáticos, tornam-se portadores, já que os BoHV permanecem latentes no hospedeiro, instalando-se em gânglios nervosos, olfatório, trigêmeo ou sacral, dependendo do local da infecção

(MEYER et al., 2001), não sendo detectados pelos exames tradicionais. Especialmente em áreas endêmicas, os surtos são imprevisíveis, pois uma vez estabelecida a latência, o animal pode, periodicamente, re-excretar o vírus através das secreções, disseminando-o para bovinos suscetíveis (VOGEL et al., 2003).

Os BoHV apresentam distribuição mundial e, embora tenham sido reportados casos esporádicos de meningoencefalite por BoHV-5 na Austrália, Itália e Hungria, a infecção é mais frequente no Brasil e na Argentina, onde inúmeros casos foram descritos nas últimas décadas (ZAJAC et al., 2010). Embora ainda se desconheça a real prevalência desse agente no país, principalmente devido a reatividade sorológica cruzada com BoHV-1, estudos têm revelado uma alta prevalência no Rio Grande do Sul (CAMPOS et al., 2009; HOLZ et al. 2009).

O BoHV-5 infecta animais de todas as idades, porém nos animais jovens (até 6 meses de idade) o curso da doença é rápido e letal; já os animais adultos são considerados menos susceptíveis a infecção pelo vírus, dependendo das estirpes virais e características do hospedeiro (ZAJAC et al., 2010). As infecções por BoHV causam graves prejuízos econômicos à bovinocultura, devido à diminuição da produção de leite, perda de peso e aborto (FAVA et al, 2002; ZAJAC et al., 2006). A rara ocorrência de meningoencefalite causada pelo BoHV-5 em áreas onde a infecção por BoHV-1 é endêmica pode ser explicada devido a proteção cruzada induzida pela infecção natural por BoHV-1 ou vacinação (ZAJAC et al., 2010; MAIDANA et al., 2011).

Devido a ampla distribuição do BoHV-1 na América do Norte e em países europeus, programas de vacinação em larga escala foram aplicados, o que poderia explicar a baixa incidência do BoHV-5, uma vez que a existência de proteção cruzada entre os dois vírus, tanto por imunização passiva como por ativa, foi demonstrada (VOGEL et al., 2002; ZAJAC et al., 2006). Desta forma, o maior número de relatos de infecção por BoHV-5 ocorre em países onde a prevalência de BoHV-1 é relativamente baixa e não há programas de vacinação em larga escala (VOGEL et al., 2002).

A principal forma de controle dos BoHV é através da vacinação (VAN OIRSCHOT et al., 1996), sendo as vacinas disponíveis comercialmente, em sua grande maioria, inativadas e formuladas com cepas de BoHV-1, devido a identidade aminoacídica de aproximadamente 82% entre as proteínas dos BoHV-1 e BoHV-5 (DELHON et al., 2003; LEVINGS & ROCH, 2013). Devido a esta relação antigênica,

ocorrem reações cruzadas *in vivo* em animais vacinados contra o BoHV-1 e desafiados com BoHV-5 (ZAJAC et al., 2006). Porém, alguns estudos relatam proteção insuficiente induzida por vacinas contra BoHV-1 frente desafio com vírus não homólogo (CASCIO et al., 1999; SILVA et al., 2006), enfatizando a necessidade do desenvolvimento de vacinas específicas para o BoHV-5, a fim de prover uma maior proteção frente a este agente.

O tipo de resposta imune desencadeado pelas infecções por herpesvírus é discutido desde os anos 70 (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977), porém a imunidade mediada por células é efetivamente de maior importância para o desenvolvimento de uma resposta protetora precoce ao BoHV-1 e ao BoHV-5. FENNER et al. (1993), relataram que são três os principais mecanismos de resposta às infecções virais: destruição de células infectadas, produção de interferons e neutralização da infectividade da progênie de vírus produzida durante o processo infeccioso.

O diagnóstico de infecção por BoHV geralmente é realizado através de técnicas sorológicas, baseadas na detecção de anticorpos específicos contra estes vírus, sendo a soroneutralização e o ELISA as técnicas mais utilizadas para este fim (ROEHE, 1996). O diagnóstico virológico, por sua vez, pode ser realizado através da identificação de partículas virais em secreções ou tecidos de animais infectados, do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, através de métodos moleculares (ROEHE et al., 1997). Porém, estes métodos de diagnóstico apresentam deficiências em relação a especificidade e sensibilidade, podendo levar a reações cruzadas que poderão comprometer o diagnóstico da doença. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias que visem contornar os problemas encontrados nos testes atuais.

3.2 Glicoproteínas

As glicoproteínas do envelope viral desempenham importante papel na virulência, mediando a adsorção e penetração do vírion na célula hospedeira, além da disseminação célula-a-célula. Além disso, devido a sua localização na superfície viral e na membrana de células infectadas, glicoproteínas são importantes alvos para a resposta imune do hospedeiro (ZAJAC et al., 2010).

BoHV-1 e BoHV-5 são intimamente relacionados e apresentam notável semelhança nos aspectos genéticos, antigênicos e biológicos. Seus genomas de

DNA fita dupla (135 kb no BoHV-1; 138 kb no BoHV-5) apresentam cerca de 85% de similaridade de nucleotídeos e 82% de identidade de aminoácidos (DELHON et al., 2003; TRAESEL et al., 2013). O genoma viral codifica aproximadamente 70 proteínas, das quais 10 são glicosiladas (EL-KHOLY et al., 2013). Os produtos gênicos incluem proteínas regulatórias da replicação viral, enzimas, proteínas estruturais e glicoproteínas (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; DELHON et al., 2003; TRAESEL et al., 2013). No envelope viral encontram-se inseridas 10 glicoproteínas (gK, gC, gB, gH, gM, gL, gG, gD, gI e gE), envolvidas em diferentes etapas do ciclo viral, responsáveis pelas interações vírus-célula e alvos para a resposta imunológica do hospedeiro (DELHON et al., 2003). A proteína N é codificada pelo gene UL49.5 e é considerada uma falsa glicoproteína no BoHV-1, pois não é glicosilada (ZAJAC et al., 2010).

As glicoproteínas C e B são importantes para o início do processo de infecção viral, pois contribuem com a adsorção viral ligando-se a receptores celulares específicos de sulfato de heparina da membrana celular (BABIUK et al., 1996). Esse processo de adsorção do vírus à superfície celular ativa é um processo mediado por glicoproteínas virais, onde pelo menos cinco glicoproteínas (gB, gD, gH, gL e gK) estão envolvidas no processo que culmina com a penetração do vírus na célula (WILD et al., 1998). A análise das sequências de gD, gG, gI e gE mostrou que são codificadas pela região única curta (U_s) do genoma sugerindo que evoluíram por duplicação de genes. Com isso, gE e gI são originadas a partir dos genes US8 e US7, respectivamente (LEHMANN et al., 2004) e formam um heterodímero ligado de forma não covalente as células infectadas e ao envelope viral, indicando que o complexo gE/gI representa uma unidade funcional (HÜBNER et al., 2005). A análise *in vitro* de vírus mutantes sem gE e/ou gI tem mostrado que o complexo está envolvido na disseminação célula-células (FRANCO et al., 2007).

A gE é uma glicoproteína transmembrana tipo I, codificada pelo gene US8, e está presente em menor concentração quando comparada às glicoproteínas imunodominantes gB, gC e gD. A gE do BoHV-1 contém 575 aminoácidos, peso molecular calculado de 61kDa e peso molecular aparente de 92kDa, discrepância esta devida às extensivas modificações pós-traducionais, principalmente N-glicosilação. As gE dos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem composição aminoacídica distinta, mas compartilham homologia estrutural e funcional. A porção extracelular (420 resíduos N-terminais) contém dois grupos conservados de

cisteínas (C1 e C2) e um motivo GLYV conservado, localizado entre C2 e a região transmembrana. A cauda citoplasmática contém dois motivos conservados YxxL (onde x é qualquer aminoácido). A gE está envolvida com a interação célula-célula e com a disseminação neural (LEHMANN et al., 2004).

3.3 Estratégias para o controle dos BoHV

Deleções de genes que codificam glicoproteínas não-essenciais na replicação viral *in vitro* ou *in vivo* (KAASHOEK et al., 1995; KAASHOEK et al., 1998) representam uma estratégia interessante e vem sendo aplicadas no desenvolvimento de vacinas diferenciais (DIVAs), baseadas na capacidade de indução vacinal de uma resposta imune que pode ser sorologicamente diferenciada da resposta induzida pela infecção natural, com cepa viral de campo (VAN OIRSCHOT, 1999). A glicoproteína não-essencial do envelope viral, gE, tem sido muito utilizada como marcador antigênico em DIVAs para BoHV-1. A gE é necessária para o transporte eficiente de partículas virais através de neurônios conectados sinapticamente, razão pela qual herpesvírus gE-deletados são deficientemente transportados para o cérebro após replicação nasal. Assim, além de ser marcador antigênico, a deleção da gE dos genomas de BoHV-1 e BoHV-5 contribui para a inativação do vírus (SANTOS et al., 2011).

A associação de DIVAs à testes sorológicos diferenciais vem sendo empregada no controle e erradicação do BoHV-1 em países europeus (ACKERMANN & ENGELS, 2006), utilizando como ferramenta de diagnóstico ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) de bloqueio ou competição (VAN OIRSCHOT et al., 1996; VAN OIRSCHOT et al., 1997). Os antígenos utilizados para a produção dos mAbs empregados nestes testes diagnósticos são, geralmente, obtidos de um extrato viral total, onde a gE encontra-se associada a outras glicoproteínas do envelope, comumente gI, com a qual forma-se uma ligação não covalente (complexo gE/gI). No entanto, estes ELISAs apresentam performance limitada, atribuída a sua baixa especificidade, porém esta especificidade reduzida não é atribuída a reações cruzadas com outros vírus, e sim à presença massiva de anticorpos dirigidos a outras glicoproteínas do envelope que não a gE (LEHMANN et al., 2004). Além disso, uma variabilidade entre a gE de diferentes cepas de BoHV-1 já foi relatada,

através do desafio destas cepas com um painel de mAbs anti-gE (KAASHOEK et al., 1995).

DIVAs com deleção do gene que codifica a gE foram desenvolvidas (FRANCO et al., 2007; BRUM et al., 2010) e vem sendo testadas no Brasil (HÜBNER et al., 2005; BRUM et al., 2010; ANZILIERO et al., 2011; CAMPOS et al., 2011; SANTOS et al., 2011), no entanto, o diagnóstico diferencial associado a estas vacinas não foi até o momento desenvolvido.

3.4 *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas

As bactérias são os organismos mais utilizados para a expressão de proteínas recombinantes, no entanto, não possuem características importantes para a expressão de proteínas de eucariotos, como sistema de endomembranas e as modificações pós-traducionais, o que pode impedir a correta expressão das mesmas (CEREGHINO et al., 1999).

Assim, quando o interesse é produzir proteínas de organismos eucariotos, as leveduras destacam-se como sistemas alternativos pois, além de serem capazes de realizar modificações pós-traducionais, tipicamente associadas com eucariotos superiores, detêm as vantagens do sistema bacteriano no que diz respeito à facilidade de manipulação e cultivo em escala industrial (CEREGHINO et al., 1999). Neste contexto, a levedura haplóide e metilotrófica *Pichia pastoris*, têm recebido destaque nas últimas duas décadas (TORRES & MORAES, 2000). Por ser um organismo eucarioto simples, proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, tais como o processamento de sequências de sinal, *folding*, formação de ponte dissulfeto, certos tipos de adição de lípidos, e O- e N-glicosilação, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGHINO & CREGG, 1999). Assim, muitas proteínas que acabam como corpos de inclusão inativos em sistemas bacterianos são produzidos como moléculas biologicamente ativas em *P. pastoris* (CREEG et al., 2000).

Além disso, o promotor derivado do gene da álcool oxidase 1 (AOX1), presente na *P. pastoris* é especialmente adequado para a expressão controlada de genes exógenos. AOX 1 é reprimido em cultura contendo glicerol e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como única fonte de

carbono (BOETTNER et al., 2002). Este sistema apresenta também um segundo promotor funcional para a enzima álcool oxidase, o gene AOX2 que codifica uma proteína que é 97% idêntica e tem a mesma atividade específica do AOX1 (NOHR et al., 2003).

Outra importante razão para a utilização da *P. pastoris* é a semelhança das técnicas necessárias para sua manipulação genética, com as utilizadas para *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados na biologia moderna. Algumas proteínas heterólogas são glicosiladas quando secretadas em leveduras, porém podem ocorrer eventos indesejáveis como a hiperglicosilação gerando proteínas não funcionais, o que é o caso das proteínas produzidas em *S. cerevisiae*, que são secretadas em tamanhos heterogêneos, acarretando em hiperglicosilação, e desta forma, comprometendo a antigenicidade da proteína. Já *P. pastoris*, expressam proteína com cadeias menores de manose, levando a uma glicosilação mais homogênea (CEREGHINO & CREGG, 1999; NOHR et al., 2003).

O crescimento respiratório da *P. pastoris* também é uma característica fisiológica chave que facilita muito a sua cultura em altas densidades celulares em relação às leveduras fermentativas. Além disso, o sistema de *P. pastoris* é geralmente considerado como sendo mais rápido, mais fácil e menos dispendioso do que sistemas de expressão obtidos a partir de eucariotos superiores, tais como cultura de tecidos de mamíferos e insetos, além de geralmente resultar em níveis mais elevados de expressão (CREGG et al., 2000).

Outras vantagens para a utilização de *P. pastoris* como sistema de expressão são: a adaptabilidade de culturas de *P. pastoris* para altas densidades celulares, permitindo a produção de grande quantidade de proteínas recombinantes no meio de cultura; a simplicidade da indução da expressão de proteínas por metanol; o baixo nível de secreção de proteínas nativas; e seu crescimento em meio simples utilizando metanol como única fonte de carbono (COS et al., 2005). A aquisição de altas concentrações de proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura depende também da estabilidade da proteína as condições ambientais como sua resistência a ação das proteases (CHOI et al., 2006; COS et al., 2005).

Para expressar e secretar proteínas recombinantes em *P. pastoris* são utilizados vetores obtidos comercialmente. O vetor pPICZαB (INVITROGEN, 2010) de 3,6kb, possui múltiplos sítios de clonagem com dez sítios de restrição únicos que

permitem uma eficiente inserção do gene. Proteínas recombinantes são expressas fusionadas a um peptídeo N-terminal que codifica a sequência sinal do fator- α de *S. cerevisiae*, responsável pela secreção das proteínas expressas. Este vetor permite alto nível de expressão através da indução do gene AOX1 por metanol, além de facilitar a clonagem devido a presença de um peptídeo C-terminal. Para a seleção dos recombinantes, este vetor possui um gene de resistência a zeocina, tanto para as etapas de propagação em *E. coli*, quanto para expressão em *P. pastoris*. Para a detecção e purificação da proteína recombinante, este vetor possui também uma cauda de polihistidina C-terminal que permite a detecção da proteína de fusão através de anticorpos anti-His tag e a purificação através de resina de níquel (INVITROGEN, 2010). O mapa do vetor pPICZ α B é mostrado na Figura 1:

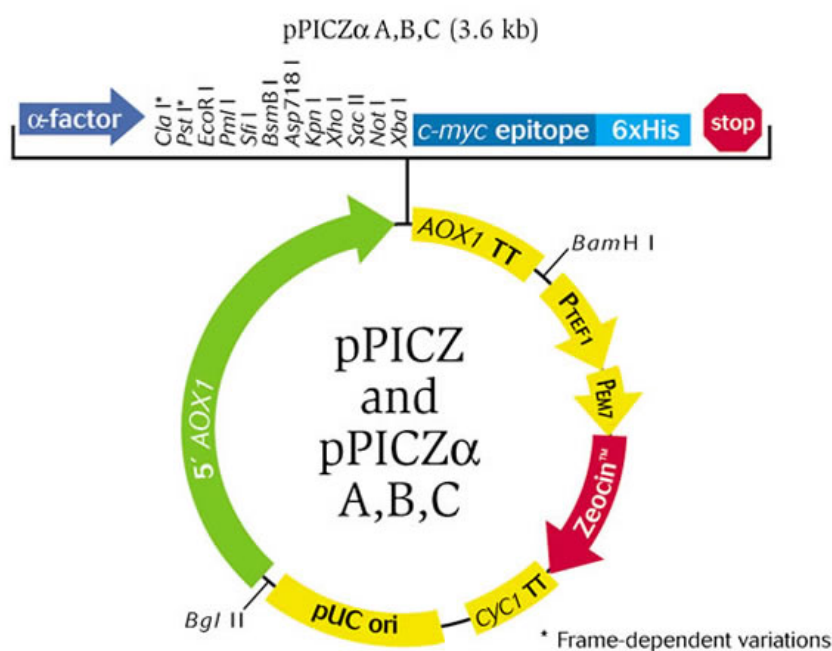


Figura 1: Mapa do vetor de expressão pPICZ α B, mostrando: pUC ori - origem de replicação em *E. coli*; 5' AOX1 - fragmento contendo o promotor AOX1; região de múltiplos sítios de clonagem; epítipo *myc-c* para detecção da proteína através de anticorpos; 6xHis - cauda de 6x Histidina para detecção e purificação da proteína; AOX1 TT - terminador de transcrição; P_{TEF1} - promotor de *transcription elongation factor 1* que dirige a expressão do gene de resistência a zeocina; e *cyc* TT - terminador de transcrição de *S. cerevisiae*.

Fonte: INVITROGEN, 2010.

Por possuírem o gene AOX1, a maioria das cepas de *P. pastoris* possuem fenótipo Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*) e, com isso, crescem rapidamente em metanol. Por possuir apenas o gene AOX2 (devido a uma deleção no gene AOX1, parcialmente substituído pelo ARG4 de *S. cerevisiae*), a cepa KM71H possui lento

crescimento em metanol, com fenótipo Mut^s (*Methanol Utilization Slow*), o que a torna mais eficaz, além de não necessitar de grandes quantidade de metanol para a indução da expressão de proteínas (CREGG et al., 2000).

4 Metodologia

4.1 Clonagem do gene codificador para gE

4.1.1 Propagação dos vetores pUC/gE e pPICZαB

Para a produção da proteína gE recombinante (rgE) de herpesvírus bovino foi obtido o vetor pUC18 contendo o gene codificador para tal proteína (1682 pb), desenhado a partir de uma sequência consenso obtida através das sequências de gE de BoHV-1 e 5 disponíveis no genbank. Foi realizada propagação do vetor de clonagem pUC18 contendo o gene sintético (pUC/gE), através da transformação de *E. coli* cepa DH5α por choque térmico. Após a transformação, foi adicionado 500μL de meio Luria-Bertani (LB – Triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%), e incubado à 37°C durante 1h30min. Então, o pré-inóculo foi semeado por espalhamento em LB sólido contendo ampicilina (100μg/mL) para posterior seleção dos clones recombinantes. As placas foram incubas à 37°C *overnight*. Simultaneamente, foi realizada a propagação do vetor pPICZαB de acordo com o mesmo protocolo utilizado para propagação do vetor pUC/gE, porém o meio utilizado foi LB *low-salt* (Triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% - pH 7,5) contendo zeocina (25μg/mL). Para ambos os vetores, as colônias isoladas foram cultivadas em meio líquido à 37°C *overnight*. A extração do DNA plasmidial foi realizada com kit Purelink Quick Mini 50 (Invitrogen).

4.1.2 Digestão dos vetores pUC/gE e pPICZαB

Então, procedeu-se com a digestão do pUC/gE, utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI* (Invitrogen), para liberação do inserto. As mesmas enzimas foram utilizadas para digestão do vetor de expressão pPICZαB, para posterior

ligação do gene a este vetor. Após ambas as digestões, as mesmas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Ludwig). Para a obtenção do gene, realizou-se a excisão da banda referente ao inserto (1682pb), sua purificação através do kit PL Quick Gel Extract and PCR (Invitrogen) e nova eletroforese em gel de agarose 1% para checagem.

4.1.3 Ligação do gene codificador para a gE ao pPICZ α B

Após a verificação das digestões, foi realizada a ligação do gene ao vetor de expressão pPICZ α B, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* cepa DH5 α por choque térmico. As bactérias transformadas foram semeadas em meio LB *low-salt* ágar contendo zeocina como agente seletivo. Das colônias que cresceram, as que estavam mais isoladas das demais foram transferidas para meio LB *low-salt* líquido, contendo zeocina, para posterior extração de DNA plasmidial, realizada de acordo com o protocolo de lise alcalina com SDS (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e confirmada com kit Purelink Quick Mini 50 (Invitrogen).

4.1.4 Triagem das colônias recombinantes

Após checagem da extração, os clones que aparentavam ter o tamanho esperado foram selecionados para extração de DNA plasmidial através de kit Purelink Quick Mini 50 (Invitrogen), e posterior eletroforese em gel de agarose 1%, a fim de analisar com maior clareza o potencial dos clones recombinantes. O DNA extraído dos clones foi submetido à digestão com as enzimas *EcoRI* e *KpnI*, para verificar se seriam recombinantes, através da liberação do inserto.

4.2 Preparo de células competentes de *Pichia pastoris*

As células competentes de *P. pastoris* cepa KM71H foram preparadas conforme recomendações do “*Pichia* Expression Kit” (Invitrogen). As células foram primeiramente semeadas, por esgotamento, em meio YPD ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar-ágar 2%) e incubadas à 30°C por 3 dias. Uma

colônia foi cultivada em 5mL de YPD líquido à 30°C sob agitação de 225 rpm, *overnight*. Na manhã seguinte, foram transferidos 150-175µL do pré-inóculo para 250mL de YPD e mais uma vez incubados à 28°C sob agitação de 225 rpm, *overnight*. Ao atingir a D.O.₆₀₀ de 1,3-1,5, o cultivo foi centrifugado a 1500g por 5 min à 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado, com 250mL e 125mL de água MilliQ estéril gelada, por centrifugação a 1500g por 5 min à 4°C. Após a lavagem, as células foram eluídas em 10mL de sorbitol 1M estéril e gelado, novamente coletadas por centrifugação a 1500g, por 15 min, à 4°C, e concentradas em 500µL de sorbitol 1M estéril e gelado. Assim que preparadas, as células foram mantidas resfriadas e imediatamente utilizadas.

4.3 Preparo do DNA plasmidial

Para eficiência da transformação de *P. pastoris* cepa KM71H, é necessário partir de uma elevada concentração de DNA (5-10µg). Para isso, os clones recombinantes foram cultivados em 30mL de meio LB *low-salt* com zeocina, de onde foi realizada extração de DNA plasmidial com kit Purelink Quick Mini 50 (Invitrogen). Para checagem, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%.

Para inserção em *P. pastoris*, o DNA deve estar linear. Para isso, foi escolhido um clone para linearização com a enzima de restrição *SacI* (Invitrogen) e, após análise da linearização por eletroforese em gel de agarose 1%, a reação enzimática foi interrompida com calor (65°C/20 min). O DNA linearizado, foi então extraído com 1 volume de fenol-clorofórmio e, após centrifugação, à fase aquosa foi adicionado 2,5 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, e incubado à -20°C *overnight* para precipitação do DNA. Após centrifugação e três lavagens com etanol 75%, o *pellet* foi eluído em 11 µL de água milliQ. Para checagem, o DNA precipitado foi analisado em gel de agarose 1%.

4.4 Transformação de *Pichia pastoris*

P. pastoris cepa KM71H foi transformada por eletroporação com o vetor pPICZαB/gE, conforme recomendações do “*Pichia* Expression Kit” (Invitrogen). Em uma cubeta de 2mm gelada foi adicionado 5-10µg de DNA e 80µL de células competentes. Posteriormente, a cubeta foi incubada em gelo por 5 min e submetida

à eletroporação em eletroporador “GenePulser” (BIORAD), de acordo com as instruções do fabricante (2 μ F de capacitância, 200 Ω de resistência e 2kV de voltagem). Imediatamente, foi adicionado 1mL de sorbitol 1M gelado à cubeta. O conteúdo foi transferido para um falcon de 15mL e incubado à 30°C, sem agitação, por 1-2h. A partir deste cultivo, 100 μ L e 200 μ L foram semeados em duas placas de YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M e ágar 2%) contendo 100 μ g/mL de zeocina e incubadas à 30°C até formar colônias (3-10 dias). No restante do cultivo foi adicionado 1mL de YPD, incubado à 30°C, sob agitação de 225 rpm por 1h e, após decorrido este tempo, 100 μ L e 200 μ L foram semeados em duas placas de YPDS contendo 100 μ g/L de zeocina e incubadas à 30°C até formar colônias (3-4 dias).

4.5 Triagem das colônias recombinantes por *dot blot*

4.5.1 Seleção de clones secretores da rgE

As colônias isoladas foram selecionadas das quatro placas e transferidas para uma placa de BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100mM, YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, metanol 0,5% e ágar 2%) contendo 100 μ g/mL de zeocina, marcada e numerada. A placa foi incubada à 30°C, e por dois dias foi realizada a indução da expressão da proteína, através da adição de 150 μ L de metanol na tampa da placa.

Após transcorrido o período de indução, foi realizado um *dot blot* das colônias, a fim de analisar, através da reação com anticorpos específicos, a expressão da proteína. Para tal, foi realizado o *imprinting* das colônias em membrana de nitrocelulose (a membrana foi colocada sobre as colônias e incubada à 30°C por 3h). Foram utilizados dois controles para a reação, sendo a proteína LipL32 (que possui cauda de histidina) o controle positivo do anticorpo anti-histidina, e um extrato de BoHV-5 cepa EVI-88 o controle positivo do *pool* de anticorpos anti-BoHV. O bloqueio, para evitar reações inespecíficas, foi realizado com soro fetal bovino 1% diluído em PBS 1x, incubado por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Então, foram adicionados os anticorpos primários, anti-histidina (diluição 1:5000) e o *pool* anti-BoHV (diluição 1:500), e a membrana foi incubada por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Os anticorpos secundários conjugados a

peroxidase, anti-mouse (diluição 1:4000) e anti-bovino (diluição 1:10000) foram adicionados à membrana e incubados à temperatura ambiente por 1h, sob agitação. A reação foi revelada com DAB (3,3'-diaminodbenzidine - 2mL de solução estoque de DAB, 18mL de PBS 1x, 600µL de sulfato de níquel 1% e 20µL de H₂O₂ 30%). Entre cada uma das etapas a membrana foi lavada com PBS-T.

4.5.2 Avaliação da expressão da rgE

As colônias que mostraram maior reação com os anticorpos foram transferidas para meio líquido, a fim de testar sua expressão. A partir da placa de YPD, as colônias foram cultivadas em 10mL de BMGY líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100mM, YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵% e glicerol 1%) contendo 100µg/mL de zeocina, e incubado *overnight* à 30°C, sob agitação de 225 rpm. O cultivo foi centrifugado a 1500g por 5min, para remoção do meio. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* eluído em 7mL de BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100mM, YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵% e metanol 0,5%) e incubado sob agitação de 225 rpm à 30°C. Durante seis dias, foi realizada a indução da expressão da proteína, com a adição de 35µL de metanol 100% e a coleta de 100µL de cada cultivo para posterior checagem da expressão. Estas alíquotas foram centrifugadas a velocidade máxima por 3min, o *pellet* e o sobrenadante foram separados e armazenados à -20°C.

Ao final dos seis dias, foi realizado um *dot blot* com amostras coletadas a cada dia. Para isso, os *pellets* foram eluídos em PBS 1x, e duas membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com 5µL de cada amostra (sobrenadante e pellet dos seis dias, de cada clone). Em uma membrana foi utilizada como controle positivo da anti-histidina a proteína LipL32, e na outra, como controle positivo do *pool* de anticorpos anti-BoHV, foi utilizado um extrato de BoHV-5 cepa EVI-88. As membranas ficaram à temperatura ambiente até as amostras secarem. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente para o *dot blot* das colônias.

5 Resultados

5.1 Clonagem do gene codificador para gE

A análise do padrão de bandas resultante na eletroforese após a extração do DNA plasmidial dos plasmídeos propagados, confirmou o tamanho esperado do vetor pUC/gE circular (≈ 4368 pb) (Figura 2). Na figura 3, o pPICZ α B circular sem o gene de interesse (≈ 3600 pb) também foi confirmado, já que aparece no tamanho esperado e com mais de 10000 pb, que pode ser devido a diferentes níveis de superenrolamento do plasmídeo, o que só será confirmado após a digestão.

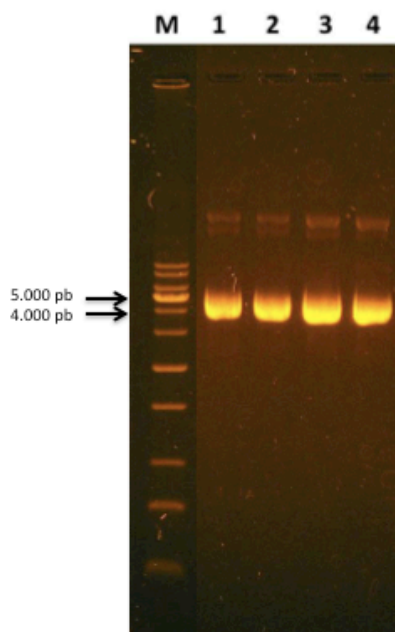


Figura 2: Análise da propagação do vetor pUC/gE. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1-4: pUC/gE.

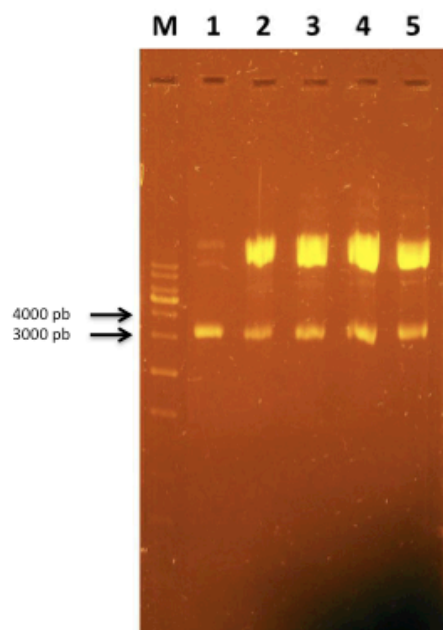


Figura 3: Análise da propagação do vetor pPICZ α B. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZ α B controle; 2-5: pPICZ α B.

Os vetores pUC/gE e pPICZ α B foram linearizados, como é possível visualizar na Figura 4. Desta forma, houve a liberação do inserto (gene codificador para a gE) do vetor pUC e clivagem do pPICZ α B para posterior ligação.

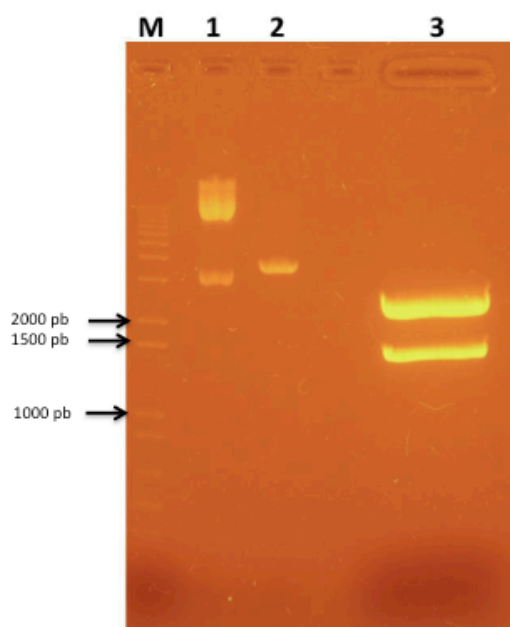


Figura 4: Análise da digestão enzimática dos vetores pUC/gE e pPICZ α B. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZ α B não digerido; 2: pPICZ α B digerido; 3: pUC/gE digerido.

A banda com o tamanho do gene codificador para a gE (≈ 1682 pb) foi excisada do gel e, após purificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose para checagem (Figura 5).

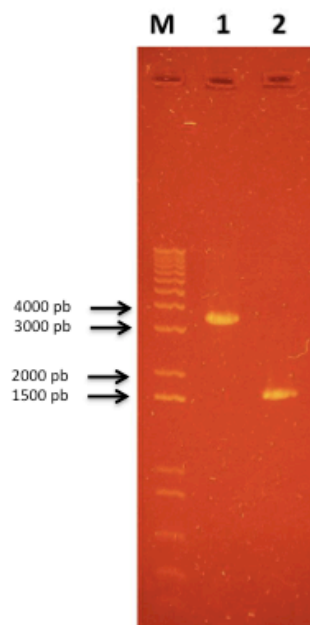


Figura 5: Análise da integridade do gene codificador para a gE após purificação. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZ α B linearizado; 2: gE linearizada.

Após verificação da digestão e ligação do gene ao vetor pPICZ α B, a transformação de *E. coli* cepa DH5 α por choque térmico foi realizada com sucesso. As colônias que estavam mais isoladas das demais foram transferidas para meio LB *low-salt* líquido, contendo zeocina, para posterior extração de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS, para triagem das colônias recombinantes (Figura 6).

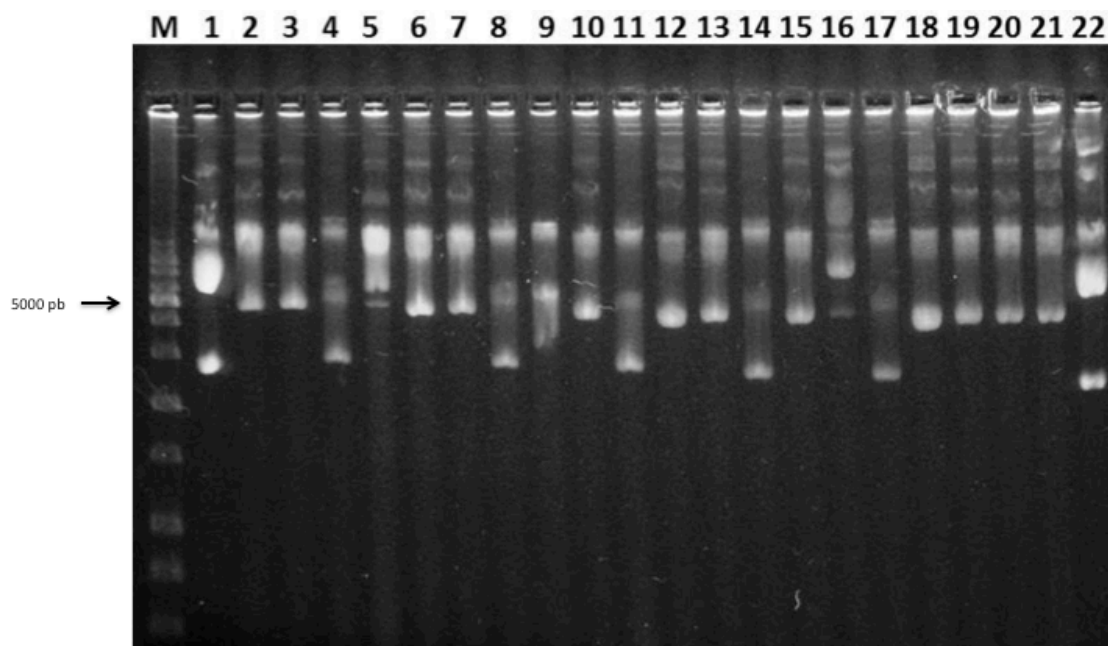


Figura 6: Triagem dos clones recombinantes através da extração do DNA plasmidial por lise alcalina com SDS. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZ α B circular; 2: gE1; 3: gE2; 4: gE3; 5: gE4 ; 6: gE5; 7: gE6; 8: gE7; 9: gE8; 10: gE9; 11: gE10; 12: gE11; 13: gE12; 14: gE13; 15: gE14; 16: gE15; 17: gE16; 18: gE17; 19: gE18; 20: gE19; 21: gE20; 22: pPICZ α B circular.

O DNA plasmidial dos clones que aparentavam ter o tamanho esperado (gE1, gE4, gE5, gE15, gE17 e gE18) foi extraído com kit de extração e submetido a eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença do inserto (Figura 7.).

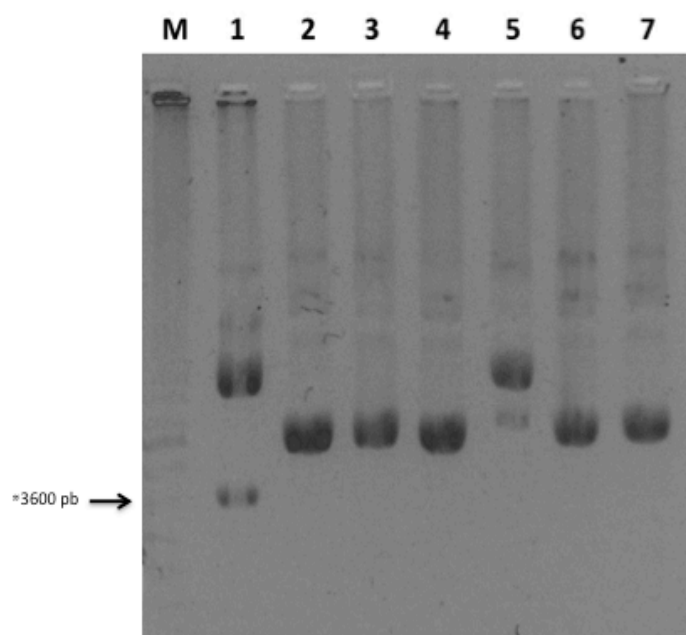


Figura 7: Triagem dos clones recombinantes através da extração do DNA plasmidial por kit comercial. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular; 1: pPICZ α B circular; 2: gE1; 3: gE4; 4: gE5; 5: gE15 ; 6: gE17; 7: gE18.

Dos clones representados na figura anterior, gE1, gE4, gE15, gE17, gE18, aparentam ter o gene recombinante, pois liberam o inserto no tamanho esperado (≈ 1682 pb) após digestão com as enzimas *EcoRI* e *KpnI* (Figura 8). O clone escolhido para a continuidade do experimento foi o gE4.

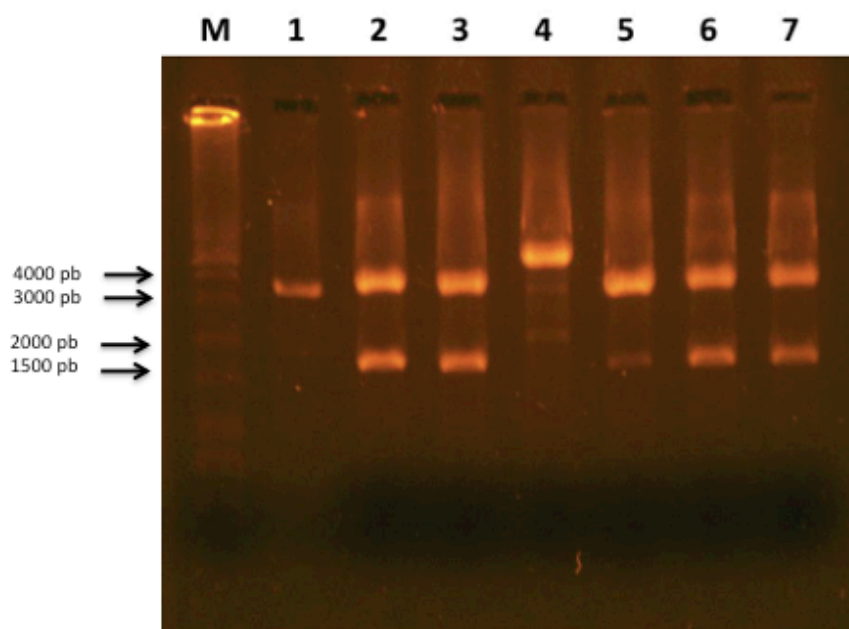


Figura 8: Análise da digestão enzimática dos possíveis clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZ α B linear; 2: pPICZ α B/gE1; 3: pPICZ α B/gE4; 4: pPICZ α B/gE5; 5: pPICZ α B/gE15; 6: pPICZ α B/gE17; 7: pPICZ α B/gE18.

5.2 Preparo do DNA plasmidial

A quantidade de DNA plasmidial obtida está mostrada na Figura 9, sendo possível visualizar, quando comparado ao padrão de bandas do Lambda HindIII, que o DNA encontra-se muito concentrado ($\approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Sendo assim, a quantidade obtida é suficiente para transformação de *P. pastoris*.

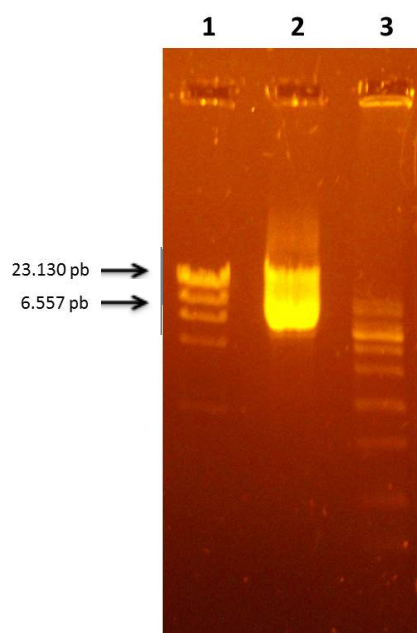


Figura 9: Extração do DNA plasmidial com kit comercial para análise da concentração. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde 1: Lambda HindIII (Fermentas); 2: pPICZαB/gE4; 3: Ladder 1Kb (Ludwig).

A linearização do vetor pPICZαB/gE4, para posterior inserção em *P. pastoris*, com a enzima de restrição *SacI* foi analisada em gel de agarose (Figura 10).

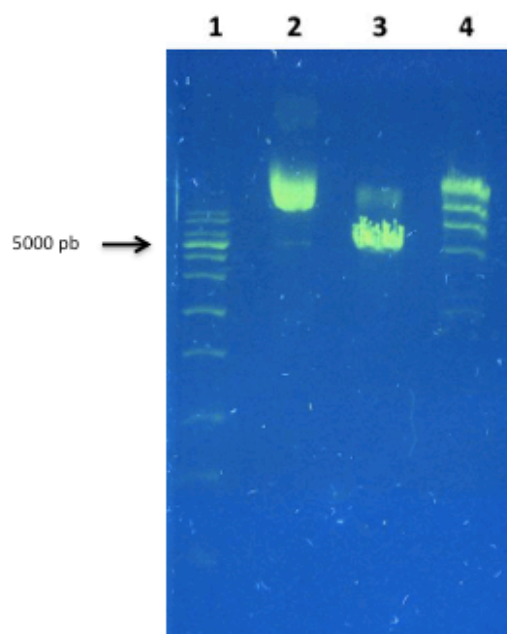


Figura 10: Análise da linearização do vetor pPICZαB/gE com a enzima de restrição *SacI*. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde 1: Marcador molecular 1Kb (Ludwig); 2: pPICZαB/gE4 não digerido; 3: pPICZαB/gE4 linearizado; 4: Lambda HindIII (Fermentas).

A análise da extração e precipitação do DNA linearizado se deu através de eletroforese em gel de agarose. Foi possível visualizar que a concentração diminuiu consideravelmente após estes passos (Figura 11).

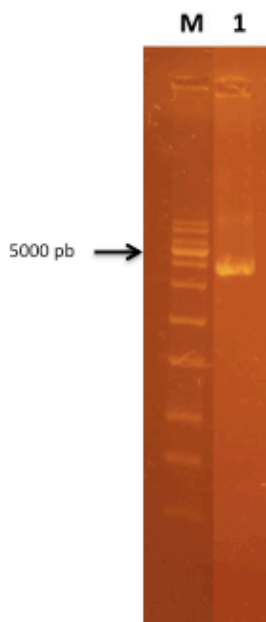


Figura 11: Análise da precipitação do DNA para posterior transformação de *P. pastoris*. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M: Marcador molecular Ladder 1Kb (Ludwig); 1: pPICZαB/gE4 linearizado e precipitado.

5.3 Transformação de *Pichia pastoris*

A transformação de *P. pastoris* cepa KM71H mostrou-se eficaz, pois, após o tempo de incubação, foi possível visualizar o crescimento de colônias isoladas nas placas contendo zeocina como agente seletivo. Desta forma, as leveduras que não continham o plasmídeo pPICZαB/gE4 não seriam capazes de crescer neste meio.

5.4 Triagem das colônias recombinantes

O *dot blot* para análise das colônias recombinantes mostrou que houve reação com o *pool* anti-BoHV e com anti-histidina, sendo este um indício da expressão da proteína rgE (Figura 12).

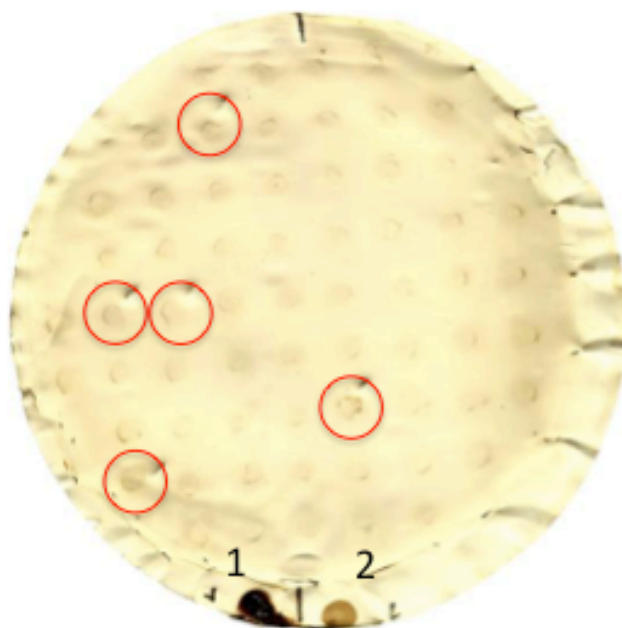


Figura 12: Avaliação da expressão da rgE em *P. pastoris*. *Dot blot* das colônias, utilizando como anticorpo primário *pool* anti-BoHV e anti-histidina. 1: BoHV cepa EVI-88 (controle positivo do *pool* anti-BoHV); 2: LipL32 (controle positivo do anti-histidina); Círculos vermelhos: colônias escolhidas para testar a expressão em meio líquido.

Os *dot blots* realizados ao final dos seis dias de indução dos cultivos, mostraram, mais uma vez, reação tanto com o *pool* anti-BoHV (Figura 13) quanto com a anti-histidina (Figura 14). As amostras do sobrenadante mostraram maior reação do que as do *pellet*, confirmando a característica deste plasmídeo de secreção da proteína para o meio.

D1s	D1s	D1s	D1s	D1s	D2s	D2s	D2s	D2s
6	28	29	49	53	6	28	29	49
D2s	D3s	D3s	D3s	D3s	D3s	D4s	D4s	D4s
50	6	28	29	49	53	6	28	29
D4s	D4s	D5s	D5s	D5s	D5s	D5s	D6s	D6s
49	53	6	28	29	49	53	6	28
D6s	D6s	D6s	D1p	D1p	D1p	D1p	D1p	D2p
29	49	53	6	28	29	49	53	6
D2p	D2p	D2p	D2p	D3p	D3p	D3p	D3p	D3p
28	29	49	53	6	28	29	49	53
D4p	D4p	D4p	D4p	D4p	D5p	D5p	D5p	D5p
6	28	29	49	53	6	28	29	49
D5p	D6p	D6p	D6p	D6p	D6p		C+	
53	6	28	29	49	53		(C+)	

Figura 13: Análise da expressão da rgE em meio líquido, através da reação em *Dot blot* com *pool* anti-BoHV como anticorpo primário. D1s: sobrenadantes do dia 1; D2s: sobrenadantes do dia 2; D3s: sobrenadantes do dia 3; D4s: sobrenadantes do dia 4; D5s: sobrenadantes do dia 5; D6s: sobrenadantes do dia 6; D1p: *pellets* do dia 1; D2p: *pellets* do dia 2; D3p: *pellets* do dia 3; D4p: *pellets* do dia 4; D5p: *pellets* do dia 5; D6p: *pellets* do dia 6. C+: controle positivo – extrato de BoHV-5 cepa EVI-88.

D1s	D1s	D1s	D1s	D1s	D2s	D2s	D2s	
6	28	29	49	53	6	28	29	
D2s	D2s	D3s	D3s	D3s	D3s	D3s	D4s	
49	53	6	28	29	49	53	6	
D4s	D4s	D4s	D4s	D5s	D5s	D5s	D5s	
28	29	49	53	6	28	29	49	
D5s	D6s	D6s	D6s	D6s	D6s	D1p	D1p	
28	6	28	29	49	53	6	28	
D1p	D1p	D1p	D2p	D2p	D2p	D2p	D2p	D3p
29	49	53	6	28	29	49	53	6
D3p	D3p	D3p	D3p	D4p	D4p	D4p	D4p	D4p
49	53	6	28	29	49	53	6	28
D5p	D5p	D5p	D5p	D5p	D6p	D6p	D6p	D6p
28	29	49	53	6	28	29	49	53
						C+		D6p

Figura 14: Análise da expressão da rgE em meio líquido, através da reação em *Dot blot* com anti-histidina como anticorpo primário. D1s: sobrenadantes do dia 1; D2s: sobrenadantes do dia 2; D3s: sobrenadantes do dia 3; D4s: sobrenadantes do dia 4; D5s: sobrenadantes do dia 5; D6s: sobrenadantes do dia 6; D1p: *pellets* do dia 1; D2p: *pellets* do dia 2; D3p: *pellets* do dia 3; D4p: *pellets* do dia 4; D5p: *pellets* do dia 5; D6p: *pellets* do dia 6. C+: controle positivo – proteína LipL32.

6 Discussão

O presente trabalho descreve a clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus bovino 1 e 5. Esta proteína recombinante é um importante alvo para produção de anticorpos monoclonais que poderão ser utilizados no desenvolvimento de um teste de diagnóstico capaz de diferenciar animais vacinados contra BoHV1 e/ou 5 dos naturalmente infectados com estes vírus. Desta forma, tornará mais fácil a descoberta precoce da doença, acarretando em benefícios para os produtores e para a pecuária, com o correto diagnóstico dos animais infectados, sendo possível o isolamento dos mesmo a fim de não contaminar o rebanho, levando a diminuição dos prejuízos causados a bovinocultura.

A gE é uma glicoproteína não-essencial na replicação viral *in vitro* ou *in vivo* (KAASHOEK et al., 1995; KAASHOEK et al., 1998) e desta forma, quando deletada para o desenvolvimento de uma vacina, não interfere na resposta imune do hospedeiro. Cepas de BoHV-1/5 com deleção da gE (gE⁻) já foram desenvolvidas (MUYLKENS et al., 2006; FRANCO et al., 2007) e vacinas gE⁻ foram recentemente testada (CAMPOS et al., 2011; EL-KHOLY et al., 2013), provando que cada vez estão mais próximas de serem utilizadas para imunização de rebanhos, tornando necessária a utilização de testes de diagnósticos diferenciais.

Nos testes de diagnóstico convencionais, os antígenos utilizados para a produção dos mAbs são, geralmente, obtidos de um extrato viral total, onde a gE encontra-se associada a outras glicoproteínas do envelope, comumente gl (complexo gE/gl). Porém, estes ELISAs apresentam baixa especificidade devido a presença massiva de anticorpos dirigidos a outras glicoproteínas do envelope que não a gE (LEHMANN et al., 2004). Além disso, Kaashoek et al., 1995 relataram, através do desafio destas cepas com um painel de mAbs anti-gE, uma variabilidade entre a gE de diferentes cepas de BoHV-1. Devido a estes fatos, a expressão da rgE a partir de um gene sintético desenhado com uma sequência consenso obtida através das sequências de gE de BoHV-1 e 5 disponíveis no genbank, pode representar uma alternativa para frente a esta grande variabilidade genética.

Desta forma, a utilização do modelo biológico *P. pastoris* para a produção de glicoproteína virais mostrou-se eficaz (DUMMER et al., 2009), devido a capacidade desta levedura de manter as características necessárias para a efetividade da proteína. Além disso, depende de meio de cultura simples e fácil indução da

expressão de proteína com metanol (CEREGHINO et al., 1999; CREEG et al., 2000), tornando sua manipulação mais acessível e menos onerosa.

7 Conclusões e Perspectivas

O gene sintético codificador para gE de BoHV1/5 foi clonado com sucesso no vetor de expressão pPICZαB. Os resultados obtidos evidenciam a expressão da proteína rgE em sistema eucarioto *P. pastoris*, porém se faz necessária a realização de outros testes para a análise da expressão da proteína, sendo o *western blot* o próximo passo para a triagem da presença da proteína rgE.

Após a confirmação da expressão da proteína rgE, sua antigenicidade será avaliada frente a soros de animais naturalmente infectados com BoHV e animais vacinados com uma cepa de BoHV gE⁻. Então, o experimento será continuado com a inoculação de camundongos para produção de mAbs para o desenvolvimento de um ELISA de bloqueio diferencial capaz de diferenciar animais naturalmente infectados pelo BoHV-1 e/ou 5 ou vacinados contra os mesmos.

Referências

ACKERMANN, M.; ENGELS, E. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.293–302, 2006.

ANZILIERO, D.; SANTOS, C. M. B.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; CHOWDHURY, S. I.; FLORES, E. F. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p.14–22, 2011.

ASHBAUGH, S. E.; THOMPSON, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J. K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.387–394, 1997.

BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**. v.53, p.31-42, 1996.

BOETTNER M., PRINZ B., HOLZ C., STAHL U., LANG C. 2002. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.51–62.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; CHOWDHURY, S. I. Construction and growth properties of bovine herpesvirus type 5 recombinants defective in the glycoprotein E or thymidine kinase gene or both. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.2, p.217-224, 2010.

CAIXETA, Suzana Pereira de Melo Borges. **Análise antigênica de herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) com anticorpos monoclonais**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.67–73, 2009.

CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H. F.; ARANTES, T. S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F. E.; BRITO, W. M.; FILHO, H. C.; BATISTA, H. B.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. Efficacy of an

inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.148, p.18-26, 2011.

CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; AMES, A. D.; COLLINS, J. K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.134–139, 1999.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p.45-66, 2000.

CHOI D. B.; PARK, E. Y. Enhanced production of mouse α -amilase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p.390-397, 2006.

COHRS, R. J.; GILDEN, D. H. Human Herpesvirus Latency. **Brain Pathology**, v.11, p.465-474, 2001.

COS, O.; SERRANO, A.; MONTESINOS, J. L.; FERRER, P.; CREEG, J.M.; VALERO, F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-batch culture. **Journal of Biotechnology**, v.116, p.321-335, 2005.

DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order *Herpesvirales*. **Archives of Virology**, v.154, p.171–177, 2009.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, p.10339–10347, 2003.

DONKERSGOED, J. V.; BABIUK, L. A. Diagnosis and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v.86, n.1, p.86-94, 1991.

DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; SOUZA, L. L.; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v.161, p.84–90, 2009.

EL-KHOLY, A. A; ABDOU, E. R.; RADY, D. I.; ELSEAFY, M. M. Baculovirus expression and diagnostic utility of the glycoprotein E of bovine herpesvirus-1.1 Egyptian strain “Abu-Hammad”. **Journal of Virological Methods**, v.191, p.33-40, 2013.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.

FAVA, C. D.; PITUCO, E. M.; D’ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-I): revisão e situação atual no Brasil. **Revista Educação Continuada – CRMV-SP**, v.5, n.3, p.300-312, 2002.

FAVIER, P. A.; MARIN, M. S.; PÉREZ, S. E. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. **Open Veterinary Journal**, v.2, p.46-53, 2012.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**, 2^a ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.

FRANCO, A. C.; HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, A. P.; BATISTA, H. B. C. R.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. M. Construction and characterization of a bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gl, gE and US9 genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.667-673, 2007.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: Isolation and characterization of the causal agent. **The Australian Veterinary Journal**, p.216-221, 1962.

GIBBS, E. P.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.

GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A.; LOBATO, Z. I. P.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; LEITE, R. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.2, p.217-220, 2002.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, J. R.; VARELA, A. P. M.; CENCI, A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.767-773, 2009.

HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, A. P.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P. A.; SILVA, A. D.; SPILKI, F. R.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gl, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, p.187–196, 2005.

INVITROGEN, **EasySelect™ Pichia Expression Kit**: For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. User manual. Cat. nº. K1740-01, Manual part nº. 25-0172, 2010.

INVITROGEN, **pPICZα A, B, and C**: *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins. User manual. Cat. nº. V195-20, Manual part nº. 25-0150, 2010.

KAASHOEK, M.J.; MOERMAN, A.; MADIC, J.; WEERDMEESTER, K.; MARISVELDHUIS, M.; RIJSEWIJK, F. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, v.13, n.4, p.342-346, 1995.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; RUULS, R.C.; KEIL, G. M.; THIRY, E.; PASTORET, P. P.; VAN OIRSCHOT, J. T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gl, gE, or in both the gl and gE gene. **Vaccine**, v.16, n.8, p.802-809, 1998.

LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. **Veterinary Microbiology**, n.104, p.1–17, 2004.

LEVINGS, R. L.; ROTH, J. A. Immunity to bovine herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology. **Animal Health Research Reviews**, n.14, v.1, p.103–123, 2013.

MAIDANA, S. S.; LADELFA, M. F.; PÉREZ, S. E.; LOMÓNACO, P. M.; ZAJAC, M. P. D. M., ODEÓN, A.; VIERA, J. B.; COMBESSIES, G.; FONDEVILA, N.; PALACIOS, M.; THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Veterinary Research**, n.7, v.8, p.1-8, 2011.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, p.633–652, 2001.

MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; SCHYNTS, F.; FARNIR, F.; POURCHET, A.; BARDIAU, M.; GOGEV, S.; THIRY, J.; CUISENAIRE, A.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. **Journal of General Virology**, v.87, p.2149–2154, 2006.

NOHR, J., KRISTIANSEN K., KROGSDAM, A., M. Protein expression in yeasts. **Methods Molecular Biology**, v.232, p.111-25, 2003.

ROEHE, P. M. Diagnóstico de enfermidades víricas de bovinos. In: I Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Conesul. Editora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS. p.73-78, 1996.

ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.41-44, 1997.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v.146, n.20, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family *Herpesviridae*: An update. **Archives of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. Víroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 26, p.323-332, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 3ª edição, 2001. 2368p.

SANTOS, C. M. B.; ANZILIERO, D.; BAUERMANN, F. V.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both, gE/ TK. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.31, v.4, p.319-325, 2011.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, n.53, p.17-29, 1996.

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S. O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A. P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P. M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, v.24, p.3313–3320, 2006.

THIRY, E.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; THIRY, J.; VANDERPLASSCHEN, A.; SCHYNTS, F. Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, n.113, p.171–177, 2006.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.12, p.20-22, 2000.

TRAESEL, C. K.; SILVA, M. S.; SPILKI, F. R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 30 region of glycoprotein C gene of South American bovine herpesviruses 1 and 5. **Research in Veterinary Science**, n.94, p.178–185, 2013.

VAN ENGELBURG, F. A. C.; KAASHOEK, M. J.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. M. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. **Journal of General Virology**, n.76, p.2387-2392, 1995.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; STEGEMAN, J. A. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v.44, p.75-81, 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; WEERDMEESTER, K.; RIJSEWIJK, F. A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v.67, n.1, p.23-34, 1997.

VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v.73, p.195-205, 1999.

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002.

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of Bovine Herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4512-4520, 2003.

WEIBLEN, R.; BARROS, C. S. L.; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. Bovine meningoencephalites from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, n.24, p.666-667, 1989.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L.F.; REBELATO, M.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.341-343, 1992.

WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v.72, p.9561-9566, 1998.

ZAJAC, M. P. D. M.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P. I.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.327-334, 2006.

ZAJAC, M. P. D. M.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, p.138-145, 2010.