

## CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE UTILIZANDO GLICOPROTEÍNAS DE BOAHV-1 E 5 PARA VACINAÇÃO

MARINA STURBELLE GARCIA<sup>1</sup>; GABRIEL DA SILVA ZANI<sup>2</sup>; FLÁVIA BARTZ NUNES<sup>2</sup>; IZADORA DUMMER WEBER<sup>2</sup>; GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [sturbellemarina@gmail.com](mailto:sturbellemarina@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gzani27@gmail.com](mailto:gzani27@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [flaviabartznunes8@gmail.com](mailto:flaviabartznunes8@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [izadoradw@gmail.com](mailto:izadoradw@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [geferson.fischer@gmail.com](mailto:geferson.fischer@gmail.com)

### 1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Em rebanhos bovinos os herpesvírus mais prevalentes são o *Varicellovirus bovinealpha1* (BoAHV-1) e *Varicellovirus bovinealpha5* (BoAHV-5). O BoAHV-1 é associado a sinais clínicos respiratórios e reprodutivos, sendo o agente de enfermidades como a Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBV) e a Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP). Também comumente ocasiona abortos e infecções generalizadas em neonatos (INMAN et al., 2002). O BoAHV-5, por sua vez, é associado a sinais neurológicos, e é o agente da Meningoencefalite ou Encefalite Herpética Bovina, geralmente fatal, principalmente em animais jovens. Os animais podem apresentar convulsões, tremores, ataxia, nistagmo e em casos mais graves óbito (SILVA et al., 2023).

As glicoproteínas do envelope viral apresentam grande relevância no ciclo viral dos vírus da família *Orthoherpesviridae*, pois são responsáveis pela ligação aos receptores celulares e penetração nas células do hospedeiro, tornando-as opções viáveis no desenvolvimento de vacinas. Em relação aos BoAHV-1 e BoAHV-5, apresentam alto grau de homologia, tanto estrutural quanto funcional, o que no ponto de vista da imunização é interessante pois pode conferir proteção cruzada (QUINTERO BARBOSA et al., 2023). As mais importantes são a glicoproteína B (gB), glicoproteína C (gC) e glicoproteína D (gD), tornando-as ótimas candidatas a construção de uma proteína multiepítipo através de imunoinformática, para posterior formulação de uma vacina utilizando proteína recombinante. Essas glicoproteínas são responsáveis pela interação inicial entre o patógeno e hospedeiro.

### 2. ANÁLISE DE MERCADO

O rebanho bovino brasileiro possui cerca de 238 milhões de cabeças, sendo que em 2025 a pecuária já movimentou aproximadamente 203 bilhões de reais (IBGE, 2025). Tais números evidenciam a lucratividade e importância desse mercado para a economia brasileira, sendo que no primeiro trimestre de 2025 o PIB dos serviços relacionados ao agronegócio avançou 6,27%, impactado em 9,65% pelos serviços relacionados a pecuária (Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária, 2025). Esse produto tem como objetivo a manutenção do bem-estar bem como da sanidade animal através da prevenção de enfermidades que podem impactar os rebanhos trazendo grandes perdas econômicas aos produtores.

As vacinas vivas atenuadas para BoAHV-1, apesar de induzirem uma rápida e robusta resposta imune, podem causar abortos, impossibilitando seu uso em fêmeas prenhes. Uma alternativa é o uso de vacinas inativadas, porém para a

produção dessas, são necessários processos que aumentam seu custo. Nesse cenário as vacinas utilizando as glicoproteínas do envelope tem sido uma alternativa que poderia ser administrada em fêmeas prenhes (WEN et al., 2020).

### 3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Através de bioinformática foi possível construir a proteína quimérica utilizando as glicoproteínas de maior impacto no ciclo viral sendo elas a gB, gC e gD. Foram feitas diversas construções, utilizando diferentes ligantes e as glicoproteínas dispostas de diversas maneiras. A partir dos resultados obtidos através da imunoinformática foram selecionadas as mais promissoras para realizar a caracterização. Após um teste de expressão utilizando três construções, foi selecionada uma, que foi expressa e está sendo testada.

A expressão de proteínas recombinantes ocorreu em parceria com o Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BioPro). A técnica iniciou com a transformação por choque térmico da cepa *Escherichia coli* STAR, utilizou-se o vetor pET28a contendo a sequência de interesse. Em seguida foi realizada a cultura em meio Luria Bertani acrescido de antibiótico. Para realização do pré-inóculo em um Erlenmeyer contendo meio LB e antibiótico, foi adicionada uma colônia isolada proveniente da etapa anterior. O pré-inóculo permaneceu sob agitação de 90 rpm, a temperatura de 37°C, *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a inoculação em um volume maior de meio LB, também contendo antibiótico, que permaneceu sob agitação de 180 rpm durante 3 horas, a 37°C, aferindo a absorbância utilizando o espectrofotômetro de hora em hora.

A etapa de indução foi iniciada quando o valor de absorbância da cultura atingiu entre 0,6 e 0,8 adicionando IPTG, colocando sob agitação de 180 rpm a 37°C durante 3 horas. Os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e submetidos a centrifugação visando a formação de *pellets*, que foram armazenados sob temperatura de -20°C até o momento de seu processamento. Os *pellets* foram ressuspensos para que fosse iniciada a etapa de lise celular, adicionando lisozima e fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), e posteriormente sonicação do cultivo. Após o cultivo foi centrifugado, com o objetivo de separar as frações insolúvel e solúvel da proteína recombinante. A porção insolúvel foi encaminhada a câmara fria *overnight*, sob agitação, para que ocorresse sua solubilização. Após foi realizada mais uma centrifugação e a filtração dessa porção, a fim de remover sujidades.

A etapa de purificação foi realizada utilizando cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de Sepharose Histrap™ FF Crude. No equipamento inicialmente ocorreu uma etapa de lavagem utilizando solução de lavagem com ureia, em seguida foi processada a solução contendo a proteína que deveria permanecer ligada a coluna devido á afinidade da cauda de histidina inserida na construção da proteína com o níquel contido na coluna. Por fim, foi realizada a etapa de eluição, que possui como objetivo desprender a proteína da coluna. Foi realizada utilizando um gradiente de soluções contendo solução de lavagem com ureia e solução de eluição com ureia, aumentando gradativamente a concentração de elution até atingir a concentração de 100%. Todo esse processo foi realizado utilizando o equipamento ÄKTA purifier.

A etapa de diálise foi realizada com o objetivo de remover a ureia da solução para que a proteína retornasse a sua conformação tridimensional. A quantificação foi realizada pelo método de BCA que é um método colorimétrico que se utiliza de padrões de concentração proteica conhecida e por comparação é possível quantificar as amostras. Após as frações obtidas devem ser liofilizadas para

armazenamento até seu uso, quando é feita a ressuspensão do conteúdo para a obtenção da vacina.

Para caracterização da proteína multiepitopo foi utilizado *Western Blotting*. Em eppendorfs foram pipetados 15 µL de amostra e 5 µL de tampão de amostra, esses foram incubados a 100°C por 10 minutos para promover a desnaturação proteica. As amostras e o marcador foram aplicados no gel de poliacrilamida a 12% e submetidos a eletroforese por aproximadamente 2 horas a 120 V. Após, foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada utilizando uma solução de 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a 4°C, seguido por sucessivas lavagens utilizando PBS 1x acrescido de *Tween* 20. Para a etapa de detecção foi adicionado anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase diluído a uma proporção 1:10000. Após lavagens foi realizada a revelação utilizando uma solução contendo 9 mL de Tris-HCl 50mM, 2 mL de sulfato de níquel, 0,0012g de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) e 20 µL de peróxido de hidrogênio.

A partir dos resultados foi possível depositar uma patente referente a construção e utilização da proteína quimérica em formulações vacinais, com o título “Proteína quimérica dos Alpha herpesvirus bovinos 1 e 5 para vacinação e diagnóstico” (BR 10 2024 024939 9), garantindo a exclusividade do produto e caráter inovador desse. Atualmente, a invenção se encontra em nível 3 de Maturidade Tecnológica (TLR) pois ainda estão sendo realizados testes em menor escala e ainda não foram definidas estratégias para que seja produzida em larga escala e comercializada.

Dentre os maiores desafios enfrentados atualmente para que seja atingido um nível maior de maturidade tecnológica estão a produção em larga escala para que seja realizado a testagem tanto *in vitro* quanto *in vivo* para verificar sua ação em situações a campo. Também deve ser ressaltado a provável resistência que haverá dos consumidores visto que já existem produtos consolidados no mercado, utilizando outras tecnologias.

#### 4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Através do *Western blotting* foi possível verificar que a proteína recombinante foi expressa devido à presença de uma banda com peso molecular aproximado de 33 kDa, sendo esse o esperado. Após o processamento e purificação da proteína foi realizado um novo teste onde a proteína foi reconhecida pelo anticorpo anti-histidina, e apresentou uma banda referente ao peso molecular esperado para essa molécula.

Após o fim da etapa de desenvolvimento e caracterização é esperado que seja obtida uma vacina que induza resposta imunológica com menos efeitos adversos do que as já presentes no mercado. É preciso, também, conseguir atingir a produção em larga escala para observar os resultados em um número maior de animais. Por fim, espera-se que a vacina possa ser validada e posteriormente comercializada como um produto.

Esse produto visa a manutenção da sanidade dos rebanhos visando, além de manter o bem-estar, aumentar a produtividade impactando diretamente os produtores e a economia tanto do Rio Grande do Sul quanto do Brasil.

#### 5. CONCLUSÕES

Conclui-se que a proteína quimérica possui potencial para ser aplicada em vacinação, mas ainda são necessários outros testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*

para que seja implementada como produto. Além disso, é preciso que se desenvolva estratégias para que essa seja produzida em grandes quantidades capazes de suprir a demanda necessária e aplicar a inovação na rotina a campo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROPECUÁRIA Brasileira em Números - julho de 2025. IBGE, 16 jul. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros/abn-2025-07.pdf/view>. Acesso em: 19 ago. 2025.

PIB do agronegócio registra crescimento de 6,49% no primeiro trimestre de 2025. [S. l.], 17 jun. 2025. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/publicacoes/pib-do-agronegocio-registra-crescimento-de-6-49-no-primeiro-trimestre-de-2025#:~:text=No%20primeiro%20trimestre%20de%202025%2C%20o%20PIB%20dos%20servi%C3%A7os%20do,ao%20desempenho%20dos%20demais%20setores>. Acesso em: 19 ago. 2025.

INMAN, Melissa *et al.* A Mutation in the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Disrupts the Latency Reactivation Cycle in Calves. *Journal of Virology*, v. 76, n. 13, p. 6771–6779, jul. 2002.

QUINTERO BARBOSA, Juan Sebastian *et al.* Humoral Immune Response of Mice against a Vaccine Candidate Composed of a Chimera of gB of Bovine Alphaherpesviruses 1 and 5. *Vaccines*, v. 11, n. 7, 1 jul. 2023.

SILVA, Daniele Gonçalves *et al.* Innate and adaptive immune gene expression in the brain is associated with neuropathological changes after infection with bovine alpha-herpesvirus-5 in mice. *Veterinary Microbiology*, v. 285, 1 out. 2023.

WEN, Xiaobo *et al.* Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type I in a rabbit model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 7, p. 3011–3023, 1 abr. 2020.