

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo  
1 em *Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade**

**Paulo Ricardo Centeno Rodrigues**

Pelotas, 2018

**Paulo Ricardo Centeno Rodrigues**

**Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo  
1 em *Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Professor Doutor Fábio Pereira Leivas Leite

Coorientador: Professor Doutor Marcelo de Lima

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R696c Rodrigues, Paulo Ricardo Centeno

Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo 1 em *Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade / Paulo Ricardo Centeno Rodrigues ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Marcelo de Lima, coorientador. — Pelotas, 2018.

67 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Rinopneumonite. 2. EHV-1. 3. Abortamento viral. 4. Vacinação. 5. Equídeocultura. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Lima, Marcelo de, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Paulo Ricardo Centeno Rodrigues

Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo 1 em  
*Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31/08/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo de Lima (Coorientador)  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Luiz Zanni  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha  
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Santa Maria

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado aos meus filhos, César, Natália e Bruno.

## Agradecimentos

Uma Dissertação ou uma Tese não é uma construção solitária, é obra de muitas mãos, especialmente quando envolve experimentação, por isso se faz necessário os agradecimentos, entretanto, corremos o risco de esquecer alguém que num determinado momento dessa construção foi fundamental para a conclusão de um procedimento. Desse modo, de antemão, vou pedindo desculpas se por acaso esquecer de nominar alguém, saiba que você também foi importante, muito obrigado amigos e amigas não lembrados neste agradecimento.

Inicialmente agradeço aos meus orientadores, Professores Fábio e Marcelo, pela acolhida, pelo conhecimento e pelas ideias que tornaram este Projeto de Pesquisa uma realidade.

Agradeço aos colegas do Labvir UFPEL, Professores Gilberto, Geferson e Silvia por compreenderem minhas ausências, aos Técnicos José Carlos (Zeca) e Cloé pela ajuda em todos os momentos, aos Doutorandos, Mestrandos e Estagiários, especialmente à Cristina, Tony, Matheus e Leonardo pelo auxílio em muitos procedimentos ao longo dos experimentos.

Um agradecimento especial para Dona Márcia, a mãe querida de todos nós do Labvir, sempre ativa, disposta e pronta para uma reprimenda quando nos queixamos sem razão.

Agradeço aos Doutorandos, Mestrandos e Estagiários dos Laboratórios 4 e 11 do CDTec UFPEL, especialmente ao Alceu, Jorge William, Francisco Denis, Vitória Gonçalves, Pedro e Guilherme, pelos ensinamentos e pelo auxílio valioso em todas as etapas do Projeto de Pesquisa.

Agradeço ao colega Rodrigo Casquero Cunha pelos ensinamentos sobre a *Pichia pastoris*, pela paciência de um monge budista e a valiosa contribuição na construção do plasmídeo sintético pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1.

Agradeço aos amigos Mara (CDTec Lab. 7) e Marcos (CDTec Lab. 6) pela ajuda e disponibilidade em vários momentos da experimentação.

Agradeço ao Professor Alan e ao Matheus pela assistência durante a purificação dos diversos cultivos de *Pichia pastoris*.

Agradeço à colega Paula Finger pela ajuda valiosa no momento de realizar o *Western blot* salvador.

Agradeço à colega Anelize e aos funcionários do Biotério Central/UFPEL, pela cooperação e dedicação durante a experimentação com os camundongos.

Agradeço a minha família, César e Márcia, Natália e Felipe, Bruno, Patrick e Carla, pela compreensão durante minhas ausências, e pela alegria e afeto nos reencontros.

Agradeço a minha família Pelotense, Tia Odete, Magda e Marisa, pelo carinho e acolhida no Fragata, o famoso bairro cidade.

Agradeço muito especialmente a minha irmã Norma e ao meu cunhado e Orientador de Mestrado, Luiz Alberto, pelo incentivo para galgar mais um degrau na minha carreira profissional.

Por fim, agradeço à espiritualidade, muito presente no meu dia a dia, herança recebida dos meus pais, Carlos e Ivette, que me ensinaram o valor da prece e da fé em Deus, nosso criador.

***“Aquí me pongo a cantar  
al compás de la vigüela,  
que el hombre que lo desvela  
una pena extraordinaria,  
como la ave solitaria  
con el cantar se consuela.***

***Pido a los santos del cielo  
que ayuden mi pensamiento:  
les pido en este momento  
que voy a cantar mi historia  
me refresquen la memoria  
y aclaren mi entendimiento.***

***Vengan santos milagrosos,  
vengan todos en mi ayuda,  
que la lengua se me añuda  
y se me turba la vista;  
pido a mi Dios que me asista  
en una ocasión tan ruda.”***

***José Hernández (Martin Fierro).***



## Resumo

RODRIGUES, Paulo Ricardo Centeno. **Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo 1 em *Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade.** 2018. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O herpesvírus equídeo 1 (EHV-1) apresenta distribuição mundial e causa graves prejuízos à equídeocultura e a cadeia produtiva desse agronegócio, como agente de surtos de doença respiratória, reprodutiva e neurológica, em animais jovens e adultos. A glicoproteína D do EHV-1 (gDEHV-1) é uma glicoproteína do envelope, essencial para a penetração do agente em células do hospedeiro e já demonstrou capacidade de induzir proteção contra esse agente em modelos murino e equino. Os objetivos deste trabalho foram: clonar, expressar e demonstrar a imunogenicidade da gDEHV-1 expressa em *Pichia pastoris*, em modelo murino. Para tanto, avaliou-se a resposta imune induzida por duas vacinas: uma formulada com a gDEHV-1 e outra com a gDEHV-1 associada ao EHV-1; frente a três vacinas: uma comercial, formulada com o EHV-1 associado ao EHV-4, outra experimental, formulada com EHV-1, e o controle, formulado com PBS. Em todas as vacinas o adjuvante utilizado foi hidróxido de alumínio a 10%. Os resultados encontrados permitem concluir que a glicoproteína D recombinante do EHV-1, expressa em *P. pastoris*, demonstrou sua antigenicidade e imunogenicidade. Além disso, conservou epítomos que permitiram sua identificação por anticorpos específicos anti-EHV-1 induzidos pelas vacinas, comercial e experimental, formuladas com vírus íntegro inativado. A vacina experimental contendo vírus íntegro (EHV-1) inativado acrescido da glicoproteína D recombinante do EHV-1 foi significativamente superior na indução de anticorpos específicos contra a gDEHV-1, no ELISA indireto, em comparação com as vacinas contendo vírus íntegro ou de subunidades do vírus.

**Palavras-chave:** rinopneumonite; EHV-1; abortamento viral; vacinação; equídeocultura

## Abstract

RODRIGUES, Paulo Ricardo Centeno. **Cloning and expression of the equine herpesvirus type 1 glycoprotein D gene in *Pichia pastoris* and evaluation of its immunogenicity.** 2018. 65f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) has a worldwide distribution and causes serious damage to the equidoculture and the productive chain of this agribusiness, as an agent of outbreaks of respiratory, reproductive and neurological disease, in young and adult animals. EHV-1 glycoprotein D (gDEHV-1) is an enveloped glycoprotein essential for the agent penetration into the host cells and has already demonstrated the ability to induce protection against this agent in murine and equine models. The objectives of this work were: to clone, express and demonstrate the immunogenicity of gDEHV-1 expressed in *Pichia pastoris*, in a murine model. For this, the immune response induced by two vaccines was evaluated: one formulated with gDEHV-1 and another with gDEHV-1 associated with EHV-1; compared to three vaccines: one commercial, formulated with EHV-1 associated with EHV-4, another experimental, formulated with EHV-1, and the control, formulated with PBS. In all vaccines the adjuvant used was 10% aluminum hydroxide. The results showed that recombinant D-glycoprotein EHV-1, expressed in *P. pastoris*, demonstrated its antigenicity and immunogenicity. Also, it conserved epitopes that allowed its identification by commercial and experimental vaccine-induced anti-EHV-1 specific antibodies formulated with inactivated whole virus. The experimental vaccine containing inactivated whole virus (EHV-1) plus the recombinant D-glycoprotein of EHV-1 was significantly superior in the induction of specific antibodies against gDEHV-1 in the indirect ELISA when compared to the vaccines containing whole virus or subunits of the virus.

**Keywords:** rhinopneumonitis; EHV-1; viral abortion; vaccination; equidculture

## Lista de Figuras

Figura 1	Classificação dos herpesvírus equídeos.....	21
Figura 2	Tipos de vacinas víricas.....	28
Figura 3	Principais vacinas contra o herpesvírus dos equídeos.....	30
Figura 4	Metabolismo do metanol.....	37
Figura 5	Vetor de expressão pPICZ $\alpha$ para expressão de proteínas heterólogas em <i>Pichia pastoris</i> .....	39
Figura 6	Plasmídeo sintético pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1 que contém um fragmento de DNA de 1022 pb que corresponde a uma fração da glicoproteína D do herpesvírus equídeo 1.....	44
Figura 7	Esquema demonstrativo do cultivo, com os meios BMGY e BMMY, e indução com metanol de <i>Pichia pastoris</i> estirpe KM71H.	45
Figura 8	Transcrição relativa de mRNA da interleucina 10 nos diferentes grupos vacinais após desafio com concanavalina, gDEHV-1 e EHV-1.....	49
Figura 9	Identificação, em gel de SDS-PAGE 12%, da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em <i>Pichia pastoris</i> , nas frações 4, 5 e 6 da purificação (peso molecular 41 kDa) do sobrenadante do clone Mut <sup>S</sup> 30. M = marcador, 1 = fração 2 da purificação, 2 = fração 3 da purificação, 3 = fração 4 da purificação, 4 = fração 5 da purificação, 5 = fração 6 da purificação, 6 = fração 7 da purificação.....	50
Figura 10	Identificação da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em <i>Pichia pastoris</i> , através da técnica de <i>Western blot</i> , marcada pelo anticorpo monoclonal anti-histidina (2, 3 e 5). M = marcador, 1 = sobrenadante de <i>Pichia pastoris</i> KM71H não transformada, 2 = produto da purificação do sobrenadante de seis clones Mut <sup>S</sup> , 3 = produto da purificação do	

	sobrenadante de seis clones Mut <sup>S</sup> tratados pela enzima Endo H, 4 = produto da purificação do sobrenadante do clone Mut <sup>S</sup> 30, 5 = produto da purificação do sobrenadante do clone Mut <sup>S</sup> 30 tratado pela enzima Endo H.....	51
Figura 11	Identificação da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em <i>Pichia pastoris</i> , através da técnica de <i>Western blot</i> , marcada por anticorpos policlonais anti-EHV-1, peso molecular 41 kDa (2). M = marcador, 1 = sobrenadante de <i>Pichia pastoris</i> KM71H não transformada, 2 = produto da purificação do sobrenadante dos clones Mut <sup>S</sup> 29 e 30.....	52
Figura 12	Níveis de anticorpos específicos contra a glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, detectados por ELISA indireto. Os dados representam as médias em valores de ELISA de IgG total de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, nos diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras ( <i>pool</i> , n=10) usadas na diluição 1:100, em duplicata, títulos expressos na absorvância de 490 nm.....	53
Figura 13	Níveis de anticorpos específicos contra o herpesvírus equídeo 1, detectados por ELISA indireto. Os dados representam as médias em valores de ELISA de IgG total de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, nos diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras ( <i>pool</i> , n=10) usadas na diluição 1:100, em duplicata, títulos expressos na absorvância de 490 nm. ....	54
Figura 14	Os dados representam os títulos de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus equídeo 1, de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, detectados através de vírusneutralização, em diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras ( <i>pool</i> , n=10).....	55

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Vantagens da utilização da levedura <i>Pichia pastoris</i> como sistema de produção de proteínas heterólogas.....	36
Tabela 2	Genótipo e fenótipo de algumas linhagens de <i>Pichia pastoris</i> .....	39
Tabela 3	Composição das vacinas administradas nos grupos experimentais...	46
Tabela 4	Citocinas e $\beta$ -actina com respectivos primers e referências, utilizadas nas reações em cadeia da polimerase, em tempo real.....	48

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AOX	Enzima álcool oxidase
ASH	Herpesvírus asinino
BEI	Bromoetilenimina
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHM	Mieloencefalopatia equina por herpesvírus
EHV	Herpesvírus equídeo
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
E-MEM	Meio essencial mínimo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	Fixação de complemento
gD	Glicoproteína D
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFA	Imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
IPX	Imunoperoxidase
Labvir	Laboratório de Virologia e Imunologia
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAB	Anticorpo monoclonal

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OD	Densidade ótica
OPD	<i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino com 0,05% de <i>Tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIB	Produto interno bruto
PMEDAP	<i>9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
pPICZ $\alpha$	Plasmídeo, vetor de expressão utilizado em <i>Pichia pastoris</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase, em tempo real
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio para cultivo celular, especialmente células hematopoiéticas.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIBIA	<i>Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates</i>
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SNC	Sistema nervoso central
TCID <sub>50</sub> /ml	<i>Tissue culture infection dose</i>
Th	Linfócitos T auxiliares
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
USA	<i>United States of America</i>
VN	Vírusneutralização

## Lista de Símbolos

kb	Quilobase (1000 pares de bases)
Nm	Nanômetro ( $1 \times 10^{-9}$ metro)
>	Maior
°C	Grau Celsius
<	Menor
mm	Milímetro
pb	Pares de bases
$\mu$ l	Microlitro
ml	Mililitro
L	Litro
$\mu$ m	Milimicras
mM	Milimolar
kDa	Quilodaltons



## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Herpesvírus equídeos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>3 Hipótese e Objetivos.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Hipótese.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Objetivo geral.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Objetivos específicos.....</b>	<b>41</b>
<b>4 Metodologia.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Células e vírus.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Extração de DNA viral.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Clonagem.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4 Expressão do gene da glicoproteína D do EHV-1 em <i>Pichia pastoris</i></b>	<b>44</b>
<b>4.5 Purificação e quantificação da glicoproteína D recombinante (rgD)..</b>	<b>45</b>
<b>4.6 Produção das vacinas experimentais.....</b>	<b>46</b>
<b>4.7 Avaliação da resposta imune em modelo murino.....</b>	<b>46</b>
<b>4.8 Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>6 Considerações Finais.....</b>	<b>56</b>
<b>Referências.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>66</b>

## 1 Introdução

A população mundial de equídeos, nas últimas décadas, apresenta-se estável e gira em torno de 113 milhões de cabeças (58,5 milhões de equinos, 43,5 milhões de asininos e 11 milhões de muares). O continente americano abriga 33,5 milhões de equinos, ou seja, 57,2% de toda a população mundial. O Brasil possui o 4º maior rebanho equino do mundo, com 5,6 milhões de cabeças, possui ainda, 1,1 milhão de asininos e 1,3 milhão de muares (ALMEIDA; SILVA, 2010). Segundo o IBGE (2014), o Rio Grande do Sul possui o 2º maior rebanho equino do Brasil (540.815 cabeças), ficando atrás de Minas Gerais (763.780 cabeças) e superando estados como a Bahia (470.761 cabeças), Goiás (385.525 cabeças) e São Paulo (363.380 cabeças). O Complexo do Agronegócio Cavalo contribui com 1,6% do PIB brasileiro, empregando, direta e indiretamente, ao redor de 3,2 milhões de indivíduos nessa cadeia produtiva (LIMA et al., 2006; MAPA, 2016). Esses números e valores demonstram a importância da criação de equídeos para a economia brasileira, americana e mundial.

As enfermidades causadas por herpesvírus em equinos destacam-se pela abrangência mundial e pelos graves prejuízos impostos aos rebanhos. Causam transtornos respiratórios, neurológicos e reprodutivos (AIELLO; MOSES, 2016).

Os herpesvírus equídeos (EHV) pertencem à família *Herpesviridae*, até o presente, foram identificadas nove espécies: EHV-1 (agente do aborto herpético equino), EHV-3 (agente do exantema coital equino), EHV-4 (agente da rinopneumonite viral equina), EHV-6 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 1, ASH-1), EHV-8 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 3, ASH-3), EHV-9 (herpesvírus de gazela tipo 1), pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae*; EHV-2 (herpesvírus equídeo tipo 2), EHV-5 (herpesvírus equídeo tipo 5) e EHV-7 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 2, ASH-2), pertencentes à subfamília *Gammaherpesvirinae* (MARENZONI et al., 2015; MAXWELL, 2017).

O EHV-1 e o EHV-4, entre todos os herpesvírus equídeos, são aqueles que demonstraram importância do ponto de vista clínico, epidemiológico e econômico, pelas severas perdas impostas aos rebanhos infectados mundialmente. Guardam estreita relação genética e antigênica. Apresentam similaridade de 55 a 84% em nível

de nucleotídeos e de 55 a 96% em nível de aminoácidos (FRANCO et al., 2017; PATEL; HELDENS, 2005; TELFORD et al., 1992).

As infecções causadas pelo EHV-1 e pelo EHV-4 são enzoóticas na maioria das populações equinas do mundo e uma fração relevante desses animais apresenta anticorpos contra esses agentes (DIAZ et al., 2015). No Brasil, em 1966, Nilson e Corrêa isolaram o EHV-1, pela primeira vez, de um feto equino abortado. Os mesmos autores haviam registrado o abortamento herpético equino em 1964 (MOREIRA et al., 1998).

No Brasil, levantamentos sorológicos realizados em 8.820 equinos provenientes dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Pará, Minas Gerais, Ceará e Rio de Janeiro, entre 1988 e 2015, apontaram uma soroprevalência contra o EHV que variou de 4,5 a 92,3%, demonstrando a ampla disseminação do vírus no território nacional (ALENCAR-ARARIPE et al., 2014; DIAZ et al., 2015; DIEHL et al., 2006; LARA et al., 2010; MORI, 2005).

O EHV-1 é o maior responsável por abortamento em éguas no terço final da gestação e o EHV-4 é a principal causa de rinopneumonite em potros em nível mundial (FRANCO et al., 2017). Os dois agentes são os maiores responsáveis por doença respiratória em equinos mundialmente (FOOTE et al., 2006).

O valacyclovir demonstrou ação profilática e terapêutica contra uma cepa neuropatogênica do EHV-1, tornando-se uma nova alternativa no tratamento das enfermidades causadas por herpesvírus equídeos (MAXWELL, 2017; MAXWELL et al., 2017).

O controle desse agente se baseia na vacinação do rebanho. Vacinas inativadas e atenuadas são utilizadas com relativo sucesso, porém induzem uma imunidade de curta duração, não impedem o estabelecimento de latência e a proteção contra a doença neurológica e os abortamentos são questionáveis (FRANCO et al., 2017; GOEHRING et al., 2010; KYDD et al., 2006).

Alguns experimentos mostraram a importância da glicoproteína D (gD) do herpesvírus equídeo tipo 1 (EHV-1) na penetração e na disseminação célula-célula desse agente em células do hospedeiro, além do elevado potencial imunogênico. Vacinas de subunidades, utilizando a gD do EHV-1, em modelos murino e equino, revelaram resultados promissores (ZHANG et al., 1998).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* vem sendo bastante utilizada para expressão de proteínas heterólogas, em detrimento de outros sistemas de expressão,

por ser de fácil manipulação genética, expressar proteínas heterólogas em níveis elevados, promover O- e N-glicosilação e processar sequências sinais com rapidez, facilidade e economia. (CEREGHINO; CREGG, 2000).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade da glicoproteína D recombinante do hespervírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, em modelo murino. Buscando novas alternativas, tendo em vista a formulação de vacinas que promovam um maior nível de proteção para equídeos contra o herpesvírus.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Herpesvírus equídeos

Entre as inúmeras enfermidades infecciosas que acometem os equídeos, destacam-se àquelas causadas por herpesvírus, não só pelas graves perdas infligidas como também pela distribuição em nível mundial. Surtos de doença respiratória em potros, abortos, mortalidade de neonatos e, em menor grau, enfermidade neurológica, causados por herpesvírus equídeos, acontecem anualmente em locais de alta concentração de equinos, asininos e muares (AIELLO; MOSES, 2016). O resultado da infecção por esse agente pode ser devastador, especialmente em casos de abortamentos epizooticos (WEIBLEN, 2001).

Conforme Lunn et al. (2009), são três os principais efeitos do herpesvírus sobre os equídeos: ocorrência esporádica de doença respiratória leve associada a piroxia, principalmente em equídeos com menos de dois anos de idade; abortamentos durante o terceiro trimestre de gestação e surtos de doença neurológica (mieloencefalopatia por herpesvírus), causando interrupções nos programas de treinamento esportivo, perdas por infertilidade e abortos, restrições ao movimento e mortalidade, interrupção em programas de criação, dificuldades de manejo em centros esportivos, pistas de corrida, eventos de cavalos e criatórios.

Os herpesvírus equídeos (EHV) pertencem a ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamílias *Alphaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Os vírions contêm uma molécula de DNA de fita dupla linear, um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro que envolve o núcleo, uma camada protéica amorfa (tegumento) que circunda o capsídeo e um envelope lipoprotéico que possui espículas de glicoproteínas na superfície. O envelope tem um diâmetro de aproximadamente 150 nm (FRANCO et al., 2017; WEIBLEN, 2001).

O genoma do EHV-1 possui 150,2 kb e até o momento 76 genes foram descritos, os quais codificam 13 glicoproteínas distintas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gp2, gp21/22a e gp10 (FRANCO et al., 2017; SÁENZ; URCUQUI-INCHIMA, 2006; TELFORD et al., 1992). A gD é uma glicoproteína do envelope,

essencial para a penetração do agente em células do hospedeiro (CSELLNER et al., 2000) e já foi demonstrada sua capacidade de induzir proteção contra a doença. Experimentos utilizando a glicoproteína D do EHV-1 (gDEHV-1) expressa em *Escherichia coli* (WEERASINGHE et al., 2006; ZHANG et al., 1998), baculovírus (FOOTE et al., 2005) e *Pichia pastoris* (RUITENBERG et al., 2001) confirmaram essas potencialidades em modelos murino e equino.

O genoma dos herpesvírus é replicado no núcleo das células hospedeiras e fatores virais e celulares são empregados nesse processo. Da interação com as células e a expressão de certos genes, dois ciclos distintos podem ocorrer: a infecção aguda ou produtiva (ciclo lítico) e a infecção latente. O primeiro evidencia-se pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa, o segundo caracteriza-se pela interrupção do ciclo replicativo logo após a penetração do genoma no núcleo da célula hospedeira, entretanto, sob certas condições (estresse), o genoma é ativado e a expressão gênica é reiniciada, seguindo-se produção de progênie viral e infecção aguda (FRANCO et al., 2017).

A instalação da infecção latente é uma particularidade marcante dos herpesvírus, e revela a elevada capacidade de adaptação desses vírus aos seus hospedeiros. Os herpesvírus equídeos produzem latência em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos, tecidos linfoides e leucócitos periféricos (FRANCO et al., 2017; WEIBLEN, 2001).

O EHV foi descrito pela primeira vez em 1933 por W. W. Dimock e P. R. Edwards da *Kentucky Agriculture Experimental Station*, Lexington e, desde então, a infecção por esse agente e suas consequências têm sido objeto de inúmeros trabalhos e publicações (KYDD et al., 2006).

Em equídeos, até o presente, foram identificados nove herpesvírus: EHV-1 (vírus do aborto herpético equino), EHV-3 (vírus do exantema coital equino), EHV-4 (vírus da rinopneumonite viral equina), EHV-6 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 1, ASH-1), EHV-8 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 3, ASH-3), EHV-9 (herpesvírus de gazela tipo 1), pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae*; EHV-2 (herpesvírus equídeo tipo 2), EHV-5 (herpesvírus equídeo tipo 5) e EHV-7 (homólogo ao herpesvírus asinino tipo 2, ASH-2), pertencentes à subfamília *Gammaherpesvirinae* (Figura 1) (MARENZONI et al., 2015; MAXWELL, 2017).

Ordem	Família	Sub-família	Gênero	Espécie
<i>Herpesvirales</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equid alphaherpesvirus 1</i>
				<i>Equid alphaherpesvirus 3</i>
				<i>Equid alphaherpesvirus 4</i>
				<i>Equid alphaherpesvirus 6</i>
				<i>Equid alphaherpesvirus 8</i>
				<i>Equid alphaherpesvirus 9</i>
		<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Percavirus</i>	<i>Equid gammaherpesvirus 2</i>
				<i>Equid gammaherpesvirus 5</i>
			Não designado	<i>Equid gammaherpesvirus 7</i>

Figura 1 – Classificação dos herpesvírus equídeos. Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2017).

O cavalo (*Equus caballus*) é o hospedeiro natural dos herpesvírus equídeos de 1 a 5, enquanto o asno (*Equus asinus*) é o hospedeiro natural dos herpesvírus equídeos de 6 a 8, e a zebra (*Equus grevyi*) do EHV-9 (MARENZONI et al., 2015).

O EHV-1 e o EHV-4, entre todos os herpesvírus equídeos, são aqueles que demonstraram importância do ponto de vista clínico, epidemiológico e econômico, pelas severas perdas impostas aos rebanhos infectados mundialmente. Até 1981 eram considerados subtipos 1 e 2 do EHV-1, respectivamente. Somente em 1988 essa distinção foi oficialmente reconhecida. Guardam estreita relação genética e antigênica, sendo impossível distinguir os anticorpos contra o EHV-1 dos anticorpos contra o EHV-4 através dos testes sorológicos de rotina. Apresentam similaridade de 55 a 84% em nível de nucleotídeos e de 55 a 96% em nível de aminoácidos (FRANCO et al., 2017; PATEL; HELDENS, 2005; TELFORD et al., 1992).

As infecções causadas pelo EHV-1 e pelo EHV-4 são enzoóticas na maioria das populações equinas do mundo e uma fração relevante desses animais apresenta anticorpos contra esses agentes (DIAZ et al., 2015). No Brasil, em 1966, Nilson e Corrêa isolaram o EHV-1 pela primeira vez, de hamsters lactentes, a partir do fígado de um feto equino abortado. Os mesmos autores haviam registrado o abortamento herpético equino em 1964, através de achados histopatológicos em fetos equinos abortados (MOREIRA et al., 1998). Em 2008, Lara et al. realizaram o primeiro isolamento do EHV-1 proveniente de uma égua com mieloencefalopatia herpética no Brasil.

No Brasil, levantamentos sorológicos realizados em 8.820 equinos provenientes dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Pará, Minas Gerais, Ceará e Rio de Janeiro, entre 1988 e 2015, através de provas de vírusneutralização e de fixação de complemento, apontaram uma soroprevalência contra o EHV que variou de 4,5 a 92,3%, demonstrando a ampla disseminação do vírus no território nacional (ALENCAR-ARARIPE et al., 2014; DIAZ et al., 2015; DIEL et al., 2006; LARA et al., 2010; MORI, 2005).

O EHV-1 e o EHV-4 são transmitidos de forma horizontal, através do contato direto e/ou indireto entre animais que estão excretando o vírus e animais suscetíveis. Isso ocorre durante a infecção aguda ou nas ocasiões em que há reativação da infecção latente. Os animais com infecção latente são importantes fontes de infecção e manutenção da enfermidade nos rebanhos. Em relação ao EHV-1 e o EHV-4 foi demonstrada latência em tecidos linfóides e neurais, sendo que os linfócitos T CD5<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foram definidos como os principais locais de latência para o EHV-1 e os gânglios trigêmeos para o EHV-4. Animais de todas as idades podem ser infectados, entretanto, potros de dois meses até um ano de idade, especialmente no período do desmame, formam o grupo mais suscetível à infecção (FOOTE et al., 2006; FRANCO et al., 2017; PATEL; HELDENS, 2005).

O EHV-1, agente do aborto herpético equino, manifesta-se através de sinais respiratórios, neurológicos, abortamento e mortalidade perinatal, enquanto que o EHV-4, agente da rinopneumonite equina, desenvolve a forma respiratória da doença e nunca esteve associado a surtos epizooticos de abortamento nas raras vezes em que foi isolado desses casos (WEIBLEN, 2001).

O EHV-1 é o maior responsável por abortamento em éguas no terço final da gestação em todo o mundo (SMITH, 2006). Éguas suscetíveis, de modo geral, se infectam durante o contato da mucosa respiratória com fetos abortados, fluidos e restos placentários de éguas que sofreram abortamento causado pelo EHV-1. Nesse momento, o vírus penetra e multiplica-se inicialmente no epitélio da cavidade nasal, faringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Em seguida, passa a infectar leucócitos e células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos, alcança os linfonodos locais e, através das células mononucleares infectadas, penetra na circulação sistêmica, causando uma viremia associada a células, que possibilitará acesso a órgãos internos, locais secundários de replicação viral (FRANCO et al., 2017). Desse modo, o EHV-1 pode, em éguas gestantes, penetrar no útero, cruzar a barreira



transplacentária e causar lesões na placenta e/ou tecidos fetais, ou ainda, com menos frequência, alcançar o sistema nervoso central e causar vasculite, isquemia e infartos hemorrágicos no cérebro, tronco cerebral e medula espinhal (FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006).

A infecção respiratória causada pelo EHV-1 é geralmente assintomática. Nas raras ocasiões que se manifestam, são sinais respiratórios brandos, semelhantes aos causados pelo EHV-4 (FRANCO et al., 2017).

Os abortamentos podem ocorrer a partir do quarto mês de gestação, mas a partir do sétimo mês é quando ocorrem com maior frequência, no nono e no décimo mês em especial, sem sinais prodrômicos ou evidência de doença. Os fetos, na sua grande maioria, são abortados espontaneamente junto com a placenta e estão sempre mortos, fetos autolisados são observados em fêmeas que sofreram abortamento antes dos seis meses de gestação, éguas que se infectam tardiamente durante a gestação podem parir potros vivos, porém, de modo geral, nascem débeis, apresentam dificuldade respiratória e morrem poucos dias depois. O abortamento, com frequência, ocorre dentro de 30 dias após a infecção, mas pode demorar por até 90 dias. A imunidade induzida após abortamento é mais duradoura do que a produzida por doença respiratória, que dura de três a seis meses, sendo que a repetição de abortamento pela mesma fêmea é pouco frequente (FRANCO et al., 2017; KYDD et al., 2006; MORI, 2005; SMITH, 2006).

A mieloencefalopatia equina por herpesvírus (EHM) causada pelo EHV-1 ocorre com menor frequência e sua associação com sinais respiratórios e/ou abortamentos pode ou não estar presente. Animais de todas as idades são suscetíveis, mas éguas prenhes, especialmente nos dois primeiros trimestres de gestação, e potros em aleitamento, aparentemente, são mais afetados. O período de incubação varia de seis a dez dias e a doença apresenta-se de forma aguda: hipertermia ( $>39,7$  °C), ataxia com maior intensidade nos posteriores, deficiências proprioceptivas cognitivas, debilidade, paresia que pode evoluir para tetraplegia, incontinência urinária, dilatação da bexiga com sinais de cólica, ânus e cauda flácidos e áreas variáveis de dessensibilização perineal. A maior gravidade dos sinais clínicos é atingida após 48 horas do início do quadro neurológico, a progressão é variável, alguns animais se estabilizam e melhoram rapidamente após alguns dias, outros morrem em estado de coma ou em convulsão, a taxa de mortalidade varia de  $<1\%$  até  $40\%$  (AIELLO; MOSES, 2016; FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006; WEIBLEN, 2001).

O EHV-4 é a principal causa de rinopneumonite em potros, o período de incubação varia de dois a dez dias, a doença geralmente apresenta-se de forma aguda e cursa com sinais clínicos leves a moderados. Os mais comuns são: hipertermia, anorexia, depressão, conjuntivite, corrimento nasal bilateral copioso, inicialmente seroso, passando a mucopurulento, se houver infecções bacterianas secundárias, aumento dos linfonodos regionais e tosse, que pode estar presente ou não. Em geral, os sinais clínicos persistem por dois a sete dias. Mortalidade é rara, e quando ocorre deve-se à broncopneumonia causada por infecções secundárias em associação com superlotação e inadequadas condições sanitárias (FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006). A enfermidade respiratória causada pelo EHV-4 é clinicamente indistinguível daquela produzida pelo EHV-1, sendo que os dois agentes são os maiores responsáveis por doença respiratória em equinos mundialmente (FOOTE et al., 2006; WEIBLEN, 2001).

As lesões causadas pelo EHV variam conforme os tecidos onde ocorreu a replicação viral, no epitélio respiratório e linfonodos observam-se necrose e corpúsculos de inclusão intranucleares; no endotélio dos vasos uterinos identificam-se lesões isquêmicas, vasculite, trombose e infartos dos cotilédones, causando abortamentos; nos fetos com menos de seis meses de gestação observa-se autólise generalizada; nos fetos mais tardios encontram-se edema subcutâneo e pulmonar, ascite, esplenomegalia e necrose hepática (pequenos focos de cor cinza de 2-4 mm). Nos potros que morrem após o nascimento, as lesões no aparelho respiratório são as mais evidentes, pneumonia intersticial severa, atelectasia e edema pulmonar, também se observam petéquias no miocárdio, lesões no fígado, tecido linforreticular e adrenais. Pequenos focos hemorrágicos no encéfalo, meninges e medula espinhal são visualizados nos casos de mieloencefalopatia, na microscopia observam-se vasculite, congestão, trombose das pequenas arteríolas e degeneração neuronal (FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006; WEIBLEN, 2001).

O diagnóstico presuntivo da infecção pelo EHV-1 e EHV-4 baseia-se no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões, entretanto é necessária a confirmação através de exames laboratoriais. O isolamento e a identificação do vírus, a partir de amostras clínicas, é o método mais indicado e definitivo para confirmar a enfermidade (WEIBLEN, 2001).

As amostras a serem coletadas e enviadas ao laboratório incluem: sangue total, soro sanguíneo colhido na fase aguda e convalescente; na forma respiratória, *swabs*

da nasofaringe em meio de transporte e remetidos sob refrigeração; na forma nervosa, líquido cefalorraquidiano (LCR), *swabs* da nasofaringe, medula espinhal, metade do cérebro sob refrigeração e a outra metade fixada em formalina a 10%; nos abortamentos, pulmões, baço, fígado e timo fetais, biópsia endometrial, sob refrigeração (FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006; WEIBLEN, 2001).

Na fase aguda da doença, podem-se realizar testes para detecção de vírus, antígenos ou DNA viral em amostras clínicas, as amostras devem ser enviadas sob refrigeração, o congelamento a -20 °C pode inativar o vírus. As amostras devidamente preparadas são inoculadas em cultivos celulares, visando o isolamento do agente. O EHV-1 é capaz de se multiplicar em cultivos celulares de outras espécies além da equina, como células RK-13 (*rabbit kidney cells*) e VERO (*african green monkey kidney cells*), já o EHV-4 multiplica-se somente em células de origem equina ou PK-15 (*pig kidney cells*), o que é utilizado para diferenciá-los (MORI, 2005). Em cultivos celulares o EHV causa efeito citopático (ECP) característico de herpesvírus, células arredondadas, escurecidas e aumentadas tamanho, aglomerados semelhantes a cachos de uva, focos de destruição celular com ruptura do tapete de células e destruição total do tapete. O ECP torna-se visível entre 24 e 72 horas após a inoculação, após três passagens, não havendo evidência de ECP, o material é considerado negativo para o vírus. Havendo ECP compatível com herpesvírus, a identidade do vírus deverá ser confirmada por imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX), com anticorpos específicos. Um diagnóstico rápido (uma a duas horas) por IFA ou IPX, em cortes ou impressões de tecidos, ou até mesmo de secreções em esfregaços, pode ser realizado. A identificação de DNA viral em amostras clínicas por PCR pode ser realizada para diagnóstico de infecções agudas, apresentando elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, sendo também benéfica na identificação de DNA em locais de latência do vírus (DIAZ, 2013; FRANCO et al., 2017).

O diagnóstico sorológico (indireto), através da detecção de anticorpos contra o EHV no soro, pode ser utilizado para confirmação do diagnóstico, desde que duas coletas (sorologia pareada) tenham sido realizadas, a primeira durante a fase aguda da enfermidade e a segunda três a quatro semanas após (fase convalescente). Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos entre a primeira e a segunda coleta é indicativo da infecção. Entretanto, convém lembrar que alguns cavalos com mieloencefalopatia herpética não produzem títulos de anticorpos substanciais e a

sorologia em éguas que sofreram abortamento têm pouco valor diagnóstico. A presença de anticorpos no soro, em um teste isolado, indica somente que o animal teve contato anterior com o agente, seja por infecção natural (potencial portador) ou por vacinação. A presença de anticorpos no LCR é diagnóstica para a mieloencefalopatia, porém nem todos os cavalos nessa condição apresentam anticorpos no LCR (FRANCO et al., 2017; SMITH, 2006).

As técnicas de vírusneutralização (VN), fixação de complemento (FC) e ELISA podem ser utilizadas para a detecção de anticorpos no soro de animais com suspeita de infecção pelo EHV (FRANCO et al., 2017).

O diagnóstico diferencial deve levar em consideração algumas patologias como: influenza eqüina (sinais respiratórios), arterite eqüina (sinais respiratórios e aborto) e mieloencefalopatia causada por protozoário (AIELLO; MOSES, 2016).

Nos surtos de doença respiratória ou abortamento recomendam-se o isolamento dos animais enfermos e medidas sanitárias como: limpeza e desinfecção das instalações com desinfetantes à base de álcool (isopropanol ou etanol 70-80% por cinco minutos), formaldeído a 0,2-0,8% ou glutaraldeído a 2%. Os fetos abortados, os envoltórios fetais e restos placentários devem ser removidos e destruídos. Os animais somente poderão deixar a propriedade após três semanas da recuperação do último caso clínico (AIELLO; MOSES, 2016; LUNN, et al., 2009; SMITH, 2006).

Algumas drogas virustáticas, como o ganciclovir, PMEDAP e acyclovir, demonstraram eficácia *in vitro* contra o EHV-1 (GARRÉ et al., 2007a). A determinação da superioridade farmacocinética e farmacodinâmica do valacyclovir, um pró-fármaco do acyclovir, sobre o acyclovir, em equinos saudáveis (GARRÉ et al., 2007b), motivou pesquisas sobre a eficácia terapêutica dessa droga. Em 2017, Maxwell et al. demonstraram a ação profilática e terapêutica do valacyclovir em éguas infectadas com uma cepa neuropatogênica do EHV-1, através da diminuição da replicação viral, da viremia, da eliminação do vírus, dos sinais clínicos e da gravidade da ataxia. Introduzindo uma nova opção no tratamento da enfermidade, podendo ser utilizado em diferentes estágios da infecção ou em equídeos que ainda não manifestaram sinais clínicos durante um surto da doença (MAXWELL, 2017; MAXWELL et al., 2017).

O tratamento sintomático, baseado em antiinflamatórios não esteroidais, para reduzir a hipertermia, a dor e a inflamação, e antibióticos sistêmicos de amplo espectro, para controlar as infecções secundárias, é indicado. De modo geral, preconiza-se uma semana de repouso para cada dia de temperatura retal elevada

(AIELLO; MOSES, 2016; SMITH, 2006). O uso de corticosteroides é reservado para casos de EHM que se apresentam em decúbito ou com grave ataxia, na intenção de auxiliar no controle ou prevenção da resposta celular adjacente à infecção de células endoteliais do SNC, para redução da vasculite, trombose e lesão neural resultante (LUNN et al., 2009).

Em relação ao controle do EHV-1 e do EHV-4, as medidas adotadas devem levar em consideração o histórico de doença respiratória e abortamento por esses agentes e a situação epidemiológica na propriedade e região. Dessa análise dependerá a escolha entre duas estratégias principais: controle sem ou com vacinação. Nas propriedades com histórico comprovado de infecção, enfermidade e sorologia positiva recomenda-se a vacinação. Nas propriedades sem histórico de infecção ou doença, sem sorologia positiva, recomenda-se o controle sem vacinação. Nas propriedades livres e sem vacinação o controle deve ser baseado na prevenção, para evitar o ingresso do vírus no rebanho. Instituição de quarentena (três a quatro semanas) para todos os equídeos que ingressam e teste sorológico para descarte dos positivos. Testes sorológicos periódicos de todo o rebanho e descarte de eventuais positivos. Nas propriedades com animais soropositivos e com vacinação devemos evitar o ingresso de animais soropositivos (quarentena), reduzir as atividades de manejo que causem estresse para evitar a reativação em animais portadores latentes, manter as éguas prenhes separadas das outras categorias de equinos da fazenda, em especial dos potros desmamados até um ano de idade, isolar do resto do rebanho éguas que abortaram e evitar fatores estressantes como desnutrição e lotação excessiva (AIELLO; MOSES, 2016; FRANCO et al., 2017).

Entre as medidas profiláticas destaca-se a vacinação, porém as vacinas contra o EHV-1 e o EHV-4, inativadas e atenuadas, induzem uma imunidade de curta duração (2 a 4 meses), exigindo revacinações frequentes, não impedem o estabelecimento de latência a partir de vírus de campo, a proteção contra os abortamentos é questionável e não protegem contra a forma neurológica da doença. Atualmente são utilizadas com relativo sucesso para controlar a disseminação e circulação do vírus na população, prevenir a enfermidade clínica e diminuir a gravidade dos sinais clínicos quando ela se manifesta (FRANCO et al., 2017; GOEHRING et al., 2010; KYDD et al., 2006).

No Brasil, existem 31 vacinas licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento (MAPA) para uso em equídeos, contra várias enfermidades

infectocontagiosas. Em relação a proteção contra o herpesvírus equídeo, três indústrias farmacêuticas: Merial Brasil, Venco Saúde Animal e Zoetis, produzem cinco vacinas, uma contra o EHV-1 e quatro contra o EHV-1 e o EHV-4, inativadas, associadas ou não a outros agentes infecciosos (SINDAN, 2015).

As vacinas víricas podem ser classificadas em replicativas, não-replicativas e de DNA/RNA (Figura 2) (CANAL et al., 2017). As vacinas inativadas contendo vírus íntegro e as vacinas com vírus atenuados são consideradas vacinas convencionais, tradicionais.

A grande maioria das vacinas ofertadas no mercado mundial são inativadas, uma vacina de subunidades do vírus (Pneumequine®) é comercializada no Brasil e outros países, até o momento nenhuma vacina atenuada contra o EHV foi licenciada no Brasil. Somente uma vacina com vírus atenuado (Rhinomune®) tem comercialização permitida na Europa e América do Norte (Figura 3).

<b>Tipo</b>	<b>Características</b>		
Replicativas (vírus vivo)	Vírus patogênicos		
	Vírus heterólogos		
	Vírus atenuados	Vírus naturalmente atenuados	
		Vírus atenuados por passagens em cultivo celular	
		Vírus atenuados por passagens em ovos embrionados	
		Vírus atenuados por passagens em espécie heteróloga	
		Vírus temperatura-sensíveis	
		Vírus modificados pela deleção de genes	
		Vacinas com marcadores antigênicos	
	Vetores virais		
Não-replicativas (sem vírus vivo)	Vírus inativado		
	Produtos de vírus	Subunidades de vírus	
		Proteínas recombinantes	
		Peptídeos sintéticos	
DNA/RNA	Contêm o gene da proteína de interesse		

Figura 2 – Tipos de vacinas víricas. Fonte: Canal et al. (2017).

As primeiras vacinas contra o EHV-1 surgiram na década de 40, com vírus inativados, isolados de tecidos de fetos abortados (BRUNER et al., 1948, 1949; KRESS, 1946 apud TIMONEY et al., 1992). Em 1953, Doll et al. utilizaram vacinas com vírus atenuados através de sucessivas inoculações em hamsters. Em 1977, Purdy et al. usaram vacinas atenuadas produzidas em células Vero. Gerber et al. (1977) utilizaram vacinas atenuadas produzidas em células equinas (NL-EQ4). Cada uma dessas vacinas apresentava vantagens e desvantagens, entretanto, nenhuma

delas era completamente satisfatória (TIMONEY et al., 1992). Alguns experimentos demonstraram que as vacinas atenuadas promoviam boa proteção, entretanto, relatos de doença neurológica em animais vacinados foram atribuídos à vacinação (LIU; CASTLEMAN, 1977). A falha em produzir vacinas atenuadas seguras e confiáveis para o EHV-1, estimulou os pesquisadores a se voltarem para as vacinas inativadas, mais seguras (KYDD et al., 2006).

Inicialmente o vírus era replicado em tecidos fetais de equinos, posteriormente em hamsters e finalmente em linhagens celulares (*in vitro*), o que reduziu significativamente as reações de hipersensibilidade (TIMONEY et al., 1992). A propagação dos agentes virais em cultivos celulares (décadas de 60/70) livres de contaminação bacteriana, graças ao advento dos antibióticos, permitiu a detecção e multiplicação dos vírus para diagnóstico, estudos bioquímicos e moleculares e a produção de vacinas seguras para os animais e o homem (AIELLO; MOSES, 2016).

#### Vacinas inativadas

A primeira vacina comercial contendo vírus inteiro, inativado com formalina, em adjuvante oleoso (Pneumabort K®, Fort Dodge) foi introduzida em 1975 no Kentucky, após experimentos demonstrarem sua eficácia em prevenir abortamentos quando administrada no 5º, 7º e 9º mês de gestação, a intervalos de 60 dias (BRYANS, 1978).

Heldens et al. (2001), utilizando uma vacina com vírus inteiro inativado contra o EHV-1 e o EHV-4 (Duvaxyn EHV<sub>1,4</sub>), com carbopol como adjuvante, após a administração de duas doses por via intramuscular profunda com intervalo de quatro semanas nos potros (controle = 10 e vacinados = 20) e três doses, no 5º, 7º e 9º mês de gestação, em éguas prenhes (controle = 4 e vacinadas = 5), demonstraram, após desafio com EHV-1 cepa Ab4, EHV-1 cepa 121412 e EHV-4 cepa 122324, redução significativa nos abortamentos, na duração e gravidade dos sinais clínicos, assim como nos títulos e duração da excreção viral. Concluindo que a vacinação dos potros e éguas prenhes reduziu o risco de abortos e surtos de doenças respiratórias causadas por vírus de campo.

Vacina	Comercialização	Empresa	Tecnologia	Adjuvante	Antígenos	Cepas
<b>Pneumequine®</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Brasil, outros países	Merial Saúde Animal Ltda.	Inativada, de subunidades virais	Oleoso	Glicoproteínas do vírus	EHV-1 Kentucky
<b>Herpes Horse®</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Brasil	Venco Saúde Animal	Inativada, vírus inteiro	Hidróxido de alumínio	Vírus inteiro	EHV-1, EHV-4
<b>Influenza H 1/4®</b> (contra influenza e herpesvírus dos equídeos)	Brasil	Venco Saúde Animal	Inativada, vírus inteiro	Hidróxido de alumínio	Vírus inteiro	EIV Prague/56 (H7N7), EIV Newmarket/2/93 (H3N8), EIV South Africa/4/03 (H3N8), EHV-1, EHV-4
<b>Lexington 8®</b> (contra encefalomielite, influenza, herpesvírus dos equídeos e tétano)	Brasil	Venco Saúde Animal	Inativada, vírus inteiro. Inativada, toxina do tétano.	Hidróxido de alumínio	Vírus inteiro	EEEV, WEEV, EIV Prague/56 (H7N7), EIV Kentucky/94 (H3N8), EIV South Africa/4/03 (H3N8), EHV-1, EHV-4
<b>Fluvac Innovator EHV 4/1®</b> (contra herpesvírus dos equídeos e influenza equina)	Brasil, outros países	Zoetis	Inativada, vírus inteiro	MetaStim	Vírus inteiro	EHV-1, EHV-4, EIV A <sub>2</sub>
<b>Duvaxin® EHV<sub>1,4</sub></b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Outros países	Zoetis	Inativada, vírus inteiro	Carbopol	Vírus inteiro	EHV-1, EHV-4
<b>Pneumabort K® + 1B</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Outros países	Pfizer	Inativada, vírus inteiro	Oleoso ( <i>Polysorbate 60, Sorbitan monostearate</i> )	Vírus inteiro	EHV-1p, EHV-1b
<b>Prodigy® with Havlogen®</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Outros países	MSD - Intervet	Inativada, vírus inteiro	Havlogen	Vírus inteiro	EHV-1
<b>Calvenza™ EHV</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Outros países	Boehringer Ingelheim	Inativada, vírus inteiro	Carbopol	Vírus inteiro	EHV-1
<b>Rhinomune™</b> (contra herpesvírus dos equídeos)	Outros países	Boehringer Ingelheim	Atenuada (MLV, modified live virus)	Não há	Vírus inteiro	EHV-1

Figura 3 – Principais vacinas contra o herpesvírus dos equídeos (SINDAN, 2015).



Foote et al. (2006) demonstraram circulação viral (EHV-1 e EHV-4) em potros de 1 a 4 semanas de idade, filhos de 40 éguas vacinadas com Duvaxin® EHV1.4 (inativada, bivalente, vírus inteiro, carbopol como adjuvante) no 5º, 7º e 9º mês de gestação, conforme as recomendações do fabricante. Identificaram cinco potros e uma égua com evidências sorológicas de infecção ou reativação por EHV-1 e quatro potros e duas éguas para EHV-4, utilizando um ELISA específico para EHV-1 e EHV-4 baseado na glicoproteína G (gG). Evidenciando a circulação desses vírus em rebanhos vacinados, provocando novas considerações e cuidados no estabelecimento de um programa de vacinação assim como no delineamento estratégico de medidas de controle e na formulação de novas vacinas.

### Vacinas atenuadas

No Brasil, todas as vacinas licenciadas pelo MAPA contra o herpesvírus dos equídeos são inativadas (não-replicativas).

Em 2006, Goodman et al. compararam a eficácia de duas vacinas contra o EHV-1, cepa Findlay/OH03, isolada de um caso fatal de EHM: a Fluvac Innovator 6 combination vaccine® (inativada, Fort Dodge) e a Rhinomune™ (atenuada, Pfizer). Quinze cavalos foram divididos em três grupos de cinco animais cada: grupo controle sem vacinação (placebo), grupo vacina inativada (Fluvac Innovator 6®) e grupo vacina atenuada (Rhinomune™). Todos os cavalos receberam duas injeções intramusculares, conforme as recomendações dos fabricantes, com 30 dias de intervalo. Todos foram desafiados com a cepa OH03, 59 dias após a primeira injeção. Não foram observadas reações clínicas adversas após a vacinação, apenas três animais do grupo vacina inativada apresentaram pequenos inchaços após a segunda dose da vacina. Três animais do grupo controle e três animais do grupo vacina inativada apresentaram sinais neurológicos durante os 14 dias de observação após o desafio. A duração do período febril foi significativamente menor no grupo vacina atenuada. Em relação a vacina inativada, a vacina atenuada induziu títulos de anticorpos neutralizantes significativamente menores durante o experimento e em baixas razões EHV-1-específicos IgG(T)/IgGa e IgG(T)/IgGb, sugerindo uma resposta imune citotóxica. A excreção viral através da nasofaringe foi praticamente indetectável no grupo vacina atenuada e foi significativamente menor quando comparada aos outros grupos. Tendo como base os sinais neurológicos, as temperaturas retais, o isolamento do vírus de *swabs* nasais e a especificidade da resposta imune, os autores concluíram que a proteção induzida pela vacina atenuada foi superior àquela induzida pela vacina inativada.

Em 2010, Goehring et al. avaliaram a eficácia da Rhinomune® (atenuada) e da Pneumabort-K® (inativada) em relação à proteção contra o EHV-1 cepa Findlay/OH03. Vinte quatro pôneis de raça mista (12 machos e 12 fêmeas) de 11 a 13 meses de idade, sem histórico de exposição ou vacinação contra o EHV, foram divididos em três grupos de 8 animais cada: grupo controle sem vacinação (placebo), grupo vacina vírus vivo modificado (Rhinomune®, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.) e grupo vacina vírus morto (Pneumabort-K®, Pfizer Animal Health). Três doses de cada vacina foram administradas por via intramuscular profunda nos dias 0, 27 e 97 do experimento. Os animais foram desafiados, por instilação intra-nasal do EHV, no dia 121 do experimento. Os resultados mostraram que reações adversas não foram observadas no grupo controle; no grupo vacina vírus vivo somente um animal teve uma leve reação vacinal no local da injeção após a 1ª dose, que desapareceu 24 h após; no grupo vacina vírus morto ocorreram múltiplas reações adversas à vacinação, após a 1ª dose, dois pôneis tiveram reações locais com duração de 1 a 2 dias, após a 2ª dose, sete pôneis tiveram reações locais que duraram de 3 a 13 dias, e os mesmos sete animais tiveram reações sistêmicas (hipertermia com duração de 1 a 2 dias), após a 3ª dose, quatro pôneis tiveram reações locais que duraram de 1 a 3 dias. Reações vacinais são comumente observadas após a administração de vacinas que utilizam adjuvantes em sua formulação. Os sinais clínicos foram significativamente menores nos dois grupos vacinados após o desafio, tanto em relação ao tempo quanto a gravidade da doença clínica, essa redução foi maior no grupo vacina vírus vivo. A excreção nasal do vírus foi reduzida de 1 a 2 logs em ambos grupos vacinados. Em relação a viremia, houve redução no número de dias, entretanto somente no grupo vacina vírus morto foi significativa.

#### Vacinas não convencionais

Uma vacina da Merial Saúde Animal Ltda., Pneumequine® (Figura 3) composta de subunidades virais (glicoproteínas do EHV-1) em veículo oleoso está licenciada para uso no Brasil e outros países. Segundo o fabricante, produz imunidade ativa contra a rinopneumonite equina, podendo ser utilizada em equinos acima de seis meses de idade e éguas prenhes (MERIAL, 2018).

Muitas vacinas experimentais contra a rinopneumonite equina foram testadas em animais de laboratório e equinos, algumas com resultados promissores. Foote et al. (2005) testaram três vacinas em equinos mestiços: vacina inativada, vírus inteiro, contendo EHV-

1 e EHV-4 (Duvaxin™), vacina de proteína recombinante (gDr EHV-1) produzida em baculovírus e vacina de DNA (EHV-1 gD DNA) codificada em um vetor de expressão mamífero. Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina inativada com vírus íntegro foram semelhantes aos induzidos pela vacina de proteína recombinante, a vacina de DNA foi menos efetiva na indução de anticorpos neutralizantes. Os resultados demonstraram que a gD do EHV-1 pode desempenhar um importante papel em vacinas de subunidade, restando ser avaliada em experimentos com desafio viral.

### Resposta imune à vacinação contra o EHV

De modo geral, as informações sobre resposta imune à vacinação limitam-se à capacidade que a vacina investigada tem de estimular a produção de anticorpos neutralizantes contra os antígenos vacinais.

Vacinas inativadas ou de subunidades virais, que empregam proteínas purificadas, estimulam linfócitos Th CD4<sup>+</sup>, além de resposta humoral mediada por linfócitos B e anticorpos. De modo geral, não promovem uma resposta expressiva de linfócitos T citotóxicos (CTL), pois esses antígenos são processados e apresentados quase que unicamente associados ao complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II (CANAL et al., 2017).

As vacinas atenuadas (vírus vivo modificado), administradas por via intramuscular, induzem a produção de anticorpos neutralizantes e proporcionam boas condições clínicas e proteção contra a infecção em experimentos com desafio por cepas altamente patogênicas, sendo particularmente eficazes na redução de células associadas à viremia, provavelmente por estimularem respostas por CTL, entretanto o risco de reversão à virulência permanece (JESSETT et al., 1999).

Allen et al. (1999), levando em consideração a imunopatogenia do EHV-1, com o epitélio do trato respiratório como sítio primário da infecção e um ciclo replicativo intracelular, sugeriram que três tipos de resposta imune são necessárias para controlar a viremia associada às células, evitando abortamentos e provavelmente a doença neurológica: imunidade de mucosa, anticorpos neutralizantes e CTL para lisar células infectadas pelo vírus.

## Considerações finais

Nos últimos 40 anos, muitos experimentos foram conduzidos sobre a eficácia de vacinas comerciais e experimentais contra o EHV-1 e o EHV-4, usando diversos modelos experimentais, mostrando, algumas vezes, resultados diferentes sobre a mesma vacina. Entretanto, sem qualquer dúvida, podemos afirmar que as vacinas comerciais disponíveis no mercado foram capazes de reduzir significativamente os surtos de abortamentos pelo EHV-1, a gravidade e a duração dos sinais clínicos, a viremia e a excreção viral. No entanto, mesmo vacinados, os animais ainda continuam suscetíveis a doenças respiratórias, abortamentos e enfermidade neurológica causados pelo EHV. As vacinas induzem uma imunidade de curta duração (2 a 4 meses), exigindo revacinações frequentes e não impedem o estabelecimento de latência a partir de vírus de campo (FRANCO et al., 2017; GOEHRING et al., 2010; KYDD et al., 2006).

O controle da viremia associada a células é considerado fundamental para a prevenção do abortamento e provavelmente da doença neurológica, logo, o objetivo de qualquer programa de vacinação que busca prevenir o abortamento e a doença neurológica provocada pelo EHV deve promover uma resposta imune que reduza ou elimine a viremia (LUNN et al., 2009).

Possivelmente, novas estratégias de controle do EHV contemplem a utilização de mais de um tipo de vacina nas diferentes categorias e práticas de manejo dentro de um mesmo criatório: vacinas inativadas por via intramuscular, atenuadas por via intramuscular e atenuadas por via intranasal, buscando resposta imune humoral e celular, além de práticas de manejo que reduzam o estresse, especialmente nos animais jovens.

Atualmente, as vacinas comerciais falham em impedir a infecção e a latência pelo EHV, reduzem, porém não impedem a disseminação viral através da nasofaringe, limitam, mas não bloqueiam a viremia associada às células. Apesar de aumentarem consideravelmente a proteção contra a enfermidade respiratória e os abortamentos, os animais, individualmente, continuam suscetíveis, especialmente à forma neurológica da doença.

## 2.2 *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* foi isolada da natureza durante a primeira metade do século XX, um isolado do sul da França e outro do norte da Califórnia, provavelmente através da identificação de leveduras selvagens contaminantes, que estavam em competição com cepas utilizadas na vinicultura. Emil Christian Hansen, micologista dinamarquês, estabeleceu o gênero em 1904, em homenagem a P. Pichi, cientista do século XIX (BIOGRAMMATICS, 2018).

A *Phillips Petroleum Company*, uma empresa americana de gás e petróleo, iniciou um programa para oxidar quimicamente o gás metano e utilizar o metanol resultante para fins comerciais. Dentre várias espécies de leveduras que poderiam utilizar o metanol como fonte de carbono e energia, *P. pastoris* foi a escolhida para, através de um processo de fermentação de alta densidade celular, produzir um aditivo para alimentação animal (AHMAD et al., 2014).

Os aumentos nos custos do gás natural, na década de 1970, tornaram o programa economicamente inviável, fazendo a *Phillips* rever sua política em relação a *P. pastoris*. Nos anos 80, a companhia financiou uma pesquisa, junto ao *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates* (SIBIA), para desenvolver ferramentas de biologia molecular necessárias para produção de proteínas heterólogas em *Pichia* (BIOGRAMMATICS, 2018). O sistema foi patenteado, e atualmente a empresa Invitrogen (USA) disponibiliza o kit de expressão para uso em pesquisa.

Em 1995, *P. pastoris* foi reclassificada, atualmente pertence ao gênero *Komagataella*, sendo dividida em seis espécies: *K. pastoris*, *K. phaffii*, *K. pseudopastoris*, *K. poluli*, *K. ulmi*, e *K. kurtzmanii* (NAUMOV et al., 2013; NCBI, 2018).

Entre outros sistemas de expressão de proteínas heterólogas, a *P. pastoris* tem se destacado e vem sendo muito utilizada devido a inúmeras vantagens, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens da utilização da levedura *Pichia pastoris* como sistema de produção de proteínas heterólogas.

---

Fácil manipulação genética
Expressar proteínas heterólogas em níveis elevados, intra e extracelularmente
Habilidade de realizar modificações pós-traducionais: clivagem proteolítica, enovelamento, glicosilação e formação de pontes dissulfeto
Sistema eucariótico capaz de promover O- e N-glicosilação
Processar sequências sinais
Integração estável de várias cópias do DNA transformante
Mínima possibilidade de hiper-glicosilação
Possuir <i>status</i> GRAS ( <i>Generally Regarded As Safe</i> )
Produção de proteína heteróloga na faixa de 1 g/L
Baixa secreção de proteínas endógenas no meio
Crescimento com alta densidade celular, podendo chegar a 200 g/L
Ser um sistema que apresenta rapidez, facilidade e economia

---

Fonte: Cereghino e Cregg (2000), Demain e Vaishnav (2009), Hohenblum et al. (2004).

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono, em razão da presença de enzima álcool oxidase em seu metabolismo. A primeira etapa da metabolização do metanol é sua oxidação, gerando formaldeído, reação catalisada pela enzima álcool oxidase (AOX), que utiliza oxigênio molecular e gera peróxido de hidrogênio (Figura 4). As etapas iniciais ocorrem nos peroxissomos, tendo continuidade no citosol. Entre outras funções, o metabolismo do metanol fornece energia para as células que crescem em meios contendo metanol (CREGG et al., 2000).

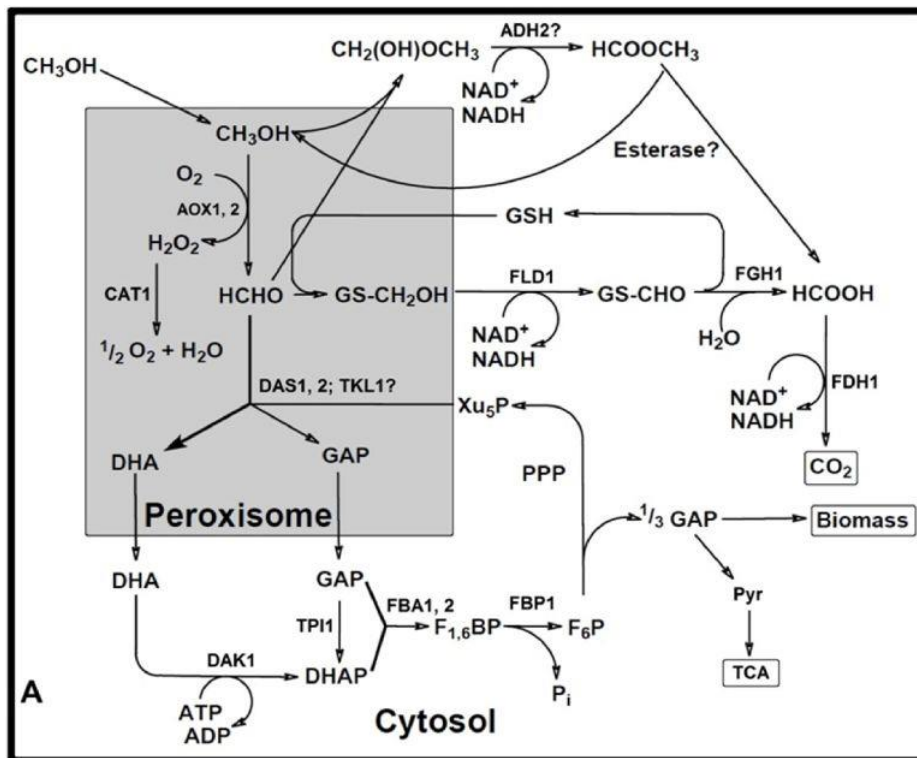


Figura 4 - Metabolismo do metanol. Fonte: Krainer et al. (2012).

*AOX1* e *AOX2* são os dois genes da *P. pastoris* que codificam a enzima álcool oxidase (AOX). O primeiro é encarregado por 85% de toda a atividade de álcool-oxidase na célula. A levedura tem preferência por crescimento respiratório, com a utilização de  $\text{O}_2$ , possibilitando crescimento até altas densidades celulares. Como a AOX possui pouca afinidade pelo  $\text{O}_2$ , as leveduras metilotróficas suprem essa deficiência sintetizando elevadas quantidades da enzima (GELLISSEN, 2000).

Quando a levedura cresce em meios que utilizam outras fontes de carbono, como glicose, glicerol ou etanol, apenas vestígios da AOX são detectados, entretanto, quando a levedura cresce em meio metanólico, a enzima pode alcançar até 30% das proteínas totais solúveis (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Três etapas fundamentais são necessárias para a expressão de um gene heterólogo em *P. pastoris*:

- Inserção do gene em um vetor de expressão,
- Integração desse vetor dentro do genoma da levedura,
- Seleção dos clones que potencialmente estiverem expressando o gene de interesse (LI et al., 2007).

A integração cromossomal é o método de transformação mais empregado em *P. pastoris*, pela estabilidade do cassete de expressão, controle do sítio de integração e a possibilidade da geração de transformantes com múltiplas cópias, podendo aumentar a quantidade de proteína expressa (SREEKRISHNA et al., 1997).

Os vetores de expressão devem conter um cassete de expressão com os seguintes elementos:

- a) Um promotor,
- b) Uma sequência terminadora da transcrição,
- c) Um ou mais sítios de restrição para a clonagem do gene heterólogo,
- d) Sinais de secreção (fosfatase ácida de *P. pastoris* ou o fator alpha de *Saccharomyces cerevisiae*),
- e) Marca de seleção (para permitir a identificação do clone transformante, a do gene histidinol desidrogenase – *his4* – é uma das mais utilizadas),
- d) Origem para replicação de *Escherichia coli* (pois, em geral, as etapas de clonagem são realizadas nesta bactéria) (LI et al., 2007).

O vetor de expressão pPICZ $\alpha$  é um dos mais usados atualmente, possui o promotor *AOX1* e a região terminadora de transcrição do gene *AOX1*, possui o peptídeo sinal do fator alpha e seleção para o antibiótico zeocina (gene de resistência a zeocina – *Sh Ble*), além de uma cauda de polihistidina C-terminal, que permite a identificação e a purificação da proteína (Figura 5).



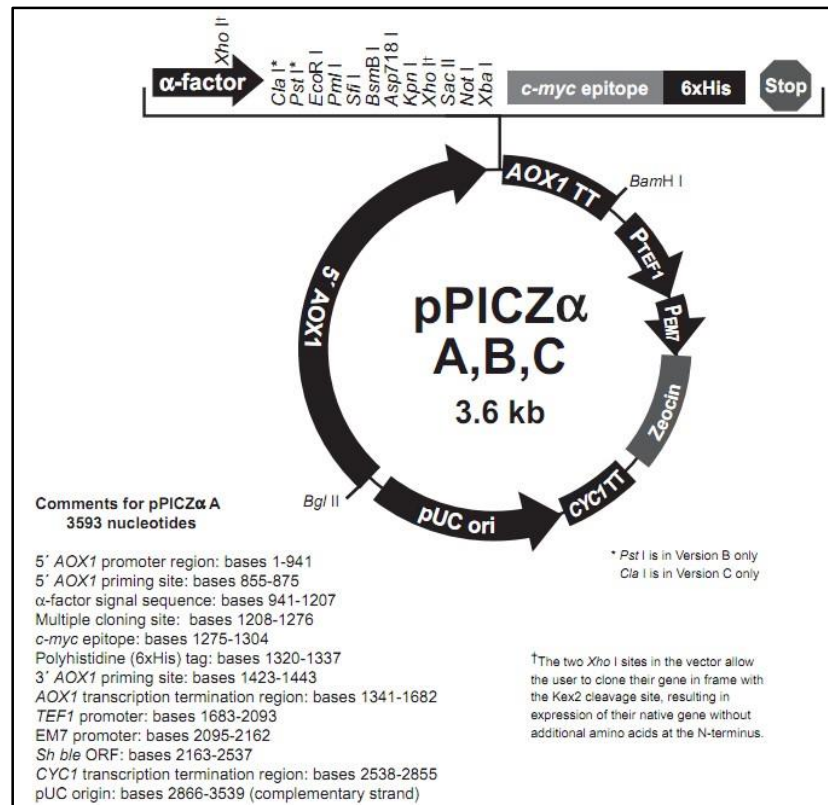


Figura 5 – Vetor de expressão pPICZα para expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris*. Fonte: Invitrogen (2010).

A maioria das linhagens mutantes de *P. pastoris* é derivada da linhagem selvagem ou nativa NLLR-Y 11430, classificada como *K. phaffii*, sendo a linhagem parental das linhagens auxotrófica GS115 (*his4*) e prototrófica X-33 (KURTZMAN, 2009). Algumas linhagens mutantes e linhagens deficientes em proteases são comumente empregadas como hospedeiras dos vetores de expressão (Tabela 2).

Tabela 2 – Genótipo e fenótipo de algumas linhagens de *Pichia pastoris*.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
X 33	$\Delta his4 :: HIS4$	selvagem
GS115	<i>his4</i>	His <sup>-</sup>
KM71	$\Delta aox1 :: SARG4 his4 arg4$	Mut <sup>S</sup> , His <sup>-</sup>
SMD1168	$\Delta pep4 :: URA3 his4 ura3$	His <sup>-</sup> , deficiente em proteínase A
YJN410	<i>arg3</i>	Arg <sup>-</sup>
KM71H	$aox1 :: ARG4, arg4$	Mut <sup>S</sup>
YJN411	<i>his1</i>	His <sup>-</sup>

Fonte: Cereghino e Cregg (2000), Cregg et al. (2000), Nett et al. (2005).

As linhagens de *P. pastoris* são classificadas em relação a capacidade de metabolizar o metanol em três fenótipos: Mut<sup>+</sup> (*Methanol Utilization Plus*), Mut<sup>S</sup> (*Methanol Utilization Slow*) e Mut<sup>-</sup> (*Methanol Utilization Minus*). As estirpes Mut<sup>+</sup> são aquelas nas quais os genes *AOX1* e *AOX2* estão presentes. Em meios contendo metanol, apresentam velocidade de crescimento semelhante as estirpes selvagens, exigindo grandes quantidades de metanol no meio. Nas estirpes Mut<sup>S</sup> o gene *AOX1* foi deletado, a sensibilidade ao metanol torna-se reduzida, ficando o crescimento limitado pela expressão do gene *AOX2*, desse modo, com a velocidade de crescimento diminuída, há maior facilidade de controle do processo. As estirpes Mut<sup>-</sup> não expressam nenhum dos dois genes *AOX*, ou seja, não crescem na presença de metanol (POTVIN et al., 2012).

### **3 Hipótese e objetivos**

#### **3.1 Hipótese**

A glicoproteína D do herpesvírus equídeo 1 expressa em *Pichia pastoris* é capaz de induzir uma resposta imune humoral em camundongos.

#### **3.2 Objetivo geral**

Produção de uma vacina de proteína recombinante contra o EHV-1.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- a) Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D (gD) do EHV-1 em *P. pastoris*.
- b) Produção de uma vacina de proteína recombinante contra o EHV-1.
- c) Avaliar a resposta imune humoral induzida com as vacinações através de ELISA indireto e vírusneutralização.

## 4 Metodologia

Inicialmente, após a extração do DNA viral (EHV-1) e confirmação pela técnica da PCR, procedeu-se a clonagem de um fragmento de DNA do vírus no plasmídeo pPICZαA (Invitrogen, SP, Brasil). Diante do insucesso desse procedimento, foi obtido junto a Genone Soluções em Biotecnologia (RJ, Brasil), um plasmídeo sintético para dar seguimento ao Projeto de Pesquisa, conforme detalhado a seguir.

### 4.1 Células e vírus

Foram utilizadas células da linhagem RK-13 (*rabbit kidney cells*) provenientes do Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas para a replicação do herpesvírus equídeo tipo 1 (EHV-1) cepa Kentucky D, cedida pelo Professor Doutor Eduardo Furtado Flores da Universidade Federal de Santa Maria.

As células, armazenadas em botijão com nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em garrafas para cultivo celular contendo E-MEM (Meio Essencial Mínimo, Sigma-Aldrich®) suplementado com antimicrobianos (penicilina G, Sigma-Aldrich®; estreptomicina, Vetec®; enrofloxacina, Bayer® e anfotericina B, Cristália®) e soro fetal bovino (SFB, Gibco®) a 10%, e mantidas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 72 horas. Após a confirmação da formação da monocamada de células, o cultivo foi tripsinizado e transferido para placas de 12 poços (Kasvi®), 1 ml/poço, na concentração 6x10<sup>5</sup> células/ml e mantido em estufa por 48 horas. Após esse período, 0,15 ml de uma suspensão contendo EHV-1 com título de 1x10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (*tissue culture infection dose*) foi inoculada por poço para adsorção, totalizando 8 poços, restando 4 poços como controle. A placa foi mantida em estufa até a visualização de efeito citopático (ECP) nos poços inoculados. Após observação de ECP em 80% do cultivo foi realizada a retirada do sobrenadante e o armazenamento da placa e do sobrenadante em freezer a -70 °C.

## 4.2 Extração de DNA viral

Foi realizada a extração do DNA viral a partir das células RK-13 infectadas pelo EHV-1 que estavam congeladas em uma placa de 12 poços em freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para tanto utilizou-se o Trizol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) conforme o método desenvolvido por Chomczynski (1993).

## 4.3 Clonagem

Um fragmento de DNA de 1.306 pb que corresponde a uma fração da glicoproteína D do EHV-1 (número de acesso do GenBank: AB279610.1) (GHANEM et al., 2007) foi amplificado por PCR utilizando os oligo iniciadores F-gD-HVE1-KD (GGCTCGAGAAAAGAATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGT) e R-gD-HVE1-KD (TCTAGACAAGCCGTTCTGTGCAGACTTT), em termociclador Biocycler MJ96G, utilizando Platinum® Taq DNA polimerase de alta fidelidade, e clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen, SP. Brasil).

Foi utilizada *Escherichia coli* cepa TOP10F (Invitrogen, SP. Brasil) para a transformação por choque térmico do plasmídeo pPICZαA, os clones foram selecionados em placas contendo zeocina (25  $\mu\text{g/ml}$ ) em meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 2%). O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o Plasmid Mini Purification Kit® (Ludwig Biotecnologia Ltda). Foi realizada uma restrição enzimática dupla, utilizando as enzimas XhoI e XbaI, e Cut Smart Buffer® (New England Biolabs), do plasmídeo e do produto da PCR (gDEHV-1), que após foram deixados em um banho maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Após esse período, os produtos digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da digestão. Verificado o resultado do procedimento, utilizou-se o Gel Purification Kit® (Ludwig Biotecnologia Ltda) para a retirada do material genético do gel de agarose. Os fragmentos de DNA purificados foram quantificados e submetidos a reação de ligação. A ligação foi realizada em duas relações, 3:1 e 5:1 gDEHV-1/plasmídeo, sob ação da enzima T4 DNA ligase (Ludwig Biotecnologia Ltda). Os produtos das ligações foram propagados em *E. coli* cepa TOP10F em meio LB contendo zeocina. A extração do DNA plasmidial foi realizada através do Plasmid Mini Purification Kit®. O plasmídeo recombinante resultante foi denominado pPICZαA-gDEHV-1 (4.825 pb). O clone recombinante foi submetido a sequenciamento para confirmação do resultado. O resultado foi negativo.

Diante do insucesso do procedimento de clonagem, e tendo em vista o tempo restante para execução do Projeto de Pesquisa, foi deliberado obter junto a Genone Soluções em Biotecnologia (RJ, Brasil) um plasmídeo sintético (pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1) que contém um fragmento de DNA de 1022 pb que corresponde a uma fração da glicoproteína D do herpesvírus equídeo 1 (número de acesso do GenBank: AB279610.1.) (Figura 6).

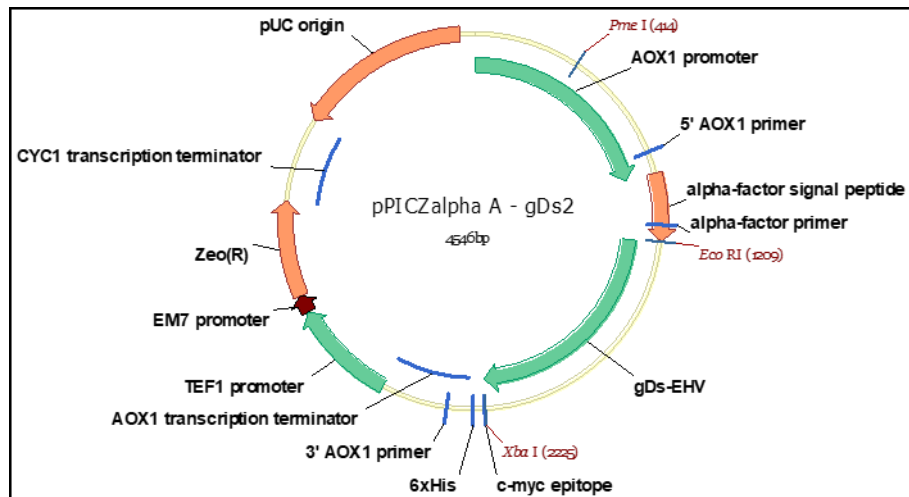


Figura 6 - Plasmídeo sintético pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1 que contém um fragmento de DNA de 1022 pb que corresponde a uma fração da glicoproteína D do herpesvírus equídeo 1 (número de acesso do GenBank: AB279610.1.).

#### 4.4 Expressão do gene da glicoproteína D do EHV-1 em *Pichia pastoris*

O plasmídeo pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1 foi propagado em *E. coli* TOP10F, utilizando um protocolo de choque térmico. Após a extração, linearização e purificação do DNA plasmidial, este foi transformado em *P. pastoris* conforme descrito por Dummer et al. (2009).

Após a eletroporação da *P. pastoris* estirpe KM71H com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A-gDEHV-1, utilizando MicroPulser (Bio-Rad) conforme instruções do fabricante, 63 clones recombinantes foram selecionados em placas de YPDS contendo zeocina (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 18,22%, ágar 2% e zeocina 100  $\mu$ g/ml), numerados em ordem crescente, e armazenados a  $-20$  °C, em eppendorfs contendo 400  $\mu$ l de YPD e 100  $\mu$ l de glicerol 80%, para posterior processamento.

Foram selecionados 13 clones para extração de DNA total para através da PCR confirmar a existência do inserto, destes foram selecionados, inicialmente, 7 clones para expansão (clones 22, 29, 30, 36, 44, 57 e 63). Uma colônia isolada de cada clone Mut<sup>S</sup> foi inoculada em um frasco erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio BMGY (extrato de

levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, YNB -yeast nitrogen base – 1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ , glicerol 1%, pH 6,0) e incubada durante a noite em agitador orbital a 200 rpm, 28 °C, até atingir  $OD_{600 \text{ nm}} = 4$  (20-24 h). As culturas, após esse período, foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  durante 5 min. à temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. O sedimento da cultura Mut<sup>S</sup> foi suspenso em 10 ml de meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, YNB - yeast nitrogen base – 1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ , metanol 0,5%, pH 6,0), a uma  $OD_{600 \text{ nm}} = 1,0$ , em um frasco erlenmeyer aletado de 100 ml, e incubado em agitador orbital a 200 rpm, 28 °C, por 96 horas (período da indução). As culturas foram suplementadas com metanol a 1% (v/v) a cada 12 horas (Figura 7). Após esse processo, as culturas foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  a 4 °C, durante 5 min. Os sobrenadantes foram separados, tratados com 1 mM de PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*) e congelados a -20 °C.

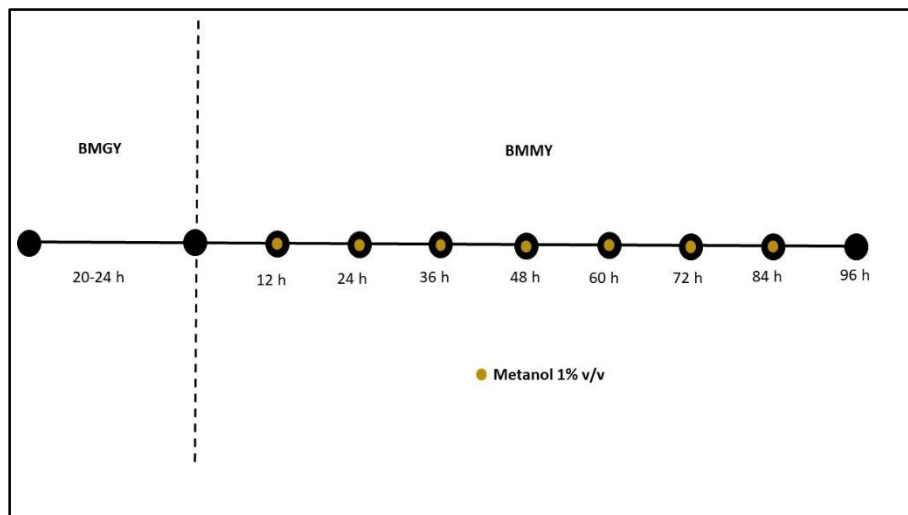


Figura 7 – Esquema demonstrativo do cultivo, com os meios BMGY e BMMY, e indução com metanol de *Pichia pastoris* estirpe KM71H.

#### 4.5 Purificação e quantificação da glicoproteína D recombinante (rgD)

Os sobrenadantes do material expresso pelos clones Mut<sup>S</sup> foram purificados em coluna de cromatografia de afinidade de íons  $Ni^{2+}$  (Ni-NTA, Qiagem) no sistema de purificação de proteínas ÄKTA™ (GE Healthcare, WI, EUA), quantificados pelo método da curva padrão de albumina bovina (BSA) e monitorados em SDS-PAGE 12%.

A identificação da proteína foi realizada através do *Western blot* com MAb Anti-histidina e um *pool* de soros de três equinos positivos contra o EHV-1 (títulos 32, 64 e  $\geq 256$ ) em partes iguais. Algumas amostras de proteína sofreram digestão pela enzima Endo H

(Endoglycosidase H, New England BioLabs, USA), para visualização no *Western blot* com MAb Anti-histidina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)

#### 4.6 Produção das vacinas experimentais

O EHV-1 foi inativado pela bromoetilenimina (BEI), que foi obtida pela ciclização da 2-bromoetilamina (BEA) a 37 °C por uma hora sob condição alcalina (0,2 N NaOH). O processo de inativação viral foi realizado pela adição de 1mM de BEI pH 7,8 sob agitação lenta e constante, por 12 horas a 18 °C. Após a inativação, a BEI foi neutralizada pela adição de tiosulfato de sódio até a concentração final de 1%. Para o controle de vírus infeccioso residual, o EHV-1 inativado foi inoculado em cultivo de células RK-13, sendo a presença e/ou ausência de ECP monitorada por 96 horas. Foram preparadas três vacinas inativadas, todas com adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich®) a 10%: uma vacina utilizando o EHV-1 íntegro na concentração de  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml, uma vacina contendo EHV-1 ( $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) e gDEHV-1 (200 µg/ml) e uma vacina contendo 200 µg da gDEHV-1/ml (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição das vacinas administradas nos grupos experimentais.

Grupos	Tipos	Composição/dose
Grupo 1	Vacina comercial inativada	EHV-1/EHV-4 (0,2 ml)
Grupo 2	Vacina experimental EHV-1	EHV-1 $1 \times 10^7$ TCID <sub>50</sub> /ml (0,2 ml)
Grupo 3	Vacina experimental EHV-1 + gDEHV-1	EHV-1 $1 \times 10^7$ TCID <sub>50</sub> /ml + gDEHV-1 200 µg/ml (0,2 ml)
Grupo 4	Vacina experimental gDEHV-1	gDEHV-1 200 µg/ml (0,2 ml)
Grupo 5	Controle	PBS 1x pH 7,4 + hidróxido de alumínio 10% (0,2 ml)

#### 4.7 Avaliação da resposta imune em modelo murino

Cinquenta camundongos BALB-c, machos, com 60 dias de idade, foram agrupados aleatoriamente em 5 grupos de 10 animais cada e receberam duas doses de vacina com intervalo de 21 dias, por via intramuscular (dias 0 e 21). Experimento aprovado pela



Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas, nº CEEA 5727-2017, de 11 de outubro de 2017.

Amostras de sangue foram coletadas para obtenção de soro nos dias 0, 21, 28, 35 e 47, colhidas das veias submandibulares. No dia 47 do experimento os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, e após esse procedimento, foi realizada a retirada do baço. A resposta imune humoral foi avaliada através da técnica de vírusneutralização, conforme descrito por Fischer et al. (2007), e ELISA utilizando o soro dos animais (WRIGHT et al., 1993).

Para a realização do ELISA, as placas de 96 poços (Costar, USA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4 °C, 100 µl/poço, com os seguintes antígenos diluídos em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6. Placas com 50 ng/poço da gDEHV-1 e placas com EHV-1, com título de  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml já diluído 1:10 no tampão carbonato bicarbonato. Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes com PBS tween 20 0,05% (PBS-T), sendo imediatamente submetidas a bloqueio com leite em pó desnatado (Molico®) diluído a 5% em PBS-T, em volume de 150 µl/poço, durante 60 minutos a 37 °C. As placas sofreram três lavagens com PBS-T e foram adicionados os soros sanguíneos dos camundongos, na diluição 1:100. Após o período de 60 minutos a 37 °C, as placas foram novamente submetidas a três lavagens e receberam o conjugado anti-mouse IgG – peroxidase produzido em coelho (Sigma-Aldrich®), diluído a 1:8000. Finalmente, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T e receberam a substância de revelação *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (OPD Sigma-Aldrich®), sendo mantidas a temperatura ambiente, no escuro, durante 15 minutos para que ocorresse a revelação. A revelação foi interrompida com a utilização de 100 µl/poço de solução de ácido sulfúrico 3%. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de microplacas Reader (Thermoplate) utilizando comprimento de onda de 490 nm.

O perfil da resposta imune foi avaliado pela técnica de qPCR, através da quantificação da transcrição relativa de genes de citocinas a partir do cultivo celular de esplenócitos dos animais eutanasiados ao final do experimento.

Os baços dos camundongos eutanasiados foram coletados assepticamente em capela de fluxo laminar, e para cada grupo foi feito um *pool* com 6 baços. Na sequência, 20 ml de solução de Hank's e 100 µl de EDTA 300 mM foram adicionados aos baços para mantê-los fisiologicamente em equilíbrio. Os baços foram macerados com o auxílio de um êmbolo de uma seringa de vidro em um *cell strainer* (BD-Falcon, USA), o material resultante foi passado para um tubo falcon e foram adicionados: 100 µl de EDTA 300 mM e solução

de Hank's até completar 40 ml, após foi centrifugado a 2000 rpm por 7 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 20 ml de solução de lise 1, após homogeneização, passados dois minutos, adicionou-se 20 ml de solução de lise 2 e 100 µl de EDTA 300 mM. Novamente foi realizada centrifugação a 2000 rpm por 7 minutos. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 40 ml de solução de Hank's para lavar as células. Após nova centrifugação a 2000 rpm durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células de cada falcon receberam 17 ml de meio RPMI com 10% de SFB. Após contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal, utilizando Azul de Tripán como corante, a quantidade de células viáveis foi padronizada em  $6 \times 10^6$ /ml e incubadas em placas de 24 cavidades, 1 ml/poço, em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Ao final desse período, observado o crescimento celular, foi realizado o desafio do cultivo com meio RPMI, concanavalina (Sigma-Aldrich®), gDEHV-1 e EHV-1 inativado, e nova incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, foi realizada. Finalmente, as células foram congeladas em Trizol (Invitrogen) e armazenadas em tubo de criopreservação a -75 °C até o momento das análises.

Foi realizada a extração do RNA conforme protocolo TRIzol™ Reagent (INVITROGEN, 2016), quantificação e síntese do cDNA. A quantificação da expressão relativa de mRNA foi feita por qRT-PCR utilizando os *primers* de INF-γ, IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17 (Tabela 4), β-actina foi usada como gene de referência endógeno. As reações foram realizadas no CFX96™ Real-Time System – C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). Para cálculo da expressão relativa foi utilizado o método matemático de Pfaffl (2001).

Tabela 4 – Citocinas e β-actina com respectivos *primers* e referências, utilizadas nas reações em cadeia da polimerase, em tempo real.

	<i>Primers</i>		Refer.
INF-γ	5' - GCGTCATTGAATCACACCTG	5' - TGAGCTCATTGAATGCTTGG	1
IL-4	5' - CCAAGGTGCTTCGCATATTT	5' - ATCGAAAAGCCCCGAAAGAGT	1
IL-10	5' - TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA	5' - ACAGGGGAGAAATCGATGACA	1
IL-12	5' - AGCACCAGCTTCTTCATCAGG	5' - CCTTTCTGGTTACACCCCTCC	2
IL-17	5' - GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	5' - AGCTTCCCTCCGCATTGA	1
β-actina	5' - AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	5' - CAATAGTGATGACCTGGCCGT	2

Fonte: 1 – Dummer et al. (2014); 2 – Cardona et al. (2003).

O cultivo celular de esplenócitos, dos grupos comercial, EHV-1 + gDEHV-1, gDEHV-1 e controle foram insuficientes para permitir uma análise da transcrição relativa de genes de citocinas, como mostra a Figura 8.

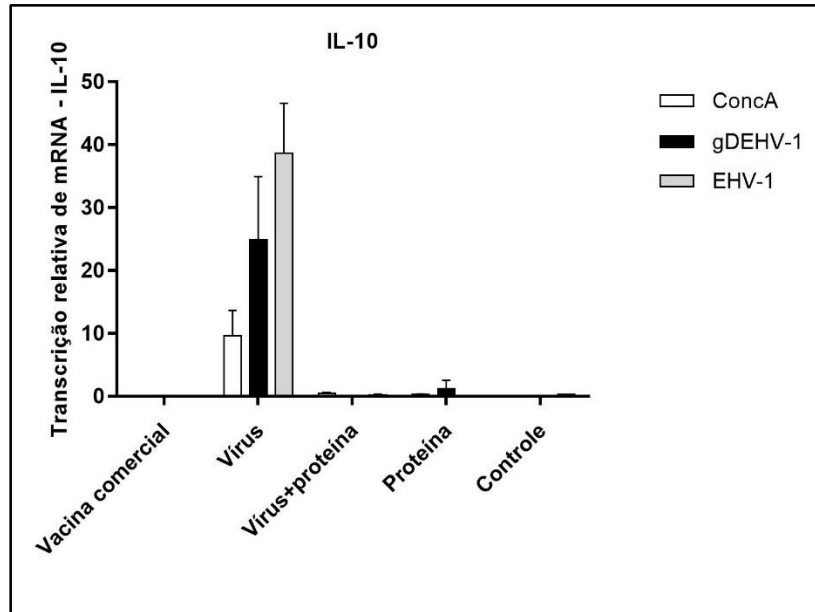


Figura 8 – Transcrição relativa de mRNA da interleucina 10 nos diferentes grupos vacinais após desafio com concanavalina, gDEHV-1 e EHV-1.

#### 4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* BioStat versão 5.3. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) com comparação entre médias não relacionadas pelo teste de Tukey.

## 5 Resultados e Discussão

Após 96 horas do início da indução com metanol, o sobrenadante dos diversos cultivos de *P. pastoris* estirpe KM71H realizados, eram filtrados (0,22  $\mu\text{m}$ ), tratados com 1 mM de PMSF e congelados a -20  $^{\circ}\text{C}$ , para posterior processamento. Na Figura 9, em gel de SDS-PAGE 12%, observou-se uma maior concentração da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, após a purificação do sobrenadante do clone Mut<sup>S</sup> 30, nas frações 4 e 5 da purificação. As frações 4, 5 e 6 desta purificação foram juntadas e a concentração da proteína foi estimada em 157 ng/ $\mu\text{l}$ .

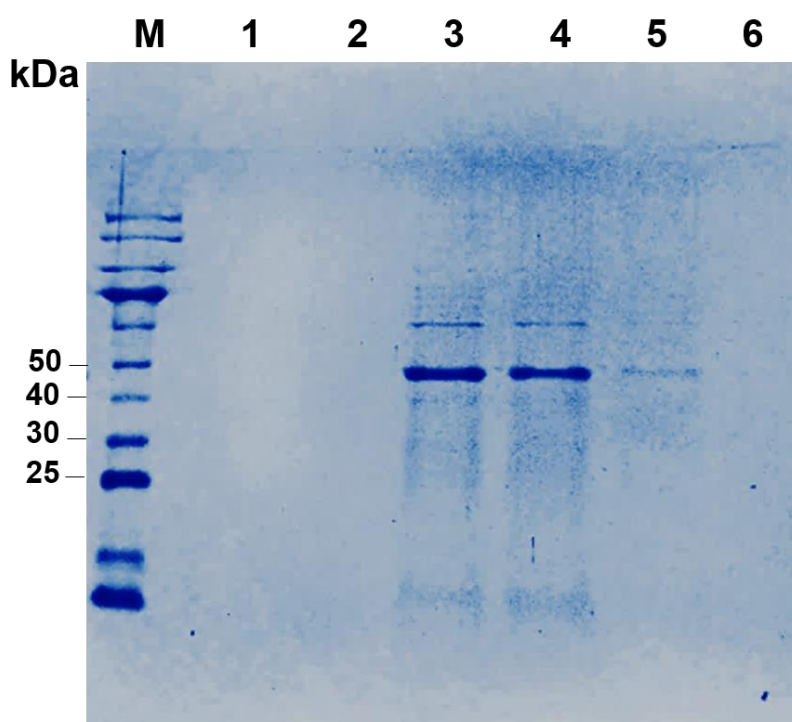


Figura 9 – Identificação, em gel de SDS-PAGE 12%, da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, nas frações 4, 5 e 6 da purificação (peso molecular 41 kDa) do sobrenadante do clone Mut<sup>S</sup> 30. M = marcador, 1 = fração 2 da purificação, 2 = fração 3 da purificação, 3 = fração 4 da purificação, 4 = fração 5 da purificação, 5 = fração 6 da purificação, 6 = fração 7 da purificação.

Amostras do sobrenadante dos cultivos, revelaram, em SDS-PAGE 12%, uma maior concentração da proteína após 72 horas do início da indução por metanol (dados não apresentados), resultado compatível com Ruitenbergh et al. (2001), que ao expressarem a glicoproteína D truncada do EHV-1 em *P. pastoris*, detectaram máxima concentração após

48 horas da indução. A linhagem de *P. pastoris* escolhida para a propagação do plasmídeo sintético, KM71H, possui fenótipo Mut<sup>S</sup>, ou seja, o gene *AOX1* foi deletado, ficando a metabolização do metanol sob condução do gene *AOX2*, controlado por um promotor fraco, sendo responsável por apenas 15% da atividade AOX total na célula, lentificando a velocidade de crescimento e conseqüentemente a expressão de proteínas pela levedura (KRAINER et al., 2012).

Após a purificação dos sobrenadantes dos cultivos, a proteína era visualizada em gel de SDS-PAGE 12%, porém o produto dos clones Mut<sup>S</sup> 29, 30, 50, 57 e 63 não foram identificados pelo MAb anti-histidina no *Western blot*. Promoveu-se, então, o tratamento do resultado da purificação de seis clones (1, 9, 29, 30, 36 e 63) e do clone 30 isoladamente, com a enzima Endo H. O resultado pode ser observado na Figura 10.

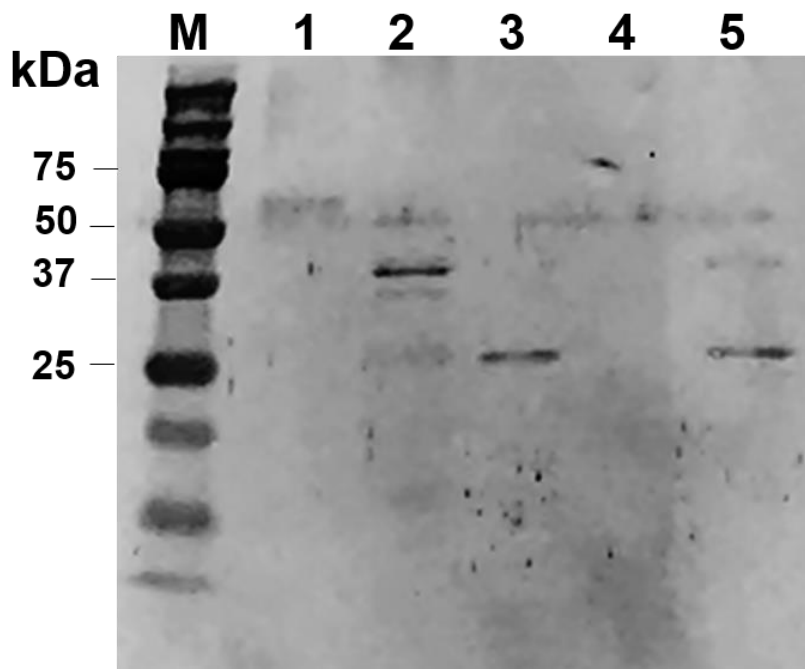


Figura 10 – Identificação da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, através da técnica de *Western blot*, marcada pelo anticorpo monoclonal anti-histidina (2, 3 e 5). M = marcador, 1 = sobrenadante de *Pichia pastoris* KM71H não transformada, 2 = produto da purificação do sobrenadante de seis clones Mut<sup>S</sup>, 3 = produto da purificação do sobrenadante de seis clones Mut<sup>S</sup> tratados pela enzima Endo H, 4 = produto da purificação do sobrenadante do clone Mut<sup>S</sup> 30, 5 = produto da purificação do sobrenadante do clone Mut<sup>S</sup> 30 tratado pela enzima Endo H.

A identificação da fração deglicosilada do produto do clone 30 e do produto dos seis clones, entre 25 e 37 kDa, e do produto dos seis clones (não tratado, 41 kDa) entre 37 e 50 kDa, mostrou que a N-glicosilação promovida pela *P. pastoris*, em alguns clones, impediu a identificação pelo MAb anti-histidina. A glicosilação pós-traducional possivelmente encobriu epítomos essenciais para a ligação do anticorpo anti-histidina. Ruitenber et al.

(2001), demonstraram a hiperglicosilação da gD recombinante do EHV-1 expressa em *P. pastoris* e sua identificação no *Western blot* com MAb anti-histidina somente após tratamento com a enzima Endo H. Conforme Audonnet et al. (1990) a gD do EHV-1 possui quatro sítios potenciais para N-glicosilação.

Para confirmar a antigenicidade da glicoproteína D recombinante do EHV-1, expressa em *P. pastoris*, foi realizado um *Western blot* utilizando um *pool* de soros de equinos positivos contra o vírus e o produto da purificação do sobrenadante dos clones Mut<sup>S</sup> 29 e 30 (Figura 11).

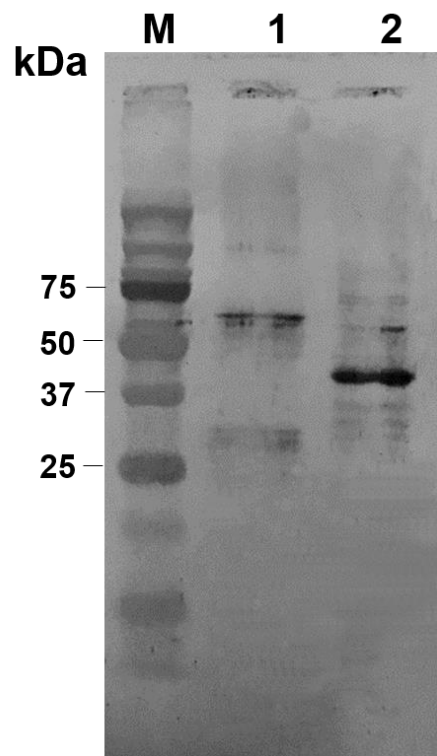
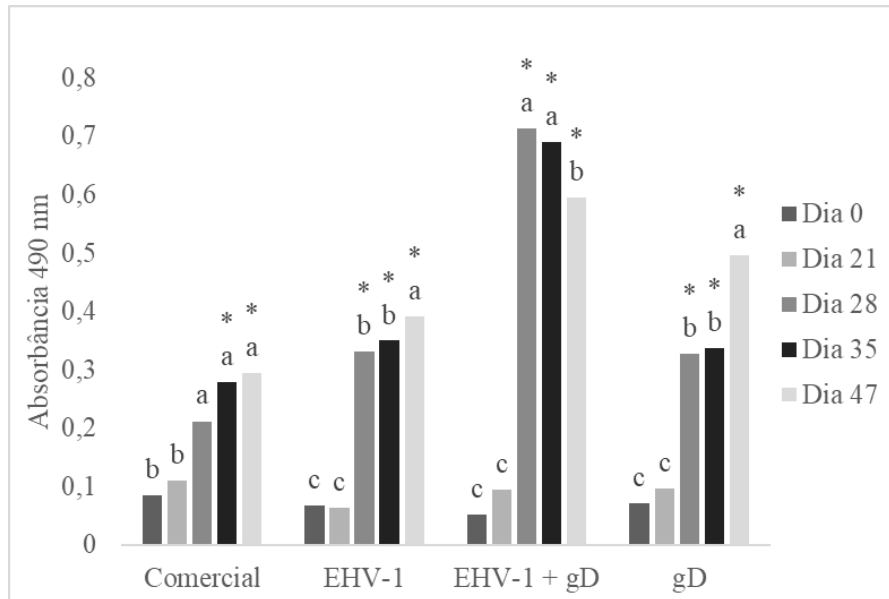


Figura 11 - Identificação da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, através da técnica de *Western blot*, marcada por anticorpos policlonais anti-EHV-1, peso molecular 41 kDa (2). M = marcador, 1 = sobrenadante de *Pichia pastoris* KM71H não transformada, 2 = produto da purificação do sobrenadante dos clones Mut<sup>S</sup> 29 e 30.

As amostras de soro dos camundongos foram avaliadas por ELISA indireto, com placas sensibilizadas com a gDEHV-1 (Figura 12) e EHV-1 (Figura 13), e vírusneutralização (Figura 14).



\* Indica diferença estatística em relação ao grupo controle pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ).

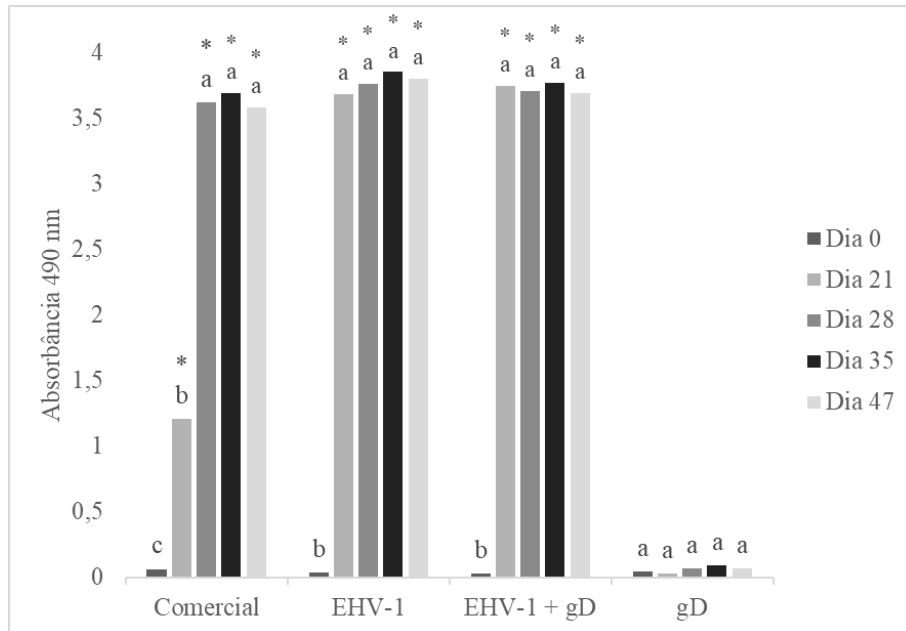
Letras diferentes no mesmo grupo vacinal indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 12 - Níveis de anticorpos específicos contra a glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, detectados por ELISA indireto. Os dados representam as médias em valores de ELISA de IgG total de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, nos diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras (pool,  $n=10$ ) usadas na diluição 1:100, em duplicata, títulos expressos na absorbância de 490 nm.

Os resultados expressos na Figura 12 mostraram que os anticorpos induzidos pela vacina comercial e pelas vacinas experimentais reconheceram a gDEHV-1 recombinante expressa em *P. pastoris*.

Após 21 dias da primeira vacinação, em nenhum dos grupos, os níveis de anticorpos anti-gDEHV-1 foram significativos em relação ao grupo controle. No dia 28, sete dias após a segunda vacinação, com exceção do grupo vacina comercial, todos os demais apresentaram títulos, no ELISA, estatisticamente superiores ao grupo controle, sendo que o grupo vacina EHV-1 + gDEHV-1 mostrou títulos superiores ao grupo EHV-1 e ao grupo gDEHV-1 ( $p < 0,01$ ). No dia 35, 14 dias após a segunda dose de vacina, todos os grupos diferiram do grupo controle, porém, novamente o grupo EHV-1 + gDEHV-1 foi superior aos grupos comercial, EHV-1 e gDEHV-1 ( $p < 0,01$ ). No dia 47, 26 dias após a segunda dose de vacina, novamente, todos os grupos apresentaram títulos superiores ao controle, entretanto, o grupo gDEHV-1 foi superior aos grupos vacina comercial e EHV-1 ( $p < 0,01$ ), e o grupo EHV-1 + gDEHV-1 foi superior a todos ( $p < 0,01$ ). Estes resultados demonstraram com clareza que associação da glicoproteína D recombinante do EHV-1 com o vírus íntegro, causou um incremento nos níveis de anticorpos específicos contra a gDEHV-1. Demonstrou também a imunogenicidade da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1 expressa em *P. Pastoris*. Foote et al. (2005), demonstraram que a gDEHV-1

recombinante produzida em baculovírus e formulada com adjuvante Iscomatrix™ induziu a formação de anticorpos vírus neutralizantes e anticorpos específicos para gD no ELISA no soro de mais de 90% dos equinos vacinados.



\* Indica diferença estatística em relação ao grupo controle pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ).

Letras diferentes no mesmo grupo vacinal indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 13 - Níveis de anticorpos específicos contra o herpesvírus equídeo 1, detectados por ELISA indireto. Os dados representam as médias em valores de ELISA de IgG total de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, nos diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras (pool,  $n=10$ ) usadas na diluição 1:100, em duplicata, títulos expressos na absorbância de 490 nm.

Os níveis de anticorpos induzidos pelas vacinas que utilizaram vírus íntegro na sua formulação, em relação a absorbância, em placas sensibilizadas com o EHV-1 inativado, foram marcadamente superiores quando comparados com placas sensibilizadas com a gDEHV-1. Este resultado é esperado, tendo em vista o número e a variedade de epítomos disponíveis nos poços sensibilizados e a diversidade de anticorpos induzidos pelo vírus inteiro. Araujo (2014), ao vacinar bovinos com a glicoproteína D recombinante do herpesvírus bovino 5, expressa em *P. pastoris*, também detectou níveis de anticorpos significativamente menores, ao comparar as respostas no ELISA, de placas sensibilizadas com o vírus íntegro das placas sensibilizadas com a proteína recombinante (gDBoHV-5).

Na Figura 13, observou-se que, decorridos 21 dias da primeira vacinação, com exceção do grupo gDEHV-1, os níveis de anticorpos induzidos pelos demais grupos foram estatisticamente superiores ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), porém os grupos EHV-1 e EHV-1 + gDEHV-1 foram superiores ao grupo vacina comercial ( $p < 0,01$ ).



Após segunda vacinação, dias 28, 35 e 47, com exceção do grupo gDEHV-1, todos os demais mostraram níveis de anticorpos significativamente superiores em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), porém sem diferença entre eles. Packiarajah et al. (1998), expressaram as glicoproteínas gB, gC e gD do EHV-1 em baculovírus, vacinaram camundongos com as proteínas isoladas e em combinação, e verificaram, no ELISA, uma fraca resposta de anticorpos contra a gC.

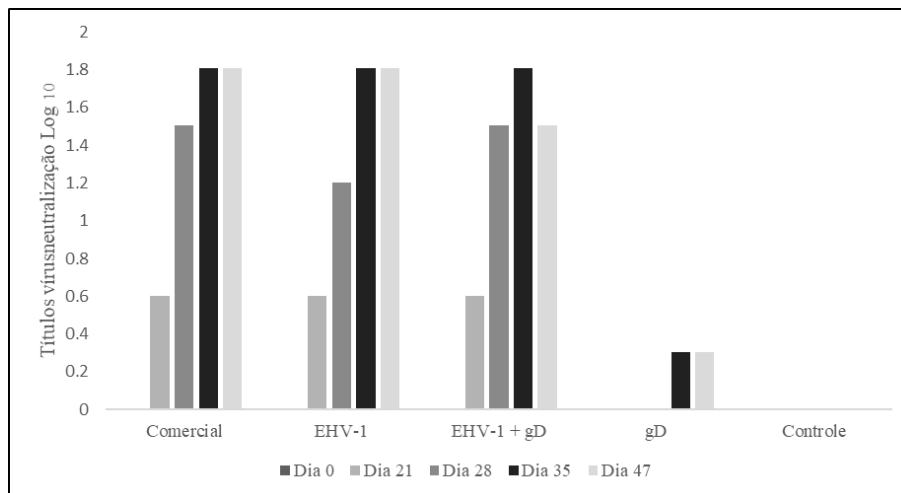


Figura 14 – Os dados representam os títulos de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus equídeo 1, de camundongos BALB-c vacinados nos dias 0 e 21, detectados através de vírusneutralização, em diferentes grupos vacinais, em função do tempo. Amostras (*pool*,  $n=10$ ).

Em relação aos níveis de anticorpos neutralizantes induzidos pelas diversas vacinas, em camundongos BALB-c (Figura 14), notou-se que as vacinas formuladas com vírus inteiro inativado, após 21 dias da primeira vacinação, mostraram títulos neutralizantes, que se elevaram gradativamente após a segunda dose de vacina, revelando, entre esses grupos, um mesmo padrão de resposta imune. A vacina produzida com a gDEHV-1 apresentou anticorpos neutralizantes após 14 dias da segunda dose de vacina (dias 35 e 47), porém com níveis baixos, possivelmente devido a produção de anticorpos de diferentes isotipos, não neutralizantes. Weerasinghe et al. (2006) demonstraram que camundongos e cavalos inoculados com a gDEHV-1 expressa em *E. coli* e baculovírus induziram anticorpos vírus neutralizantes e EHV-1 específicos no teste de ELISA.

## **6 Considerações Finais**

Os resultados encontrados permitem concluir que a glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, demonstrou sua antigenicidade e imunogenicidade em modelo murino e conservou epítomos que permitiram sua identificação por anticorpos específicos anti-EHV-1 induzidos por vacinas, comercial e experimental, formuladas com vírus íntegro inativado.

A vacina experimental contendo vírus íntegro (EHV-1) inativado acrescido da glicoproteína D recombinante do EHV-1 foi significativamente superior na indução de anticorpos específicos contra a gDEHV-1, no ELISA indireto, em comparação com as vacinas contendo vírus íntegro ou de subunidades do vírus.

## Referências

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301-5317, 2014.

AIELLO, S. E.; MOSES, M. A. (Eds). **The Merck Veterinary Manual**. 11. ed. Kenilworth: Merck & CO. INC, 2016. 2336p.

ALENCAR-ARARIPE, M. G.; MAIA, D. C. S. C.; CAMPELO, C. C.; SILVA JÚNIOR, A.; SILVA, M. C.; DIAS, A. V.; MEDEIROS, C. M. O.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Evidências sorológicas de EHV-1 / EHV-4 em cavalos de vaquejada no estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 203-217, abr./jun. 2014.

ALLEN, G. P.; KYDD, J. H.; SLATER, J. D.; SMITH, K. C. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equid herpesvirus abortion. In: WERNERY, U.; WADE, J. F.; MUMFORD, J. A.; KAADEN, O. R. (Eds), **Equine Infectious Diseases VIII: Proceedings of the 8th International Conference**, R & W Publications, Newmarket, p. 129-146, 1999.

ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39 (suplemento especial), p. 119-129, 2010.

ARAÚJO, I. L. **Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5**. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

AUDONNET, J. C.; WINSLOW, J.; ALLEN, G.; PAOLETTI, E. Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2969-2978, 1990.

BIOGRAMMATICS – Expression in the Language of Life. **A short history of *Pichia pastoris***. Disponível em: <<https://www.biogrammatrics.com/categories/pichia-pastoris-history>> .

BRYANS, J. T. Immunisation of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. In: BRYANS, J. T.; GERBER, H. (Eds). **Equine Infectious Diseases IV**. New Jersey: Veterinary Publication, 1978. P. 83-92.

CANAL, C. W.; VAZ, C. S. L., CIBULSKI, S. Vacinas víricas. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2017. Cap. 11, p. 361-394.

CARDONA, P. J.; GORDILLO, S.; DÍAZ, J.; et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5845-5854, 2003.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression. in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.

CSELLNER, H.; WALKER, C.; WELLINGTON, J. E.; et al. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2371-2385, 2000.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DIAZ, K. A. F. **Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e o vírus da arterite equina em tropas do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, UFF, 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Clínica e Reprodução Animal, Universidade Federal Fluminense, 2013.

DIAZ, K. A. F.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; FISCHER, G.; LILENBAUM, W.; LIMA, M. Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 410-418, 2015.

DIEL, D. G.; ALMEIDA, S. R.; WEIBLEN, R.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; KREUTZ, L. C.; GROFF, F. H. S.; FLORES, E. F. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em equinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1467-1473, set./out. 2006.

DOLL, E. R.; WALLACE, M. E.; BRYANS, J. T.; RICHARDS, M. G. Complement-fixation antibody response following administration of equine vírus abortion vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 14, n. 50, p. 46-48, 1953.

DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q. et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope 2 glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, p. 84-90, 2009.

DUMMER, L. A.; ARAUJO, I. L.; FINGER, P. F.; et al. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**, v. 32, n. 21, p. 2413-2419, 2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.011

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, n. 25, p. 1250-1256, 2007.

FOOTE, C. E.; LOVE, D. N.; GILKERSON, J. R.; ROTA, J.; TREVOR-JONES, P.; RUITENBERG, K. M.; WELLINGTON, J. E.; WHALLEY, J. M. Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, p. 47-57, 2005.

FOOTE, C. E.; LOVE, D. N.; GILKERSON, J. R.; WELLINGTON, J. E.; WHALLEY, J. M. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 41-46, 2006.

FRANCO, A. C.; VARELA, A. P. M.; ROEHE, P. M.; CARGNELUTTI, J. F. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2017. Cap. 18, p. 516-584.

GARRÉ, B.; VAN DER MEULEN, K.; NUGENT, J.; NEYTS, J.; CROUBELS, S.; DE BACKER, P.; NAUWYNCK, H. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvírus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 43-51, 2007a.

GARRÉ, B.; SHEBANY, K.; GRYSPEERDT, A.; BAERT, K.; VAN DER MEULEN, K.; NAUWYNCK, H.; DEPREZ, P.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous infusion of acyclovir and after oral administration of acyclovir and its prodrug valacyclovir in healthy adult horses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4308-4314, 2007b.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741-750, 2000.

GERBER, J. D.; MARRON, A. E.; BASS, E. P.; BECKENHAUER, W. H. Effect of age and pregnancy on the antibody and cell-mediated immune response of horses to equine Herpesvirus 1. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, n. 4, p. 471-478, 1977.

GHANEM, Y. M.; IBRAHIM, EL-S. M.; YAMADA, S.; MATSUMURA, T.; OSTERRIEDER, N.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. Molecular Characterization of the Equine Herpesvirus 1 Strains RaL11 and Kentucky D. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 5, p. 573-576, 2007.

GOEHRING, L. S.; WAGNER, B.; BIGBIE, R.; HUSSEY, S. B.; RAO, S.; MORLEY, P. S.; LUNN, D. P. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. **Vaccine**, v. 28, p. 5203-5211, 2010.

GOODMAN, L. B.; WAGNER, B.; FLAMINIO, M. J.; SUSSMAN, K. H.; METZGER, S. M.; HOLLAND, R.; OSTERRIEDER, N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). **Vaccine**, v. 24, p. 3636-3645, 2006.

HELDENS, J. G. M.; HANNANT, D.; CULLINANE, A. A.; PRENDERGAST, M. J.; MUMFORD, J. A.; NELLY, M.; KYDD, J. H.; WESTSTRATE, M. W.; HOVEN, R. V. D. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. **Vaccine**, v. 19, p. 4307-4317, 2001.

HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 367-375, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA, Pecuária, **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2014. Disponível em: <www.sibra.ibge.gov.br>.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**: 2017 Release. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)>.

INVITROGEN. Selecting a *Pichia* Expression Vector: pPICZ $\alpha$  A, B and C. **Easy Select™ Pichia Expression Kit - Manual**, p. 14, 2010.

INVITROGEN. **TRizol™ Reagent – user guide**. p. 1-6, 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>>.

JESSETT, D. M.; SCHRAG, D.; MUMFORD, J. A. Protection provided by an attenuated EHV-1 vaccine against challenge with the virulent EHV-1 Ab4 isolate. In: WERNERY, U.; WADE, J. F.; MUMFORD, J. A.; KAADEN, O. R. (Eds), Equine Infectious Diseases VIII: **Proceedings of the 8th International Conference**, R & W Publications, Newmarket, p. 414-415, 1999.

KRAINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HAJEK, T.; et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 22, p. 1-14, 2012. doi: 10.1186/1475-2859-11-22

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435-1438, 2009. doi: 10.1007/s10295-009-0638-4

KYDD, J. H.; TOWNSEND, H. G. G.; HANNANT, D. The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 15-30, 2006.

LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; ASANO, K. M.; FERNANDES, W. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E.; MORI, E. First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 221-224, abr./jun. 2008.

LARA, M. C. C. S. H.; TORELLI, C. S.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, M. S.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C.; MORI, E. Inquérito sorológico da infecção por herpesvírus equino no Estado de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 352-356, 2010.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos**. CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 250p. Disponível em: <[www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalos\\_completo.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalos_completo.pdf)>.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X. G.; et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105-124, 2007.

LIU, I. K. M.; CASTLEMAN, W. Equine posterior paresis associated with equine herpesvirus 1 vaccine in California: a preliminary report. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v. 12, p. 397-401, 1977.

LUNN, D. P.; DAVIS-POYNTER, N.; FLAMINIO, M. J. B. F.; HOROHOV, D. W.; OSTERRIEDER, K.; PUSTERLA, N.; TOWNSEND, H. G. G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 450-461, 2009.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalos**. Brasília, 2016. 54p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalos>>.

MARENZONI, M. L.; STEFANETTI, V.; DANZETTA, M. L.; TIMONEY, P. J. Gamma herpesvirus infections in equids: a review. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 91-101, 2015.

MAXWELL, L. K. Antiherpetic Drugs in Equine Medicine. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 33, n. 1, p. 99-125, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.12.002>

MAXWELL, L. K.; BENTZ, B. G.; GILLIAM, L. L.; RITCHEY, J. W.; PUSTERLA, N.; EBERLE, R.; HOLBROOK, T. C.; MCFARLANE, D.; et al. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 10, p. 1126-1139, 2017. doi: [doi.org/10.2460/ajvr.78.10.1126](https://doi.org/10.2460/ajvr.78.10.1126)

MERIAL. **Pneumequine**. Résumé des caractéristiques produit, 2018. Disponível em: <[http://fr.rcp.merial.com/SitePages/view\\_RCP\\_notice.aspx?NomProduit=pneumequine](http://fr.rcp.merial.com/SitePages/view_RCP_notice.aspx?NomProduit=pneumequine)>

MOREIRA, N.; KRUGER, E. R.; WARTH, J. F. G.; BIESDORF, S. M.; GOULARTE, M. M. M.; WEISS, R. R. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1998.



MORI, E. **Infecção experimental em cavalos pelo herpesvírus equino tipo 1: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia pela polimerase.** São Paulo: FMVZ/USP, 2005. 159p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; TYURIN, O. V.; KOZLOV, D. G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 3, p. 339-347, 2013. doi: 10.1007/s10482-013-9956-7

NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Genome.**

Disponível em:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?cmd=DetailsSearch&term=Pichia+pastoris&save\\_search=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?cmd=DetailsSearch&term=Pichia+pastoris&save_search=true).

NETT, J. H; HODEL, N.; RAUSCH, S.; WILDT, S. Cloning and disruption of the *Pichia pastoris* ARG1, ARG2, ARG3, HIS1, HIS2, HIS5, HIS6 genes and their use as auxotrophic markers. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 295-304, 2005.

NILSON, M. R.; CORRÊA, W. M. Isolamento do vírus do aborto eqüino no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 33, n. 2, p. 23-25, 1966.

PACKIARAJAH, P.; WALKER, C.; GILKERSON, J. et al. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus-expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB, gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 261-278, 1998.

PATEL, J. R.; HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 14-23, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012. doi: 10.1016/j.bej.2010.07.017

PURDY, C. W.; FORD, S. J.; GRANT, W. F. Equine rhinopneumonitis vírus (herpesvírus type 1): attenuation in stable monkey cell line. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 8, p. 1211-1215, 1977.

RUITENBERG, K. M.; GILKERSON, J. R.; WELLINGTON, J. E. et al. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. **Virus Research**, v. 79, p. 125-135, 2001.

SÁENZ, J. R.; URCUQUI-INCHIMA, S. Replicación del herpesvirus equino y su asociación con la patogénesis molecular. **Acta Biologica Colombiana**, v. 11, n. 2, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.

SINDAN – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN**, 2015. Disponível em: <[www.sindan.org.br](http://www.sindan.org.br)> .

SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2006. 1784p.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 55-62, 1997.

TELFORD, E. A. R.; WATSON, M. S.; MCBRIDE, K.; DAVISON, A. J. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus. **Virology**, v. 189, p. 304-316, 1992.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1992. 951p.

WEERASINGHE, C. U.; LEARMONTH, G. S.; GILKERSON, J. R.; et al. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *E. coli* provides partial protection against equine herpesvirus infection in mice and elicits virus-neutralizing antibodies in the horse. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 59-56, 2006.

WEIBLEN, R. Infecções por herpesvírus equino. In: RIET-CORREA et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 426p.

WRIGHT, P. F.; NILSSON, E.; VANROOIJ, E. M. A.; LELENTA, M.; JEGGO, M. H. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the

detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique de l'Office International des Epizooties**, v. 12, p. 435-450, 1993.

ZHANG, Y.; SMITH, P. M.; TARBET, E. T.; et al. Protective immunity against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection in mice induced by recombinant EHV-1 gD. **Virus Research**, v. 56, p. 11-24, 1998.

## **Anexos**

# Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 03 de outubro de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do herpesvírus equídeo tipo 1 em *Pichia pastoris* e avaliação de sua imunogenicidade” processo número 23110.005727/2017-98, de responsabilidade de **Fábio Pereira Leivas Leite** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	04/10/2017 a 31/08/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Balb/c
Nº de animais	50
Idade	28 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 5727-2017).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: Fábio P. Leite Data em: 03/10/2017