

Herpesvírus equino: isolamento, caracterização molecular de amostras de campo e desenvolvimento de um teste sorológico a partir de antígeno recombinante

PAULA DE ALMEIDA RODRIGUES¹; PAULO RICARDO CENTENO RODRIGUES²;
RODRIGO CASQUERO CUNHA³, FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴, MARCELO DE
LIMA⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel – paularodrigues201@gmail.com

²Médico Veterinário, Labvir, UFPel – priccenteno@hotmail.com

³Pós-doutorando PNPD, CD Tec-Núcleo Biotecnologia, UFPel-rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁴Professor Associado, CD Tec-Núcleo Biotecnologia, UFPel-fabio@leivasleite.com.br

⁵Professor Adjunto, Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel-mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos equinos do mundo, o que torna a equideocultura nacional de grande interesse social e econômico. Isto demonstra a importância da atividade, assim como a necessidade de intensificação da pesquisa visando a qualificação do setor e, principalmente, o manejo sanitário dos rebanhos. Dentre as enfermidades infecciosas que acometem os equinos, os herpesvírus possuem um papel importante e estão frequentemente relacionados com perdas econômicas significativas, por estarem associados a quadros clínicos respiratórios, reprodutivos e, menos frequentemente, sinais neurológicos (Ostlund, 1993). As infecções pelo herpesvírus equino tipos 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4) têm sido apontadas como as mais relevantes e estão associadas, essencialmente, com enfermidades respiratória e reprodutiva (Sáenz, 2006).

Estes vírus são membros da família Herpesviridae, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Chrinside et al, 2000). Os herpesvírus são vírus envelopados, com aproximadamente 150 nm de diâmetro, possuem um nucleocapsídeo icosaédrico e uma molécula linear de DNA cadeia dupla (Murphy, 1999). No EHV já foram identificadas 10 glicoproteínas estruturais: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL e gM. Além dessas, também foram identificadas outras glicoproteínas como a gp2, gp 21/22a e gp10, uma proteína encontrada no tegumento – substância amorfa presente entre o envelope e o capsídeo (Sáenz, 2006).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo EHV-1 pode ser realizado pelo isolamento e identificação do vírus a partir de amostras clínicas ou ainda pela sorologia pareada (OIE, 2008). A detecção de anticorpos no soro de animais com suspeita de infecção pelo EHV-1 geralmente é realizada pelas técnicas de soroneutralização (SN) e ELISA. Entretanto, a SN não permite a diferenciação entre os anticorpos induzidos após infecção pelo EHV-1 ou EHV-4 pela reatividade sorológica cruzada entre esses dois agentes. O objetivo do presente trabalho consiste na clonagem e expressão do gene da glicoproteína D (gD) do EHV-1 em sistema heterólogo (*Pichia pastoris*) para a produção de reagentes e testes de diagnóstico. Os resultados parciais obtidos estão apresentados a seguir.

2. METODOLOGIA

Células e vírus

A cepa *Kentucky* do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) foi replicada e titulada em células das linhagens RK13 e VERO. As monocamadas de células foram cultivadas em MEM contendo estreptomicina e penicilina (200 UI/mL), enrofloxacina (5 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL) acrescido de 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Extração de DNA

Células RK13 foram inoculadas com a cepa *Kentucky* do EHV-1 (moi=1) e mantidas em estufa a 37°C e 5%CO₂ por 48h. Após, o DNA viral foi extraído a partir do cultivo celular utilizando *TRizol Reagent®* (*Thermo Fischer*), conforme recomendações do fabricante. Após o protocolo de extração o DNA extraído foi quantificado por espectrometria (*NanoDrop™*).

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Um fragmento de DNA de 1.306 pb correspondente a um fragmento da glicoproteína D do EHV-1 (GenBank: AB279610.1) (GHANEM et al., 2007) foi amplificado por PCR utilizando os primers F-gD-HVE1-KD (GGCTCGAGAAAAGAATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGT) e R-gD-HVE1-KD (TCTAGACAAGCCGTTCTGTGCAGACTTT), em termociclador Biocycler MJ96G. As condições do PCR foram 94°C/2min seguidos de 30 ciclos de 94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/90seg e uma extensão final a 72°C/7min.

Clonagem

A amplificação do plasmídeo pPICZαA foi realizada em *Escherichia coli* TOP10F por choque térmico. Os clones foram selecionados em placas contendo zeocina (Zeocin™, Invitrogen; 25 µg/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). Após restrição enzimática do plasmídeo e do produto da PCR (gDEHV-1) com *Xhol* e *Xba*I, os produtos foram submetidos eletroforese em gel de agarose para confirmação da digestão. Os produtos foram extraídos do gel de agarose, purificados utilizando o *Gel Purification Kit®* (Ludwig Biotecnologia Ltda) e submetidos a reação de ligação com 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).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a inoculação da cepa Kentucky do EHV-1 em monocamadas de células das linhagens RK13 e VERO, foi observada uma replicação eficiente com a obtenção de título viral de 1×10^7 TCID₅₀/mL. Assim, monocamadas de células RK13 distribuídas em placas de 6 cavidades foram inoculadas com o EHV-1. Quando o efeito citopatogênico (ECP) foi observado em aproximadamente 80% das células, o sobrenadante foi dispensado e o DNA foi extraído a partir do *pellet* de células. Após quantificação do DNA extraído, o mesmo foi utilizado como molde na técnica de PCR onde os melhores resultados foram obtidos quando a temperatura de anelamento dos *primers* foi de 60°C. O amplicon obtido foi de 1.306bp (Figura 1).

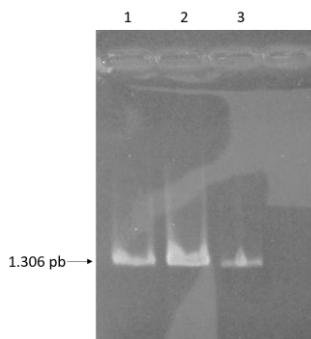


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando o resultado da amplificação do gene da gD do EHV-1 por PCR com diferentes temperaturas de anelamento (linha 1: 55 °C, linha 2: 60 °C, linha 3: 65 °C). Gel corado com brometo de etídeo.

Após purificação do inserto a partir do gel de agarose e digestão com as enzimas de restrição específicas, foi realizada a clonagem direcional no plasmídeo pPICZαA. Após a reação de ligação, foi realizada a transformação em *E. coli* cultivada em meio LB contendo zeocina, onde foi possível a observação de colônias isoladas. Após a extração do DNA plasmidial, foi observada a presença de prováveis clones recombinantes (pPICZαA-gDEHV) (Figura 2). Entretanto, não foi possível a confirmação da identidade do plasmídeo recombinante para a sua transformação em *P. pastoris* visando a produção da proteína recombinante.

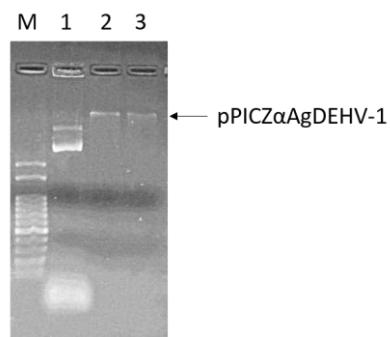


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1: vetor (pPICZ α A), linhas 2 e 3: DNA plasmidial de colônias transformadas com a ligação. M: Marcados de peso molecular (*DNA ladder*)

Em função dos problemas observados para a confirmação da identidade do plasmídeo recombinante, foi realizada a construção de um gene sintético contendo a sequência parcial do gene da gD do EHV-1 contendo ainda uma otimização de códons para expressão em *P. pastoris*. O gene foi克lonado no plasmídeo pPICZ α A e será transformado em *P. pastoris* para expressão da proteína recombinante.

4. CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem as seguintes conclusões: a) a cepa viral Kentucky do EHV-1 replicou eficientemente em células RK13 e VERO; b) a sequência parcial do gene da glicoproteína D do EHV-1 foi amplificada eficientemente a partir de DNA extraído de células infectadas com o EHV-1; c) foi realizada a construção do plasmídeo recombinante pPICZ α A-gDEHV, entretanto não foi possível a confirmação da sua identidade; d) foi sintetizada uma sequência de DNA com otimização de códons para expressão parcial da glicoproteína D do EHV-1 em *P. pastoris*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRINSIDE, E., SINCLAIR, R., MUMFORD, J.A. *Doenças respiratórias virais*. In:____ REED,S.M.; BAYLY,W.M. *Medicina Interna Equina*. Cap. 2.2, p. 79-85. Rio de Janeiro- ed. Guanabara Koogan. 2000.
- FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*, Santa Maria, ufsm, 2012. 2v.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. *Veterinary Virology*. ed.Elsevier – 3^a edição - 1999.
- SÁENZ, J.R., URCUQUI-INCHIMA, S. Replicación del herpesvirus equino y su asociación com la patogénesis molecular. *Acta Biol.Col.*, v.11, n. 2, 2006.
- OSTLUND, E.N. The equine herpesviruses. *Vet. Clin. North America: Equine Practice*, v.9,n.2,p.283-294, 1993.