

HERPESVÍRUS EQUINO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE CAMPO E DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE SOROLÓGICO A PARTIR DE ANTÍGENO RECOMBINANTE

EDUARDA DA SILVA HENZ¹; PAULO RICARDO CENTENO RODRIGUES²;
RODRIGO CASQUERO CUNHA³; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴, MARCELO DE LIMA⁵

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel – eduardahenz@hotmail.com

² Doutorando do PPGV, FAVET, UFPel, - priccenteno@hotmail.com

³ Pós-doutorando, CDTec - Núcleo Biotecnologia, - rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁴ Professor, CDTec - Núcleo Biotecnologia, UFPel - fabio@leivasleite.com.br

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

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos de equinos no 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. 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.

Estes agentes são membros da família Herpesviridae, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. 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 viral.

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. 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. O objetivo do presente trabalho consiste na clonagem e expressão do gene da glicoproteína D do EHV-1 em sistema heterólogo (*Pichia pastoris*) bem como a caracterização preliminar da proteína recombinante para uso na produção de reagentes e testes de diagnóstico.

METODOLOGIA

Clonagem, expressão e purificação da gD recombinante

Foi realizado a construção de um gene sintético contendo a sequência parcial da gD do EHV-1 associado a otimização de códons para expressão em *Pichia pastoris*. O gene foi clonado no plasmídeo *pPICZalphaA*. O plasmídeo recombinante

resultante foi denominado pPICZαA-gDEHV-1 (4.825 pb) e, após linearização, foi transformado em *P. pastoris* conforme descrito por Dummer et al. (2009).

Uma colônia isolada de cada clone selecionado foi inoculada em 500 ml contendo 100 ml de meio BMGY e incubada durante a noite em agitador orbital a 200 rpm, 28 °C, até atingir OD_{600 nm} = 4 (20-24 h). As culturas, após esse período, foram centrifugadas a 3.000 x *g* durante 5 min. à temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. O sedimento da cultura Mut^S foi ressuscitado em 10 ml de meio BMMY 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. Após esse processo, as culturas foram centrifugadas a 3.000 x *g* a 4 °C, durante 5 min. Os sobrenadantes foram separados, tratados com 1 mM de PMSF e congelados a -20 °C.

Os sobrenadantes do cultivo dos clones Mut^S selecionados foram purificados em coluna de cromatografia de afinidade de íons Ni²⁺ (Ni-NTA, Qiagen) no sistema de purificação de proteínas ÄKTA™ (GE Healthcare, WI, EUA), quantificados pelo método da curva padrão de albumina bovina (BSA).

Caracterização da proteína recombinante

As diferentes frações obtidas a partir da purificação da proteína recombinante foi submetida ao SDS-PAGE. A identificação da proteína foi realizada através do *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal Anti-histidina e um *pool* de soros de equinos soropositivos para o EHV-1 (títulos 32, 64 e ≥256).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a purificação, as diferentes frações da obtidas foram submetidas ao SDS-PAGE 12% (Figura 1). Foi possível observar uma maior concentração da glicoproteína D recombinante após a purificação do sobrenadante do clone Mut^S 30, nas frações 4 e 5 da purificação. As frações 4, 5 e 6 desta purificação foram homogeneizadas e a concentração final estimada em 157 ng/μl.

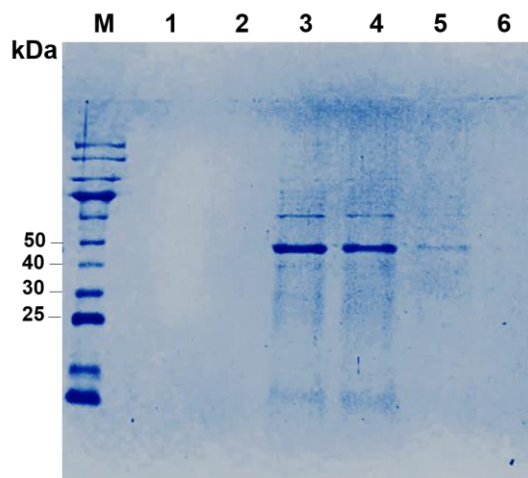


Figura 1: SDS-PAGE 12% da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1 expressa em *Pichia pastoris*, nas frações 4, 5 e 6 da purificação (peso molecular 41 kDa) do sobrenadante do clone Mut^S 30. M: marcador, 1: fração 2 da purificação, 2 = fração 3, 3: fração 4 da purificação, 4: fração 5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

A análise do sobrenadante dos cultivos revelaram 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^S, 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 consequentemente 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^S 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 2.

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-tradução possivelmente interferiu no reconhecimento de epítomos essenciais para a ligação do anticorpo anti-histidina. Ruitenbergh 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.

A confirmação da identidade da glicoproteína D recombinante do EHV-1, foi ainda realizada pelo *Western blot* utilizando um *pool* de soros coletados a partir de equinos naturalmente infectados e soropositivos ao vírus (Figura 2B).

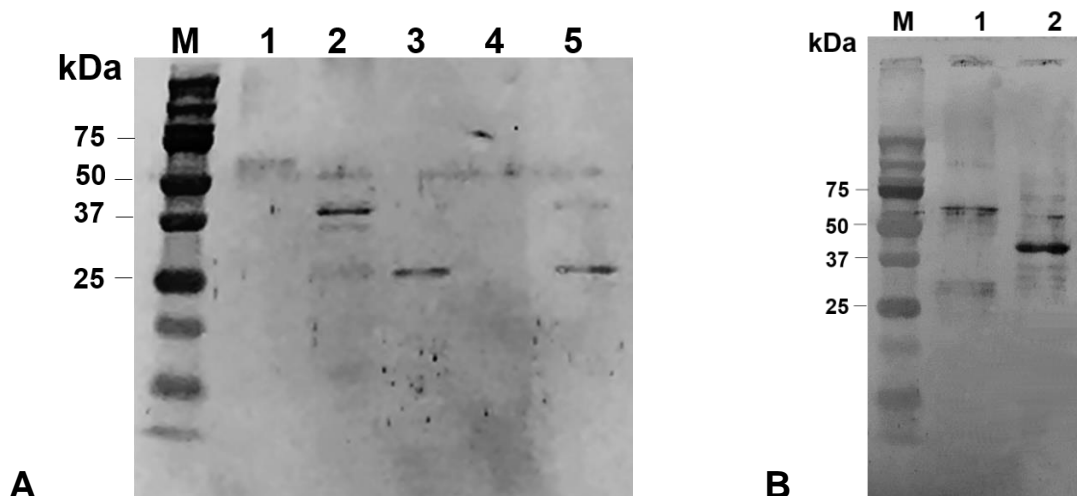


Figura 2. A: Glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, em membrana de nitrocelulose, marcada pelo anticorpo monoclonal anti-histidina (2, 3 e 5). M: marcador de peso molecular, 1: sobrenadante de *Pichia pastoris* KM71H não transformada, 2: produto da purificação do sobrenadante de seis clones Mut^S, 3: produto da purificação do

sobrenadante de seis clones Mut^S tratados pela enzima Endo H, 4: produto da purificação do sobrenadante do clone Mut^S 30, 5: produto da purificação do sobrenadante do clone Mut^S 30 tratado pela enzima Endo H. B: Visualização da glicoproteína D recombinante do herpesvírus equídeo 1, expressa em *Pichia pastoris*, em membrana de nitrocelulose, 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^S 29 e 30.

Atualmente, estão sendo conduzidos estudos adicionais no sentido de avaliar a imunogenicidade da gD recombinante em um modelo murinho.

CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem as seguintes conclusões: a) a glicoproteína D (gD) do herpesvírus equino tipo 1 foi eficientemente expressa em *P. pastoris* a partir de um gene sintético com otimização de códons; b) a proteína recombinante produzida foi reconhecida por um anticorpo monoclonal anti-histidina na forma glicosilada e após tratamento com Endo H; c) o soro de equinos naturalmente infectados pelo EHV-1 reconheceu a gD recombinante no western blot.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHRINSIDE, E.; SINCLAIR, R.; MUMFORD, J. A. *Doenças respiratórias virais*. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. *Medicina Interna Equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 22, p. 79-85, 2000.

FRANCO et al. Hesperiviridae. In FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*, Santa Maria, Ed. da UFSM, p. 517-584, 2017.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. *Veterinary Virology*. 3. ed. Elsevier, 1999.

OSTLUND, E. N. The equine herpesviruses. *Vet. Clin. North America: Equine Practice*, v. 9, n. 2, p. 283-294, 1993.

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 Biol. Col.*, v. 11, n. 2, 2006.