

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Agrícola



Dissertação

**Clonagem e expressão em *Pichia pastoris* da forma
truncada da glicoproteína D (gD) de Herpesvírus
Bovino tipo 5**

Luana Alves Dummer

Pelotas, 2008

LUANA ALVES DUMMER

Clonagem e expressão em *Pichia pastoris* da forma truncada da glicoproteína D (gD) de Herpesvírus Bovino tipo 5

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Co-orientadores: Fabricio Rochedo Conceição

Telmo Vidor

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dario e Eloá, pelo amor, companheirismo, exemplo, paciência, pelo incentivo e sinceridade neste e em outros momentos importantes da minha formação;

Aos meus irmãos e seus companheiros, pelo exemplo, amizade e carinho. E aos meus sobrinhos que, após cada sorriso, me deram energia para continuar;

Ao meu namorado Otávio C. Cordeiro, pelo amor, compreensão, amizade, paciência e preocupação e também pelos tediosos feriados e finais de semana em que me fez companhia no laboratório;

Ao meu orientador, Fábio P. L. Leite, por ter acreditado e incentivado. Pela amizade, carinho, sinceridade e paciência. Por ter compartilhado suas experiências acadêmicas e me ajudado a manter o ritmo e o foco da pesquisa, mesmo quando esta parecia não ter solução.

Aos meus co-orientadores, Fabricio R. Conceição e Telmo Vidor, por terem fornecido a base necessária para o desenvolvimento deste trabalho, pela sinceridade, amizade, incentivo e carinho.

Aos professores do Centro de Biotecnologia, Carlos Gil Turnes, Odir A. Dellagostin e José A. Aleixo, por terem me acolhido em seus laboratórios e por terem compartilhado os seus conhecimentos e experiências acadêmicas;

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Carina, Andréa, Leandro, Lorena, Talita, João Rodrigo, Otávio, Adalgisa e aos estagiários: Rodrigo, Alceu, Mariana, André, Paula e Cleonice. Sem o apoio e a alegria de todos vocês este trabalho não teria o mesmo significado.

Aos muitos colegas e amigos dos demais Laboratórios do Centro de Biotecnologia, à Alegani e à Michele, aos amigos dos Laboratórios de Imunologia do Instituto de Biologia e de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária, pelos momentos queridos e pela aprendizagem obtida durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do Edital Universal (478461/2004-6) e da Bolsa de Apoio Técnico concedida ao Prof. Odir A. Dellagostin.

Muito Obrigada!

RESUMO

DUMMER, Luana Alves. **Clonagem e expressão em *Pichia pastoris* da glicoproteína D (gD) de Herpesvírus Bovino tipo 5**. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Surtos de meningoencefalites fatais causadas pelo Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) ocasionam importantes perdas econômicas no comércio nacional de carne bovina. Vacinas comerciais destinadas ao Herpesvírus Bovino tipo 1 são capazes de impedir o aparecimento de sintomatologia clínica do BoHV-5. Estas reações cruzadas se devem a existência de semelhanças genéticas e antigênicas existentes entre ambos os vírus. No entanto, estas vacinas não impedem o estabelecimento da infecção latente e a disseminação do BoHV-5 para animais não imunizados. Desta forma, estratégias que visem à produção de vacinas seguras, economicamente viáveis e que possam ser capazes de impedir a latência do BoHV-5 e sua disseminação estão focadas para glicoproteínas localizadas no envelope viral e que atuam nas etapas iniciais da infecção. Dentre estas, a glicoproteína D tem se destacado em estudos realizados com BoHV-1 e outros herpesvírus homólogos. A gD atua na fusão do envelope viral com a membrana da célula permissiva no hospedeiro através de interações com receptores celulares e com outras glicoproteínas virais, sendo essencial para a entrada do capsídeo na célula. Assim, uma vacina que seja capaz de estimular respostas humorais e celulares contra esta glicoproteína deve ser desenvolvida. Os objetivos deste trabalho foram à produção da forma truncada da gD do BoHV-5 em levedura *Pichia pastoris* e a avaliação desta quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade. Os resultados demonstram que a *Pichia pastoris* expressou a forma truncada da gD de BoHV-5 secretando para o meio de cultivo ~190mg/L da proteína recombinante, facilitando a purificação da mesma. Testada quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade, a proteína recombinante foi reconhecida por anticorpos de animais imunizados com o BoHV-5, sugerindo que características da proteína nativa foram conservadas na proteína recombinante. Os dados apresentados irão permitir o desenvolvimento de estudos

futuros com o objetivo de aperfeiçoar a expressão da proteína recombinante e avaliar a sua capacidade de neutralizar o vírus na espécie-alvo.

Palavras-chave: Herpesvirus, Bovinos, *Pichia pastoris*, glicoproteína D, proteína recombinante.

ABSTRACT

DUMMER, Luana Alves. **Clonagem e expressão em *Pichia pastoris* da glicoproteína D (gD) de Herpesvírus Bovino tipo 5**. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Outbreaks of fatal meningoencephalitis caused by Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) cause important economic losses in national trade of bovine beef. Commercial vaccines developed against Bovine Herpesvirus type 1 can protect cattle of neurological disease caused by BoHV-5. These cross-reactions are due to its genetic and antigenic similarities of both BoHV-1 and 5. However, these vaccines can not prevent latent infection of BoHV-5, even viral spread to healthy animals. This way, new vaccines strategies are based on envelope glycoproteins and are focusing safety, economic viability and on prevention of BoHV-5 latency and spread. This glycoprotein acts in initial steps of viral infection and glycoprotein D has drawn the attention in studies carried out with BoHV-1 and other homologous herpesvirus. The gD acts on viral membrane fusion with permissive cells through glycoproteins and host receptors interactions, so it is essential for viral entry. A vaccine that is capable to stimulate specific humoral and cellular immunity against BoHV-5 must be developed. The aim of this work was the production of a recombinant truncated form of gD of BoHV-5 in yeast *Pichia pastoris* and its antigenicity and immunogenicity evaluation. Data show that yeast *P. pastoris* can express the truncated form of BoHV-5 gD to the supernatant due to its secretion of ~190mg/L of recombinant protein, simplifying protein purification. The recombinant protein was successfully recognized by antibodies of animals immunized with BoHV-5, suggesting its antigenicity and immunogenicity and that native protein characteristic are conserved. The data presented herein allow the design of future studies aiming at expression optimization and further immunogenicity evaluation, as well as its capacity to neutralize the v in biological models and on cattle.

Keywords: Herpesvirus, Bovines, *Pichia pastoris*, glycoprotein D, recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise da amplificação do gene da glicoproteína D de BoHV-5 por PCR. Construção esquemática do vetor de expressão.....	43
Figura 2	<i>Colony blotting</i> de <i>Pichia pastoris</i> cepa KM71H transformadas.....	44
Figura 3	<i>Dot blotting</i> da expressão de tgD em <i>Pichia pastoris</i>	45
Figura 4	SDS-PAGE e <i>dot blotting</i> da precipitação com sulfato de amônio.....	46
Figura 5	Deglicosilação enzimática da proteína recombinante pela enzima Endo-H.....	47
Figura 6	<i>Western blotting</i> com soro de animais imunizados com a proteína recombinante.....	48
Figura 7	<i>Western blotting</i> com soro de animais imunizados com BoHV-5.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	- Citotoxicidade Dependente de Anticorpos	MHC	- Complexo Principal de Histo-compatibilidade
AOX	- Álcool Oxidase	Mut ^S	- <i>Utilização Lenta de Metanol</i>
BoHV	- Herpesvírus Bovino	Mut ⁺	- <i>Utilização Rápida de Metanol</i>
CPE	- Efeito Citopático	NK	- Assassinas Naturais
CTL	- Linfócitos T Citotóxicos	ODN	- Oligodeoxinucleotídeos
EHV	- Herpesvírus Equino	PMN	- Polimorfonucleares
HBV	- Vírus da Hepatite B	SARS	- Síndrome Respiratória Severa Aguda
HCV	- Vírus da Hepatite C	SNC	- Sistema Nervoso Central
HVEM	- Mediador de entrada do Herpesvírus	SuHV	- Herpesvírus Suíno
His4	- Histidinol Dehidrogenase 4	TG	- Gânglio Trigêmeo
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana	tgD	- Glicoproteína D truncada
HSV	- Herpesvírus Simplex	TNFR	- Receptor do Fator de Necrose Tumoral
IFN	- Interferon	U _L	- Seqüência Única Longa
Ig	- Imunoglobulina	U _S	- Seqüência Única Curta
IL	- Interleucina	VHS	- Silenciamento Viral do Hospedeiro
LR	- Resistência à Latência	VZV	- Vírus da Varicella Zoster
MAb	- Anticorpo Monoclonal		
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1	HERPESVÍRUS	12
1.2	HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5	14
1.3	IMUNOLOGIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5	19
1.4	IMPORTÂNCIA DA gD NA IMUNOLOGIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5	22
1.5	<i>PICHA PASTORIS</i> COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS..	25
2	ARTIGO	30
	ABSTRACT	32
	INTRODUCTION	33
	MATERIALS AND METHODS	36
	RESULTS	42
	DISCUSSION	49
	ACKNOWLEDGMENTS	53
	REFERENCES	53
3	CONCLUSÃO.....	63
4	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, atingindo, em 2007, um plantel de 207,2 milhões de cabeças (SANTOS et al., 2007). Neste mesmo ano as exportações brasileiras de carne totalizaram €7,2 bilhões, sendo a carne bovina responsável por €2,8 bilhões, ou seja, 1,6 milhões de toneladas de carne bovina exportada (AGRONEGÓCIO BRASILEIRO, 2006; BALANÇA COMERCIAL DO AGRONEGÓCIO, 2007). Desta forma, o país é atualmente o maior exportador mundial de carne bovina, tendo como principais importadores do produto *in natura* a Rússia, o Egito e os Países Baixos (SANTOS et al., 2007).

As regiões Centro-Oeste e Sul destacam-se na produção de carne bovina e o Rio Grande do Sul, além de contribuir significativamente para a exportação de carne, é considerado um dos principais estados produtores de leite do país, juntamente com os Estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná (AGRONEGÓCIO BRASILEIRO, 2007).

Apesar dos resultados apresentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) serem satisfatórios, o Brasil ainda possui grandes perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem os rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda dos animais.

As doenças neurológicas, por exemplo, ocupam papel de destaque entre aquelas que mais afetam ruminantes (FILHO et al., 2005), uma vez que muitas apresentam alta morbidade e letalidade e desta forma contribuem com as perdas econômicas não apenas nacionais como internacionais (SANCHES et al., 2000, CLAUS et al., 2007). Destacam-se, dentre estas neuropatias, as causadas por vírus da Família *Herpesviridae*.

1.1 Herpesvírus

Os vírus pertencentes à família *Herpesviridae* estão entre os maiores vírus da natureza, possuindo um sucesso evolucionário extraordinário, adaptando mecanismos muito específicos não apenas para escapar das defesas do hospedeiro e usurpar a maquinaria da célula infectada na produção das progênes virais, como para silenciar a sua própria replicação lítica durante as infecções latentes (WHITLEY; GNANN, 1993; COHRS; GILDEN, 2001; SPEAR; LONGNECKER, 2003). O nome, derivado do grego *ερπειν* (*herpein*: *rastejar*), refere-se à característica das lesões causadas pelos principais herpesvírus de humanos, o Herpes Simplex (HSV) e o Varicella Zoster (VZV), de espalhar-se lentamente, em uma única direção, de forma seqüencial. A família possui aproximadamente 200 vírus isolados de hospedeiros diversos, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (THIRY, J. et al., 2006).

Os herpesvírus possuem características morfológicas comuns, como: genoma formado por fita dupla de DNA, envolto por um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 160 capsômeros e uma camada amorfa de proteínas chamada tegumento. Externamente são revestidos por um envelope, formado por uma bicamada lipídica apresentando espículas que são glicoproteínas responsáveis pelas interações vírus-célula, e possuem entre 100-200nm de diâmetro (ROIZMAN; SEARS 1987; THIRY, J. et al., 2006; RISSI et al., 2007). A família é ainda subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*; *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*, as quais são caracterizadas pela velocidade de replicação, severidade do efeito citopático (*Cytopathic Effect* - CPE) originado e tropismo pelas células onde ocorrerá a infecção latente (WAGNER; BLOOM, 1997; SPEAR; LONGNECKER, 2003; THIRY, J. et al., 2006).

Infecções de ruminantes pelos Herpesvírus podem resultar em doenças apresentando sintomatologia leve, localizada, ou, que podem ocasionar a morte do animal (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Grande parte das infecções, no entanto, ocorre sem sinais clínicos aparentes, mas com estabelecimento de latência, as quais poderão ser reativadas e causar recorrência na enfermidade ou novos episódios da doença (BAGUST; CLARCK, 1972; ENGELS; ACKERMANN, 1996; SPEAR;

1 LONGNECKER, 2003; VOGEL et al., 2003). A transmissão dos Herpesvírus que
2 afetam ruminantes ocorre, de forma geral, através do contato direto com aerossóis,
3 contato íntimo entre os animais (mucosas infectadas) ou ainda pela transmissão
4 indireta, através da água e comida contaminadas (ENGELS; ACKERMANN, 1996;
5 RISSI et al., 2007) e práticas de inseminação artificial (GOMES et al., 2003).

6 A infecção e a disseminação dos Herpesvírus normalmente ocorrem através
7 das cavidades revestidas por células epiteliais de mucosa, como a cavidade nasal,
8 orofaringe, conjuntiva, trato genital ou a pele lesionada, no caso do Herpesvírus
9 Bovino tipo 2 (*Bovine Herpes Virus* - BoHV-2) e do Herpesvírus Suíno tipo 1 (*Suid*
10 *Herpes Virus* – SuHV-1) (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Logo após a infecção das
11 células epiteliais, o vírus passa a um estágio de intensa replicação, ou ciclo lítico,
12 estabelecido nas próprias células do local de entrada do vírus (PIDONE; GALOSI;
13 ETCHEVERRIGARAY, 1999). Etapas seguintes podem diferir de acordo com o
14 hospedeiro e o vírus, mas ao menos três rotas de propagação são mencionadas:
15 restrita as áreas locais, viremia sistêmica e disseminação neuronal, como no caso
16 dos alfa herpesvírus. Nesta última, durante a replicação no sítio de infecção, os
17 virions podem entrar nos axônios de células nervosas locais e, através do transporte
18 intra-axonal, chegar ao corpo dos neurônios dos gânglios regionais, onde poderão
19 estabelecer latência (ENGELS; ACKERMANN, 1996; RISSI et al., 2007).

20 Infecções latentes causadas por Herpesvírus constituem umas das
21 estratégias virais para a sua sobrevivência na natureza (ENGELS; ACKERMANN,
22 1996). Durante os longos períodos de latência em diferentes tipos de células –
23 neurais (SPILKI et al., 2002; JONES, 2003; VOGEL et al., 2003; PEREZ et al.,
24 2002), epiteliais (STEWART et al., 1998; FLANO et al., 2000), dendríticas (FLANO et
25 al., 2000), macrófagos (WECK et al., 1999; FLANO et al., 2000), esplenócitos
26 (FLANO et al., 2002), linfócitos (SUNIL-CHANDRA; EFSTATHIOU; NASH, 1992;
27 FLANO et al., 2000; 2002) – o DNA viral é mantido na forma extracromossomal,
28 associado a histonas celulares, permanecendo no núcleo celular (JONES, 2003). A
29 expressão gênica do vírus diminui drasticamente, contrastando com os 70-80 genes
30 virais expressos durante a infecção lítica. Os genes que continuam sendo expressos
31 são denominados genes “relacionados à latência” (LR) e seus transcritos acumulam-
32 se no núcleo das células infectadas (ENGELS; ACKERMANN, 1996; SCHWYZER;
33 ACKERMANN; 1996; PIDONE; GALOSI; ETCHEVERRIGARAY, 1999). Desta forma,

os vírus latentes representam um reservatório de longo prazo e animais aparentemente saudáveis, submetidos a situações de estresse (parto, transporte, tratamento com corticóides e infecções secundárias) são capazes de excretar e transmitir o vírus a hospedeiros saudáveis (ENGELS; ACKERMANN, 1996; PIDONE; GALOSI; ETCHEVERRIGARAY, 1999; VOGEL et al., 2003).

A capacidade de causar latência em células neurais é comum a todos alfa herpesvírus, como os Herpesvírus Bovinos Tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), o que caracteriza o neurotropismo destes (PEREZ et al., 2002; THIRY, J. et al., 2006). No entanto, em bovinos, apenas o BoHV-5 é caracterizado pela neurovirulência, pois pode replicar-se ativamente nas células neurais e disseminar-se através das células do sistema nervoso central (SNC) do hospedeiro, causando lesões nos tecidos nervosos e originando surtos fatais de meningoencefalite bovina (CLAUS; ALFIERI; ALFIERI, 2002; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003; PEDRAZA; ALESSI, 2004).

1.2 Herpesvírus Bovino Tipo 5

Descrito pela primeira vez em 1962 na Austrália (FRENCH, 1962a), o BoHV-5 foi previamente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1 – BoHV1.3, vírus pertencente à subfamília Alphaherpesvirinae, gênero *Varicellovirus* (FRENCH, 1962a; 1962b). Tal classificação se deu pelas características morfológicas semelhantes, além da impossibilidade de diferenciação pelo CPE e pelas reações cruzadas observadas entre as variantes BoHV1.1 (Rinotraqueíte) e BoHV1.2 (Vulvovaginite/Balanopostite) com o agente da neuropatia. No entanto, através de comparações subsequentes de mapas de restrição do DNA viral (ENGELS et al., 1986; WHETSTONE; SEAL; MILLER, 1993), reatividade com anticorpos monoclonais (MAbs) e testes de neutralização cruzada (METZLER; SCHUDEL; ENGELS, 1986; COLLINS et al., 1993; ABDELMAGID et al., 1995; ROEHE et al., 1997; SOUZA et al., 2002) foi possível distinguir os dois vírus quanto ao genoma e propriedades antigênicas. Em 1992, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus propôs a classificação do BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992) e, em

2003, Delhon et al. elucidaram o genoma completo deste vírus, demonstrando a existência de 85% de identidade com o BoHV-1.

O genoma do BoHV-5 possui 138.390 pares de base (pb), 2.518 a mais que o genoma do BoHV-1. Os pareamentos G-C constituem 75% do genoma, o qual é dividido em duas seqüências únicas: uma longa (U_L) com 104.054 bp e uma curta (U_S) com 9.548 bp flanqueadas por seqüências repetidas internas e terminais (MEYER; BARE; THIRY, 1999; DELHON et al., 2003). O genoma contém 72 genes, dos quais 68 estão presentes em únicas cópias e aqueles relacionados com a latência do vírus encontram-se na U_L e as proteínas do BoHV-5 apresentam, em torno de 82% de identidade com as proteínas do BoHV-1 (DELHON et al., 2003).

Surtos de meningoencefalite fatal causados pelo BoHV-5 ocorrem geralmente de forma esporádica e chegam a apresentar morbidade de até 30% e letalidade de 70-100% (VALERA et al., 2000; RIET-CORREA et al., 2006). Bovinos jovens, de 6-7 meses até 3 anos de idade, são os hospedeiros preferenciais do vírus (RIET-CORREA et al., 2006). Animais criados em regime extensivo são os principais acometidos pela doença, pouco observada em propriedades que utilizam o regime de confinamento na criação de animais (SALVADOR et al., 1998; ELIAS; SCHILD; RIET-CORREA, 2004). Os sinais clínicos observados em animais que desenvolveram a doença são depressão (isolamento do rebanho), corrimento nasal e ocular, que pode tornar-se mucoso ou mucopurulento com a evolução da doença, desidratação, emagrecimento, febre, ranger de dentes, tremores musculares, torção, cegueira, incoordenação, pressão da cabeça contra objetos, nistagmo, disfagia, opistótono e convulsões, além de movimentos de pedalagem observados em animais que sofrem quedas (MEYER et al., 2001; CLAUS et al., 2002; COLODEL et al., 2002; RIET-CORRÊA et al., 2006; RISSI et al., 2007).

Infecções primárias pelo BoHV-5 ocorrem principalmente através das mucosas oculares e nasais, onde o vírus irá replicar-se por mais de 15 dias e ocasionar doença respiratória leve à moderada, além de eliminar ativamente partículas virais através do muco secretado (MEYER et al., 2001; DIEL et al., 2005). Neste estágio, os animais poderão recuperar-se da infecção, desenvolver uma infecção assintomática ou evoluir para doença neurológica fatal. A disseminação do vírus para os tecidos cerebrais ocorre pela invasão e replicação do vírus nas fibras

nervosas cujas terminações distribuem-se na mucosa nasal e projetam-se para o bulbo olfatório, caracterizando a via olfatória como principal rota de acesso ao SNC, tanto em bovinos quanto em modelos animais infectados experimentalmente (CHOWDHURY et al., 2000; VOGEL et al., 2003; PEDRAZA; ALESSI, 2004; DIEL et al., 2005).

Outra rota de disseminação do vírus, a trigeminal, parece ter grande importância no estabelecimento da infecção latente, mas não no estabelecimento da doença durante a infecção primária aguda (DIEL et al., 2005). Fibras nervosas com terminações nos ramos maxilares e oftálmicos são as principais vias de acesso aos gânglios trigêmeo (TG) e, segundo estudo realizado em coelhos e bovinos, a possível explicação para a participação desta rota na infecção latente é que a carga viral que atinge o gânglio não é suficiente para causar doença, mas sim para o estabelecimento de latência, sendo a rota de maior importância durante a reativação viral (VOGEL et al., 2003; DIEL et al., 2005).

O complexo mecanismo pelo qual o BoHV-5 penetra as células permissivas é o mesmo descrito para outros alfa herpesvírus (para revisão WILD, 1998). As glicoproteínas do envelope viral desempenham importantes funções nas interações com as células, bem como na penetração destas (BABIUK; van DRUNEN-LITTEL-van den HURK; TIKOO, 1996). Etapas que constituem a entrada do vírus na célula podem ser resumidas em ligação, fusão e penetração, sendo que a ligação inicial do vírus aos receptores de superfície celular é realizada pelas glicoproteínas C (gC) e B (gB) (LIANG et al., 1991; LI et al., 1995; WILD et al., 1998). No entanto, a ligação primária com a gC não é essencial para a infecção e replicação viral *in vitro*, conforme demonstrado através da utilização de mutantes BoHV-1 gC negativos (gC⁻) (ROIZMAN; SEARS, 1987; KAASHOEK et al. 1998; WINKELMANN et al., 2007).

Fusões entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula ocorrem somente após a ligação da gD com um dos seus receptores celulares. A união da gD ao receptor proporciona uma possível alteração conformacional da glicoproteína permitindo que o heterodímero gH/gL, juntamente com a gB, inicie o processo de fusão. Ações coordenadas dessas quatro glicoproteínas são importantes tanto na infecção primária quanto na disseminação pelo SNC, que ocorre através da formação de pontes extracelulares (LIANG et al., 1991; BABIUK; van DRUNEN-

1 LITTEL- van DEN HURK; TIKOO, 1996; WILD et al., 1998; DASIKA;
2 LETCHWORTH, 1999; 2000; PIDONE; GALOSI; ETCHEVERRIGARAY, 1999;
3 GERAGHTY; JOGGER; SPEAR, 2000; CSELLNER et al., 2000). Com a fusão das
4 membranas, o capsídeo viral e as proteínas do tegumento chegam ao citoplasma
5 celular e por movimentos originados nos microtúbulos, são direcionados ao núcleo,
6 onde o DNA é liberado (GRANZOW et al., 2001).

7 Bovinos possuem receptores celulares no SNC tanto para as glicoproteínas
8 do BoHV-1 quanto para o BoHV-5, porém, apesar de ambos estabelecerem latência
9 no gânglio trigêmeo, apenas o BoHV-5 possui a capacidade de causar a doença
10 neurológica pela invasão e replicação em outras regiões cerebrais (PIDONE;
11 GALOSI; ETCHEVERRIGARAY, 1999; VOGEL et al., 2003). Com a reativação do
12 ciclo lítico, o vírus retorna aos sítios de infecção primária sendo novamente
13 eliminado, podendo ou não haver recorrência da doença (VOGEL et al., 2003).

14 A distribuição geográfica do BoHV-5 é imprecisa devido tanto à classificação
15 inadequada quanto à limitação dos testes sorológicos padrões em discriminar
16 anticorpos contra BoHV-5 ou BoHV-1 (VOGEL et al., 2002). Entretanto, surtos
17 esporádicos de meningoencefalite bovina foram descritos na Europa, América do
18 Norte e América do Sul (BARENFUS et al., 1963; BARTHA et al., 1969; GOUGH;
19 JAMES, 1975). No Brasil, surtos foram descritos nos estados do Rio Grande do Sul
20 (WEIBLEN et al., 1989; ROEHE et al., 1998; SANCHES et al., 2000), Mato Grosso
21 do Sul, São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002),
22 Rio de Janeiro, Minas Gerais (GOMES et al., 2002), Goiás (DE PAULA et al., 2005)
23 e Pará (RIET-CORRÊA et al., 2006), demonstrando a ampla distribuição do vírus no
24 país. Na Argentina também foram descritos surtos esporádicos da doença
25 (CARRILLO et al., 1983; VALERA et al., 2000).

26 O sistema de criação de bovinos estabelecido no Brasil, de modo geral,
27 obedece ao regime extensivo e as pastagens são compartilhadas com outros
28 ruminantes, como ovelhas e cabras. No entanto, estudos demonstraram que estes
29 animais podem ser infectados naturalmente e atuar como reservatórios ocasionais
30 para o BoHV-5, eliminando altas quantidades de partículas virais durante a infecção
31 aguda, porém mantendo-se assintomáticos e estabelecendo a infecção latente.

1 Desta forma, a propagação da doença no país pode ser agravada (SILVA et al.,
2 1999; THIRY, J. et al., 2006; DIEL et al., 2007).

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

11 Apesar de numerosas vacinas vivas e inativadas terem sido desenvolvidas
12 contra o BoHV-1 (BABIUK; van DRUNEN LITTEL - van DEN HURK; TIKOO, 1996.
13 JONES; CHOWDHURY, 2008), estas não impedem a formação de latência pelo
14 BoHV-5 ou a transmissão viral (CASCIO et al., 1999). Vacinas vivas atenuadas
15 podem também causar abortos em vacas imunizadas ou vacas que são vacinadas
16 durante a gestação (JONES; CHOWDHURY; 2008) e aquelas que utilizam a deleção
17 gênica podem sofrer recombinações permitindo a reversão da virulência (SCHYNTS
18 et al., 2003; MEURENS, et al., 2004; THIRY, E. et al., 2006). Em animais jovens,
19 essas vacinas também podem ser patogênicas, pois o sistema imunológico destes
20 animais ainda não está completamente desenvolvido, além de causar
21 imunossupressão e permitir infecções secundárias (JONES; CHOWDHURY; 2008).
22 As vacinas inativadas, no entanto, devido ao processo de inativação podem perder
23 epítomos importantes resultando na geração de uma fraca imunidade protetora, e,
24 portanto, necessitam de imunizações repetidas (COX; ZAMB; BABIUK, 1993;
25 JONES; CHOWDHURY; 2008).

26 Novas estratégias vacinais, portanto, devem não apenas focar na proteção
27 contra a infecção, mas também na redução da disseminação do vírus pela
28 reativação das infecções latentes (BABIUK; van DRUNEN LITTEL - van DEN HURK;
29 TIKOO, 1996). Devem considerar tanto a indução de imunidade humoral, a qual
30 pode prevenir o estabelecimento da infecção, como a indução de respostas imunes
31 celulares, importantes na recuperação de infecções pelos Herpesvírus e na redução
32 da frequência e severidade das recrudescências (BABIUK; ROUSE, 1996).

O diagnóstico diferencial também deve ser um atributo, podendo ser obtido com “marcas” que facilitem a detecção de anticorpos contra proteínas virais não incluídas na vacina. Assim, animais assintomáticos, com infecção latente, poderão ser detectados (BABIUK; van DRUNEN LITTEL - van DEN HURK; TIKOO, 1996).

As vacinas de subunidade baseadas em tecnologias recombinantes e clonagens permitem a expressão de genes que codificam antígenos protetores em organismos preferencialmente não patogênicos, capazes de expressar o imunógeno na forma nativa ou com alterações que não afetem epítomos antigênicos (BABIUK; van DRUNEN LITTEL - van DEN HURK; TIKOO, 1996; SCHATZMAYR, 2003; ROGAN; BABIUK, 2005).

1.3 Imunologia do Herpesvírus Bovino Tipo 5

Ao longo da evolução, o sistema imunológico tem desenvolvido numerosas armas para controlar inúmeros agentes infecciosos, incluindo os vírus (AMBAGALA; SOLHEIM; SRIKUMARAN, 2005). Estes mecanismos de defesa fazem parte tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. No entanto, qualquer mecanismo de defesa, para ser efetivo nas infecções por Herpesvírus, deve ser capaz de destruir o vírus e/ou as células infectadas antes que ocorra a disseminação para células não infectadas (ROUSE; WARDLEY; BABIUK, 1976).

Nas respostas imunológicas contra os Herpesvírus, deve-se, prioritariamente, interferir na ligação ou na sua entrada nas células permissivas, amenizando a patologia causada pelo vírus (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996). Conforme abordado anteriormente, as interações iniciais dos Alphaherpesvírus com as células ocorrem através das glicoproteínas do envelope viral, principalmente gC, gB e gD, o que torna estas proteínas os alvos majoritários das respostas contra estes vírus.

Ao ser estabelecida a infecção primária em um hospedeiro, a primeira resposta deste contra o agente viral será o estímulo de resposta inflamatória e de reações não específicas. Citocinas, como Interferon- α e β (IFN- α e IFN- β) são as primeiras a surgir logo após a infecção, sendo expressos tanto pelas células

1 infectadas (através da replicação viral) quanto pelas células efectoras a serem
2 recrutadas para o sítio de infecção (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN
3 HURK; TIKOO, 1996). Esta família de citocinas promove a migração de leucócitos,
4 como macrófagos e células *Natural Killers* (NK), bem como a ativação destas
5 (JONES; CHOWDHURY, 2008). Macrófagos e células NK, uma vez ativadas, terão
6 suas atividades citolíticas aumentadas e poderão atuar contra células infectadas
7 (JONES; CHOWDHURY, 2008). Análises de alvos potenciais para as células NK
8 demonstraram que gD e gB podem atuar como alvos primários destas células,
9 enquanto a gC seria a glicoproteína de menor importância para a ativação destas
10 células (PALMER et al., 1990). As células NK irão também liberar outras citocinas
11 que atuarão, em cascata, no recrutamento de outras células efectoras que participam
12 do processo inflamatório e que permitem a formação das respostas específicas
13 (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996).

14 Os alfa herpesvírus utilizam alguns mecanismos para evadir o sistema
15 imunológico do hospedeiro como o silenciamento da expressão de mRNA da células
16 infectadas e o mecanismo de transporte de peptídeos antigênicos, conhecido como
17 TAP. Dentre as várias proteínas do tegumento, a *viral host shut-off* (vhs) é capaz de
18 degradar seletivamente os mRNAs produzidos pela célula do hospedeiro
19 (MUYLKENS et al., 2007), e assim, realizar a atenuação da expressão de moléculas
20 do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I (MHC classe I), permitindo
21 que estas células escapem da ação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL)
22 (AMBAGALA; SOLHEIM; SRIKUMARAN, 2005). O transporte de peptídeos pelo
23 complexo TAP também é prejudicado, pois os dois mecanismos que envolvem este
24 transporte (ligação do peptídeo e transporte ao Retículo Endoplasmático) são
25 impedidos pelos Herpesvírus. Assim, moléculas de MHC classe I que conseguem
26 ser expressas serão defeituosas devido à ausência de peptídeo (AMBAGALA;
27 SOLHEIM; SRIKUMARAN, 2005; JONES; CHOWDHURY, 2008). Portanto, o
28 reconhecimento de células infectadas pelas CTL é prejudicado.

29 No entanto, além das glicoproteínas expressas na superfície das células
30 infectadas, as células NK também são capazes de reconhecer moléculas
31 defeituosas do MHC classe I ou a ausência destas moléculas na superfície celular,
32 compensando a dificuldade encontrada pelas CTL (COOK; SPLITTER, 1989;
33 JONES; CHOWDHURY, 2008).

Aproximadamente uma semana após a infecção pelos alfa herpesvírus ocorre o pico das respostas celulares seguido pelo aparecimento de anticorpos específicos originados pela resposta humoral (MUYLKENS et al., 2007). Os CTL irão auxiliar na recuperação da infecção, durante a latência e nas suas reativações, quando a disseminação viral ocorre de célula a célula. Os principais alvos reconhecidos por estas células, em bovinos, são a gC e gD, enquanto em roedores, são a gB e gD (DENIS et al., 1993; BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996; JONES; CHOWDHURY, 2008). Os linfócitos T *helper* CD4⁺ irão mediar a lise das células infectadas através da ativação de macrófagos e células NK pela produção de IFN- γ e Interleucina-2 (IL-2) e também auxiliar o recrutamento e a proliferação de CTL específicos (MUYLKENS et al., 2007).

A resposta humoral, durante a infecção primária, irá aparecer tardiamente. Portanto, esse tipo de resposta tem um papel fundamental durante a reativação da latência, quando os virions retornam a mucosa evitando novas infecções (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996; MUYLKENS et al., 2007). Os anticorpos produzidos durante a resposta humoral poderão neutralizar os vírus extracelulares, através da sua ligação com as glicoproteínas do envelope viral, impedindo a interação destas com os receptores de células permissivas. Dentre as principais glicoproteínas capazes de formar anticorpos neutralizantes estão a gC, gB, gD e gH (van DRUNEN LITTEL-van den HURK; BABIUK, 1986; MARSHALL; ISRAEL; LETCHWORTH, 1988; JONES; CHOWDHURY, 2008).

Além dos anticorpos neutralizantes, os anticorpos não-neutralizantes, no entanto, também podem atuar na defesa específica contra os herpesvírus, pois podem reconhecer glicoproteínas expressas na superfície celular estimulando a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (MUYLKENS et al., 2007; JONES; CHOWDHURY, 2008). Em bovinos, as células polimorfonucleares (PMN) são as principais envolvidas neste tipo de resposta, seguidas pela ação de macrófagos (ROUSE; WARDLEY; BABIUK, 1976; GREWAL; ROUSE; BABIUK, 1977; THORNE et al., 1984).

O sistema complemento também atuará na ADCC, aumentando a efetividade da resposta. Neste caso, IgM, capaz de reconhecer as glicoproteínas expostas nas células infectadas, liga com a molécula do complexo C1 da via de ativação clássica

do complemento. Esta molécula desencadeia a sucessiva cascata de clivagens até a ligação da molécula C3b na superfície da célula infectada e o reconhecimento desta molécula por receptores presentes nas PMN (ROUSE et al., 1977 5; JANEWAY, et al; 2007).

Para o desenvolvimento de vacinas contra os alfa herpesvírus, portanto, deve-se focar o desenvolvimento de imunidade contra as glicoproteínas do envelope viral (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996). Conforme visto, estas atuam não apenas na indução de anticorpos neutralizantes, capazes de prevenir a infecção, mas também, quando há infecção estabelecida, estimulam a imunidade mediada por células, sendo os principais alvos das CTL e auxiliam as respostas inatas, estimulando células NK e a ADCC. Estas vacinas devem também permitir que anticorpos neutralizantes sejam produzidos nas mucosas, protegendo o hospedeiro no sítio preferencial de infecção destes vírus (BABIUK; van DRUNEN LITTEL – van DEN HURK; TIKOO, 1996; ZHU; LETCHWORTH, 1996; SCHATZMAYR, 2003).

1.4 Importância da gD na imunologia do Herpesvírus Bovino Tipo 5

Dentre as principais glicoproteínas do envelope, a gD é o principal antígeno candidato à produção de vacinas de subunidades. Presente apenas nos alfa herpesvírus, com exceção do Varicella-Zoster, esta glicoproteína é essencial para a penetração do virion na célula. Estudos realizados com anticorpos anti-gD mostram que partículas virais com o sítio de ligação ao receptor da gD bloqueado são incapazes de realizar a fusão do envelope com a membrana, impedindo a infecção (ABDELMAGID et al., 1995; ZHU; LETCHWORTH, 1996; ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997; GERAGHTY; JOGGER; SPEAR, 2000; CSELLNER et al., 2000; GERAGHTY et al., 2001).

A gD também constitui um importante mecanismo de defesa do BoHV-1, uma vez que pode ligar-se a receptores celulares da família dos Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR), semelhantes aos receptores conhecidos como *Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM ou HveA), os quais permitem a ligação da gD

dos Herpes Simplex Vírus (HSV) (WHITBECK et al., 1997; HANON, et al., 1999; JONES; CHOWDHURY, 2008). A ligação a estes receptores induz a produção de sinais celulares capazes de iniciar a apoptose em certos tipos celulares, como as células mononucleares do sangue e linfócitos, contribuindo com a imunossupressão de animais infectados (BAKER; REDDY, 1998; HANON et al., 1998; HANON, et al., 1999; JONES; CHOWDHURY, 2008). Além dos receptores da família dos TNFR, moléculas conhecidas como Nectina-1 (HveC) também atuam como receptores para a gD do HSV e do BoHV-1 (CONNOLLY et al., 2001; JONES; CHOWDHURY, 2008). Estas moléculas pertencem à superfamília das imunoglobulinas e estão envolvidas nas interações de adesão célula a célula, sendo expressas principalmente em células epiteliais e neurônios (GERAGHTY et al., 2001; SPEAR; LONGNECKER, 2003).

Comparações estruturais realizadas com gD dos HSV-1 e 2, BoHV-1 e SuHV-1 demonstram a conservação de 6 cisteínas na cadeia, sugerindo a formação de pontes dissulfídicas, mantidas também na cadeia da gD do BoHV-5 (TIKOO et al., 1990; ABDELMAGID et al., 1995; DASIKA; LETCHWORTH, 1999). Além disso, esta glicoproteína apresenta sítios para a adição covalente de carboidratos aos resíduos de asparagina (Asn-X-Ser/Thr) constituindo a N-glicosilação. A gD do BoHV-1 e do HSV possui na sua seqüência de aminoácidos três sítios de N-glicosilação enquanto a do BoHV-5 apenas dois, um localizado no domínio extracelular e outro no domínio citoplasmático (TIKOO et al., 1993; WHITBECK et al., 1997). Importante para a manutenção das funções biológicas e imunológicas das glicoproteínas, esse padrão de glicosilação irá determinar a conformação tridimensional (3D) da proteína (TIKOO et al., 1993). No entanto, nem todos os prováveis sítios recebem a adição de carboidratos e a gD do BoHV-1 apresenta a N-glicosilação em apenas um sítio (Asn102), localizado no domínio extracelular. A localização dos dois sítios da gD do BoHV-5 sugere, desta forma, que apenas o sítio do domínio extracelular desta glicoproteína é glicosilado (TIKOO et al., 1993; KUKURUZINSKA; LENNON, 1998).

Além dos sítios de N-glicosilação, a gD dos alfa herpesvírus apresenta sítios de O-glicosilação (GalNAc α 1-O-Ser/Thr), importantes também na manutenção da conformação 3D da molécula (TIKOO et al., 1993; HOUNSELL; DAVIES; RENOUF, 1996). Estas modificações pós-traducionais, juntamente com a adição de ácido

1 siálico, contribui no processamento do precursor da gD até a formação de um
2 oligossacarídeo complexo e heterogêneo (WENSKE; BRATTON; COURTNEY,
3 1982). A adição de resíduos de ácido siálico em células de mamíferos ocorre nos
4 carboidratos terminais $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$, ocorrendo nas etapas finais da rota de
5 glicosilação e estabilizando glicoproteínas como a gD, contribuindo, portanto, na sua
6 infectividade (TEUTON; BRANDT, 2007).

7 Vacinas experimentais desenvolvidas com gD do BoHV-1 têm demonstrado
8 que, de fato, esta glicoproteína pode ser utilizada para proteger os hospedeiros
9 contra infecções primárias, infecções latentes e até mesmo evitar a disseminação de
10 altas quantidades de partículas virais (NESBURN; GHIASI; WECHSLER, 1990;
11 OIRSCHOT; KAASHOEK; RIJSEWIJK, 1996). Vacinas de subunidade utilizando
12 esta glicoproteína demonstram eficácia não apenas na prevenção de sinais clínicos,
13 mas na prevenção da replicação e excreção do vírus (OIRSCHOT et al., 1996).

14 Os anticorpos produzidos contra a gD demonstraram ser capazes de
15 neutralizar a entrada do vírus nas células permissivas dos hospedeiros (OLIVEIRA
16 et al., 2000). A gD, nativa ou recombinante, foi capaz de induzir anticorpos
17 neutralizantes após a administração por via intranasal, estimulando a produção dos
18 isotipos IgA e IgG1, os principais anticorpos de mucosa em bovinos (ZHU;
19 LETCHWORTH, 1996; ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997). A administração do gene
20 inteiro da gD através de *gene-gun* também induziu a produção de anticorpos
21 neutralizantes, além de estimular a expressão de IFN γ (OLIVEIRA et al., 2000).
22 Quimeras formadas com a gD e adjuvantes como Interleucina-6 (ZHU; WU;
23 LETCHWORTH, 1999), oligodeoxinucleotídeos com motivos CpG não metilados
24 (CpG ODN) também estimularam respostas humorais capazes de neutralizar o vírus
25 bem como respostas celulares (RANKIN et al., 2002). Além disso, imunização com
26 plasmídios contendo o gene da gD demonstraram ser capazes de induzir respostas
27 celulares específicas contra o BoHV-1 (DESHPANDE et al., 2002)

28 A expressão da gD de BoHV-1 já foi descrita em *Escherichia coli*, leveduras,
29 células de mamíferos e plantas (TIKOO et al., 1990; van DRUNEN LITTEL – van den
30 HURK et al., 1993; ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997; 1999; FILGUEIRA et al. 2003).
31 No entanto, a ausência de modificações pós-traducionais em *E. coli* demonstrou a
32 importância da glicosilação, que apesar de não participar de epitopos antigênicos,

1 sua ausência induz a perda da maioria dos epítomos conformacionais da proteína,
2 induzindo títulos de anticorpos neutralizantes até 100x menores que aqueles obtidos
3 com a gD expressa em organismos eucariotos (van DRUNEN LITTEL – van den
4 HURK et al., 1993).

5 Em cultivos com células de bovinos, a expressão da gD de forma constitutiva
6 mostrou-se tóxica para as células (CHASE et al., 1990; TIKOO et al., 1990),
7 provavelmente pela capacidade desta molécula em induzir apoptose (HANON et al.,
8 1999). Células bovinas expressando gD de BoHV-1 também demonstraram ser
9 susceptíveis a infecções por BoHV-5, possivelmente existência de mecanismos
10 distintos entre estes de evitar a neutralização ou pelo reconhecimento de diferentes
11 regiões das proteínas pelos receptores (DASIKA; LETCHWORTH, 1999). Anticorpos
12 monoclonais desenvolvidos contra gD de BoHV-1 demonstram que alguns epítomos
13 desta glicoproteína não estão presentes na gD do BoHV-5 (ABDELMAGID et al.,
14 1995; DASIKA; LETCHWORTH, 1999) e podem corresponder a alterações nas
15 seqüências de aminoácidos das duas (ABDELMAGID et al., 1995).

16 Vacinas de subunidade capazes de neutralizar o BoHV-1, mantendo
17 epítomos antigênicos, foram obtidas pela expressão da gD truncada na região
18 carboxi-terminal em plantas, utilizando *Nicotiana benthamiana* e em leveduras como a
19 *Pichia pastoris* (ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997; 1999; FILGUEIRA et al. 2003).

21 **1.5 *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas**

23 A levedura haplóide e metilotrófica *Pichia pastoris*, utilizada como sistema de
24 expressão de proteínas heterólogas, têm recebido destaque nas últimas duas
25 décadas (TORRES; MORAES, 2000). A utilização desta levedura proporciona
26 vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, mantendo a fácil
27 manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo
28 relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em
29 escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol
30 (CEREGHINO; CREGG, 1999; CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000;
31 TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002). *P. pastoris* também é

considerada uma levedura com capacidade fermentativa pobre, tendo preferência por crescimento respiratório (CEREGHINO et al., 2002). A vantagem desta característica sobre as leveduras fermentativas é a possibilidade de obter cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos de fermentação causem danos de toxicidade para as células (TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Por ser um organismo eucarioto simples, a *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação e adição de pontes dissulfídicas, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação. (CEREGHINO; CREGG, 1999).

P. pastoris é capaz de crescer através da utilização de metanol como fonte única de carbono, sendo que esta rota metabólica é totalmente reprimida na presença de outra fonte, como glicerol. Enzimas que participam desta rota estão presentes em altos níveis na célula, como a Álcool Oxidase (AOX) que pode chegar a níveis acima de 30% do total de proteínas celulares, no entanto, estas mesmas enzimas não são detectáveis quando outras fontes de carbono estão disponíveis. (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000). A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua oxidação pela AOX, resultando na formação de formaldeído e peróxido de hidrogênio, o qual é enviado para os peroxissomos para evitar a toxicidade. Por ter pouca afinidade com O₂, a AOX é gerada em grandes quantidades pela célula, como forma de compensação (COUDERC; BARATTI, 1980; CREGG et al., 1985).

Dois genes codificam para a enzima AOX: AOX1 e AOX2, sendo o primeiro responsável por grande parte da presença de AOX ativa nas células. A regulação dos genes envolve dois mecanismos: inibição/desinibição mais um mecanismo de indução (CEREGHINO; CREGG, 2000). Os vetores utilizados para a transformação da *P. pastoris* beneficiam-se da forte repressão exercida sobre os genes AOX e na facilidade de induzí-los, permitindo que altas densidades celulares sejam obtidas sem que a proteína heteróloga, a qual pode ser tóxica, seja expressa (GELLISSEN, 2000)

Vetores utilizados para a geração de recombinantes são integrados no genoma de forma randômica ou por recombinação homóloga, garantindo maior

estabilidade do inserto (CEREGHINO; CREGG, 2000). O direcionamento do DNA exógeno é feito normalmente aos genes *AOX1* e/ou *HIS4* - Histidinol Dehidrogenase, que participa da biossíntese de histidina (CREGG et al., 1985). A presença, no vetor, de uma seqüência compartilhada com o genoma estimula os eventos de recombinação homóloga. Para tal, alguns vetores obtidos comercialmente, como o pPICZ α B comercializado pela Invitrogen (INVITROGEN, 2005), possuem a seqüência 5' do promotor *AOX1* e na 3', uma seqüência necessária para conduzir o término da transcrição. Entre as seqüências promotoras e terminadoras, há um sítio de múltipla clonagem para a inserção do gene heterólogo. O vetor pPICZ α B permite que as proteínas sejam secretadas no meio, e para tal possui a seqüência sinal do α -Mating Factor (α -MF) de *Saccharomyces cerevisiae* fusionada. Para a manutenção e replicação do plasmídio em *E. coli*, há uma origem de replicação de procariotos, sendo que a seleção, tanto em procariotos como em leveduras, é realizada através do gene de resistência ao antibiótico Zeocina. A detecção da proteína recombinante bem como a purificação mediante cromatografia de afinidade pode ser realizada pela adição de uma cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (CEREGHINO; CREGG, 2000; DALY; HEARN, 2005).

Procedimentos de transformação em sistemas metilotróficos empregam métodos similares descritos para outras leveduras, sendo que a eletroporação pode ser utilizada (CEREGHINO; CREGG, 2000). Células de *P. pastoris* recombinantes devem ainda ser selecionadas quanto ao fenótipo de utilização de metanol. Algumas cepas, como a KM71H possuem uma deleção no gene *AOX1*, o qual é parcialmente substituído pelo *ARG4* de *S. cerevisiae*. Por possuir apenas o *AOX2*, o qual permite um crescimento lento em metanol, o fenótipo destas cepas sempre será Mut^s (Methanol Utilization Slow). No entanto, a maioria das cepas possui fenótipo selvagem e crescem rapidamente em metanol, pois possuem o gene *AOX1*, sendo consideradas Mut⁺ (Methanol Utilization Plus). Cepas como a KM71H, devido à utilização lenta de metanol, são melhores produtoras de algumas proteínas recombinantes que aquelas com fenótipo selvagem, além de não necessitarem de grandes quantidades de metanol em produções de larga escala (CREGG et al., 1985; CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000,).

Modificações pós-traducionais de proteínas realizadas na *P. pastoris* representam a grande vantagem deste sistema de expressão. Além do processamento do peptídeo sinal, a formação de pontes dissulfídicas e a adição de certos lipídios, realizam tanto a N- quanto a O- glicosilação de proteínas (DALY; HEARN, 2005). No entanto, esta capacidade é limitada, sendo que apenas resíduos de manose são adicionados na O- glicosilação e no núcleo da N-glicosilação. Tal padrão difere do observado na glicosilação de proteínas humanas, por exemplo, onde uma variedade de açúcares, incluindo galactose, n-acetilgalactosamina e ácido siálico, é adicionada. No entanto, em relação a *S. cerevisiae*, *P. pastoris* não possui tendência de hiper-glicosilação e realiza a adição de manoses terminais por ligações $\alpha 1,2$ e não $\alpha 1,3$, como a *S. cerevisiae*, a qual é considerada alergênica (CEREGRINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

Diversas proteínas virais de interesse médico ou veterinário já foram eficientemente expressas em *P. pastoris*, como a gD de BoHV-1 (ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997, 1999), do HSV 1 e 2 (KOOIJ et al., 2002), Herpesvírus Equino tipo 1 (EHV-1) (RUITENBERG et al., 2001), proteínas dos vírus da Hepatite B e C (HARDY et al., 2000; WATELET et al., 2002; HAN et al., 2006; LEE et al., 2006; MARTINEZ-DONATO et al., 2006; LI et al., 2007), nucleoproteína do Coronavírus responsável pela *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS – SCoV) (HAN et al., 2004; LIU et al., 2004), proteínas estruturais do vírus da Dengue (SUGRUE et al., 1997; BISHT et al., 2001; WEI et al., 2003; VALDÉS et al., 2007), glicoproteínas do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (JIANG et al., 2005; ZHAO et al., 2007), dentre outras (FARNÓS et al., 2005, 2006; ATHMARAM et al., 2007; LIU et al., 2007; WANG et al., 2007), mostrando que esta levedura pode ser um recurso para a expressão de proteínas de forma segura, em larga escala e com estruturas 3D semelhantes às proteínas nativas, possibilitando o uso destas tanto em vacinas como em exames de diagnóstico.

A ausência de vacinas específicas para o BoHV-5 (RISSI et al., 2007) e os problemas apresentados anteriormente com a utilização de vacinas contra BoHV-1 no intuito de proteger contra o agente da meningoencefalite – como o estabelecimento de infecções latentes pelo BoHV-5 e a disseminação do vírus para animais não imunizados, faz com que seja viável a avaliação da gD do BoHV-5 como uma vacina de subunidade. A escolha da *P. pastoris* como sistema de

expressão para a gD de BoHV-5 baseia-se nas premissas apresentadas anteriormente.

Até o presente não existem estudos realizados com a gD do BoHV-5 visando à utilização desta em vacinas. Todas as análises realizadas com esta glicoproteína foram comparativas com a glicoproteína homóloga do BoHV-1, no entanto, as duas apresentam diferenças antigênicas, como demonstrado por ABDELMAGID et al, em 1995. Portanto, é necessário averiguar se a forma truncada da gD (tgD) expressa em levedura possuirá epítomos antigênicos reconhecidos pelos soros de animais vacinados, visando à utilização desta como uma futura vacina de subunidade experimental.

Assim, a hipótese apresentada neste trabalho é de que a forma truncada da gD do BoHV-5 expressa em *P. pastoris* é antigênica.

Desta forma, foram definidos os seguintes objetivos: 1) clonagem do gene da tgD do Herpesvírus Bovino tipo 5 em vetor de expressão em *Pichia pastoris*; 2) expressão do gene em *P. pastoris* cepa KM71H; 3) purificação da proteína obtida e 4) caracterização da proteína obtida (massa molecular aparente, presença de N-glicosilação, antigenicidade frente a soro de animais imunizados com uma vacina composta por BoHV-5 inativado).

Os resultados e discussão dos dados obtidos durante a execução do estudo, bem como a metodologia empregada, são apresentados na forma de Artigo Científico, o qual foi submetido ao periódico ***Journal of Virological Methods***.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

2 ARTIGO

Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine Herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

(Artigo científico submetido ao periódico *Journal of Virological Methods*)

**CLONING AND EXPRESSION OF A TRUNCATED FORM OF ENVELOPE
GLYCOPROTEIN D OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 IN METHYLOTROPHIC
YEAST *Pichia pastoris***

Luana Alves Dummer^a, Fabricio Rochedo Conceição^{a, d}, Leandro Quintana Nizoli^a,
Carina Martins de Moraes^a, Andréa Ramos Rocha^a, Lorena Leonardo de Souza^a,
Talita Roos^{b, c}, Telmo Vidor^{a, c}, Fábio Pereira Leivas Leite^{* a, b, c}

^a Centro de Biotecnologia, ^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto
de Biologia, ^c Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil; ^d Departamento de
Patologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS,
Brazil.

* Corresponding author: Phone: +55 53 32272770; fax: +55 53 3275-7353. E-mail
address: fabio_leite@ufpel.tche.br (F. P. L. Leite). Universidade Federal de Pelotas,
CP 354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

ABSTRACT

Meningoencephalitis caused by Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5), represents important economic losses in cattle industry. As in other Alpha herpesviruses, envelope glycoprotein IV (gD), which acts in penetration into host cells, is one of the major candidate antigen for a recombinant vaccine since it induces a stronger and persistent immune responses. Herein, the DNA coding for a truncated form of BoHV-5 gD has been cloned into the *Pichia pastoris* expression vector pPICZ α B to allow protein secretion into the medium. After induction with methanol a ~55 kDa protein was obtained. Enzymatic deglycosylation with Endo H showed a small size band in SDS-PAGE, with ~50 kDa, suggesting that tgD has N-linked oligosaccharides and that it is not hyperglycosylated. The ~55 kDa protein was recognized by several polyclonal antibodies, including polyclonal antibody Anti-tgD and polyclonal antibodies of different animal species vaccinated with BoHV-5. This is the first report of BoHV-5 gD expression in yeast and we showed that recombinant truncated form of BoHV-5 gD has antigenic and immunogenic properties similar to native BoHV-5 gD. Secreted form of expression allows simple and inexpensive purification methods that can be used in further studies to evaluate its immunogenicity in cattle.

Key Words: Bovine Herpesvirus; Glycoprotein D; Methylophilic yeast *Pichia pastoris*;

Running headline: Truncated BoHV-5 gD expressed in yeast *Pichia pastoris*

1 INTRODUCTION

2
3 Outbreaks of fatal meningoencephalitis in young cattle, a disease associated
4 with Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5), represents important economic losses in
5 South America (Claus et al. 2007). A higher incidence has been observed mainly in
6 Argentina (Carrilo et al. 1983; Valera et al. 2000) and Brazil (Colodel et al. 2002;
7 Gomes et al. 2002; Riet-Corrêa et al. 2006; Roehe et al. 1998; Salvador et al. 1998;
8 Sanches et al. 2000; Weiblen et al. 1989). First reported in Australia (French, 1962a),
9 BoHV-5 was formerly regarded as a neuropathogenic variant of Bovine Herpesvirus
10 type 1 (French, 1962a, 1962b), the etiological agent of infectious bovine
11 rhinotracheitis and vulvovaginitis /balanopostitis, due its biologic, morphologic and
12 antigenic properties (Bagust and Clarck, 1972). Subsequent molecular and
13 immunological studies, based on restriction sites mapping of viral DNA (d'Offay et al.
14 1993; Engels et al. 1986; Whetstone et al. 1993), cross-neutralization tests and
15 monoclonal antibody reactivity (Abdelmagid et al. 1995; Collins et al. 1993; Metzler et
16 al. 1986; Roehe et al. 1997) indicated that the viruses differ in antigenic properties,
17 although share 85% of DNA identity (Chowdhury et al. 2000; Delhon et al. 2003). In
18 1992, BoHV-5 was recognized as a distinct virus (Roizmann et al. 1992).

19 Both BoHV-5 and BoHV-1 infects at a mucosal surface and are neurotropic
20 viruses, establishing latency in the trigeminal ganglion (Vogel et al. 2003). However,
21 only BoHV-5 is neurovirulent and capable of replication in the central nervous
22 system, causing outbreaks with 70-100% of lethality (Ashbaugh et al. 1997; Belknap
23 et al. 1994; Riet-Corrêa et al. 2006; Valera et al. 2000; Vogel et al. 2003). Previous
24 vaccination of cattle with BoHV-1 resulted in protection against neurological disease,
25 due cross-reactivity induced by BoHV-1 neutralizing antibodies (Vogel et al. 2002;

Zajac et al. 2006), but does not prevent infection and establishment of latency by BoHV-5 (Cascio et al. 1999). Moreover, traditional serological test, such as neutralization, could not distinguish between these viruses not even between vaccinated and naturally infected animals (Babiuk et al. 1996; Souza et al. 2002).

Novel subunit vaccines strategies against herpesviruses were based on viral major envelope glycoproteins because of their location in the virion envelope and on the surface of infected cells, which make of them important targets for the host immune responses (Schwyzer and Ackermann, 1996; Rogan and Babiuk, 2005). Herpesvirus glycoproteins C (gC), gB and gD could stimulate both humoral and cellular immune responses and act as “marked” vaccines (Babiuk et al. 1996; Rogan and Babiuk, 2005; Zhu and Letchworth, 1996). These glycoproteins act in the viral entry process into permissive cells and plays important roles in pathogenicity by mediating cell-to-cell spread of virus (Csellner et al. 2000; Dasika and Letchworth, 1999; Geraghty et al. 2000; Li et al. 1995; Liang et al. 1991; Wild et al 1998). First viral attachment on cellular receptors is mediated by gC (Babiuk et al. 1996) and gB while gD acts in viral envelope and plasmatic membrane fusion, resulting in conformational changes that allows gH and gL interactions (Csellner et al. 2000; Geraghty et al. 2000; Li et al. 1995; Liang et al. 1991; Wild et al. 1998). Essential for viral penetration into host cells and virus cell-to-cell spread, gD has been the major candidate antigen for vaccines, furthermore it could stimulate neutralizing antibodies, cytotoxic T lymphocytes cells and Natural Killers cells responses (Abdelmagid et al. 1995; Dubuisson et al. 1992 Geraghty et al. 2000; Hutchings et al. 1990; Zhu and Letchworth, 1996; Zhu et al. 1997).

Present in almost all Alphaherpesviruses, bovine herpesviruses gD has about 417 aminoacids, a signal peptide and three distinct domains: an external, a

transmembrane and a cytoplasmatic; both N- and O- linked oligosaccharides and has six conserved cysteine residues, suggesting disulfide bridges (Dasika and Letchworth, 1999; Abdelmagid et al. 1995; Tikoo et al. 1990). BoHV-1 gD has been already expressed in *Escherichia coli* (van Drunen Littel-van den Hurk et al. 1993), but the absence of pos-translational modifications induced misfold of protein and lack of antigenic discontinue epitopes. In mammalian cells, constitutively expressed gD was toxic (Tikoo et al. 1990; Hanon et al. 1998; Hanon et al., 1999). However, in yeasts and plants, a truncated form of gD showed to be immunogenic (Filgueira et al. 1993; Zhu et al. 1997).

To our knowledge, immunological potential of BoHV-5 gD was never studied before. Thus, the aim of this study was to express and to purify a truncated form of gD in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* to evaluate its antigenicity and immunogenic potential.

Methylotrophic yeast *P. pastoris* represents an alternative eukaryotic expression host that offers distinct advantages over bacterial and mammalian expression systems both in terms of scale-ability and safety. Furthermore *P. pastoris* has the capacity to perform pos-translational modification like signal peptide processing, N- and O-glycosylation and disulfide bridges formation (Cereghino and Cregg, 2000; Daly and Hearn, 2005; Gellissen, 2000), modifications that seems to be important for gD antigenicity. These yeast were already used for heterologous expression of viral glycoproteins of viruses with medical and veterinary concerns, such as a truncated form of *Alphaherpesvirinae* gD, like BoHV-1 (Zhu et al. 1997, 1999), HSV-1 and 2 (Kooij et al. 2002), EHV-1 (Ruitenbergh et al. 2001); or hemagglutinin of H5N2 Avian Influenza Virus (Wang et al.2007), structural proteins of Hepatitis Virus B and C (Han et al. 2006; Hardy et al. 2000; Lee et al. 2006; Li et al.

2007; Martinez-Donato et al. 2006) and other (Jiang et al. 2005; Liu et al. 2004; Sugrue et al. 1997; Zhao et al. 2007).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following materials and reagents were obtained commercially as indicated: *Escherichia coli* strain TOP10F, *Pichia pastoris* strain KM71H, *P. pastoris* expression vector pPICZ α B, Zeocin, TRIzol reagent, Monoclonal Antibody (MAb) anti-6xHIS Horseradish Peroxidase conjugated and 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); endo- β -N-acetylglucosamidase H and restriction endonucleases (New England Biolabs); anti-bovine IgG-HRP, Coomassie brilliant blue R250 (Sigma-Aldrich); PCR reagents (Cenbiot, UFRGS-Brazil); GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit and GFX Micro Plasmid Prep Kit, DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, ECL Plus Western blotting Detection Reagents, Nitrocellulose Membrane HybondTM ECL (GE Healthcare); Centriprep 50YM (Millipore); BCA Protein Assay (Pierce); Low Range Pre-Stained Protein Marker (BioPioneer); Eagle's Minimal Medium, Bovine Fetal Serum (CultiLab).

Cell and viral DNA isolation

Bovine Herpesvirus type 5 (Strain SV507/99, gently supplied by Virology Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil) (Delhon et al. 2003) were propagated in Madin Darby Kidney Cells (MDBK, ATCC CCL22) grown in Eagle's Minimal Medium (MEM) and supplemented with antibiotics (200 I.U/ml streptomycin and penicillin, 5 μ g/ml enrofloxacin and 2.5 μ g/ml amphotericin B)

and 10% fetal bovine serum (FBS), at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere until 90% ECP visible. BoHV-5 DNA was isolated with TRIzol reagent, according with product protocol, resuspended with 1% TE (Tris-EDTA Buffer – 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at - 20°C.

Viral DNA amplification and construction of expression plasmids

The PCR reaction was performed in a solution containing approximately 25 ng of the extracted DNA (2 µl) and 23 µl of PCR-mix consisting of 2% dimethylsulfoxide (DMSO), 0.2 mM of dNTP, 5 units of Taq DNA polymerase, 1x Reaction Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer. Oligonucleotide primers were designed according the BoHV5 gD sequence at GenBank (accession no. **AY261359**). Cleavage sites for *KpnI* and *XbaI* were introduced in forward (5' – GGG GTA CCA AAT GTA CAT CGA GCC CTG GCA – 3') and reverse (5' – GCT CTA GAG TGG CGG GGG TGG GCG – 3') primers, respectively (from 43 aa to 354 aa).

After DNA amplification, the obtained PCR product was purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. PCR product and pPICZαB expression vector were digested with restriction enzymes *KpnI* and *XbaI*, and then ligated with T4 DNA ligase. The resulting plasmid pPICZαB/tgDBoHV5 was transformed in *E. coli* strain TOP10F by electroporation. Transformants were selected in LB plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, and 2% agar) by zeocin resistance (25 µg/ml). Recombinant clones were submitted to an ultra-rapid miniprep plasmid extraction (Jouglaard et al. 2006) and confirmed by colony PCR with the above primers.

DNA Sequencing

One recombinant clone was submitted to DNA sequencing to confirm that the sequence of the insert was as expected. The sequencing was performed in a MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare) by the use of the DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare) and primers for the alpha-factor signal peptide and for the AOX 3' sequence provided with the EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen). This clone was subsequently used for *P. pastoris* transformation.

Transformation and selection of *Pichia pastoris*

The sequenced recombinant pPICZ α B/rgDBoHV5 plasmid was propagated in *E. coli*, isolated by alkaline lysis procedure (Sambrook and Russel, 2001), purified with GFX Micro Plasmid Prep Kit and then, linearized with restriction enzyme *Pme*I, (New England Biolabs). DNA precipitation was performed according Invitrogen's EasySelect Pichia Expression Kit Manual (User Manual, Version H, Cat.no K1740-01). *P. pastoris* strain KM71H Mut^S phenotype was grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% D-glucose) for 18 h in orbital shaker at 28 °C and 250 rpm until the absorbance at 600 nm reached ~1. Competent cells were prepared as previously described (Invitrogen's User Manual, Version H, Cat.no K1740-01). Yeast cells were transformed by electroporation (25 μ F, 200 Ω , 2 kV) with ~10 μ g of linearized vector and 1 h after transformation 100 and 200 μ l of the 1 ml transformed cell culture in 1 M sorbitol was spread for growth onto YPDS (YPD medium plus 1 M sorbitol and 2% agar) containing 100 μ g/ml zeocin and incubated at 28 °C for 3 days. Sixty recombinant colonies were selected and replicated to new YPD plates with containing zeocin.

Colony blotting

The colony blotting assay was performed as previously described (Goodnough et al. 1993), with some modifications. Briefly, Zeocin recombinant colonies were plated onto BMMY agar medium (1% yeast extract, 2 % peptone, 1.34% yeast nitrogen base, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 0.5% methanol, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0 and 2% agar) and incubated at 28°C for 3 days. Every 24 h, 1% of total medium volume of absolute methanol was added on the top of plates. Pre-cut nitrocellulose membrane HybondTM ECL was then left standing for 3 h at 28°C on the colonies. Membrane was then washed with PBS (pH 7.4) plus 0.05% Tween-20 (PBST) prior to remove adhering colony fragments. Membrane was blocked with 0.5% non-fat dry milk diluted in PBST and incubated with gentle agitation. Blocking solution was replaced after several washes with PBST by MAb Anti-6xHIS HRP conjugated diluted in PBST and incubated at room temperature with gentle agitation for 1 h and, after that, washed again with PBST to remove unbound antibodies. Recombinant colonies were detected with ECL Plus Western blotting Detection reagents. Non transformed KM71H was used as a negative control and recombinant B subunit of heat labile enterotoxin from *E. coli* (LTB) with HIS-tag was used as positive control added on nitrocellulose membrane after induction.

SDS-PAGE and Western blotting

Purified proteins were boiled in SDS-PAGE loading buffer and separated on 12% separating gel in Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250. For Western blotting, separated protein bands were transferred from polyacrylamide gel onto nitrocellulose membranes using Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell filled with Methanol-Tris-Glycine

Buffer (Sambrook and Russel, 2001). Membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in PBST pH 7.4 for 1 h and after several washes with PBST. Antigenic protein bands were detected by incubating membrane with the following sera: MAbs Anti-6xHIS HRP conjugated; mice anti-tgD polyclonal antibody (immunization procedures not shown); sera of mice, bovines and sheep vaccinated with BoHV-5 also for 1 h and then washed with PBST. Membranes were incubated for 1 h with anti-mouse (1:2,000), anti-bovine (1:10,000) or anti-sheep (1:1,000) immunoglobulins HRP conjugated. After that, membranes were washed again and then placed in DAB solution (0.6 mg Diaminobenzidine, 0.03% nickel sulfate, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and hydrogen peroxide 30 vol.) until colored reaction began to appear (no more than 20 min), and then stopped with distilled water washes.

Dot blotting

Dot blotting analysis was performed as described elsewhere (Kucinskaite et al. 2007), with some modifications. Proteins adsorption was carried out by spotting 5 μ l on nitrocellulose membrane pieces (1.0 x 1.0 cm). Membrane was allowed to dry and then, blocked with 5% non-fat dry milk in PBST. After washes, membranes were probed as described.

Expression of tgD in P. pastoris

One recombinant clone that showed higher expression in colony blot was selected, inoculated in culture flasks containing liquid BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 4×10^{-5} % biotin, 1% glycerol, and 100 mM potassium phosphate, pH 6.0) and incubated in orbital shaker for 24 h at 28 °C with 250 rpm until the absorbance at 600 nm reached to an O.D. 20-30. Then,

cells were harvested and resuspended in BMMY medium, reducing 10x total medium volume. Induced expression was performed at 28°C with agitation of 250 rpm for 10 days, in order to observe the best time of protein secretion. Every 24 h, 1% methanol was added, and supernatant was collected and recombinant gD detected by Dot blotting procedure using MAb Anti-6xHIS HRP conjugated. For cultivation in Bioreactor, recombinant KM71H was pre-inoculated in YPD medium for 24 h at 28 °C in agitation of 250 rpm and then cells were placed in reactor containing BMGY medium. Temperature was controlled at 30 °C and agitation was set at 300 rpm. When glycerol was depleted, 1% of methanol was added every 24 h to induce expression during 5 days. Recombinant gD expression was detected by Dot-blotting as mentioned before. After that, cells were harvested in 5,000 g at 4 °C for 10min and supernatant stored at -20 °C until purification.

Protein purification steps

To determine the optimal precipitation condition, ammonium sulfate was added to small samples of supernatant at 4 °C to adjust ammonium sulfate saturation to 30, 40, 50, 60, 70 and 80%. Solutions with varying salt saturations were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The amount of ammonium sulfate added was described at Protein Purification Handbook (GE Healthcare). Precipitated proteins were resuspended in PBS pH 7.4, dialyzed in the same buffer for 48 h and then, analyzed by 12% SDS-PAGE. Best precipitation conditions were re-applied with total amount of supernatant and procedures described above were repeated. Proteins were first precipitated with 60% and then, the amount of ammonium sulfate necessary to acquire 70% of saturation was added on non-precipitated supernatant. After dialyzed, half of supernatant of both 60 and 70% saturated were purified by

1 affinity chromatography in a nickel charged Sepharose column using the ÄktaPrime
2 Chromatography System (GE Healthcare). Another half of supernatant was not
3 submitted to affinity chromatography. Both samples are desalted and concentrated
4 with Centriprep 50YM device at 1,500 g at 20 °C for 10 min. Collected fractions were
5 analyzed by 12% SDS-PAGE and Western blotting using MAb Anti-6xHIS HRP.

6 7 *Determination of protein content*

8 The protein concentration of the culture supernatants and column purified
9 samples were determinate by BCA protein assay method using bovine serum
10 albumin (BSA) as a standard.

11 12 *Endo H digestion*

13 Purified tgD (1 µg) was incubated with 1x Glycoprotein reaction buffer at
14 100°C for 10min to prior total denaturation of glycoprotein. After that, denaturated
15 glycoprotein was incubated at 37°C for 15 h with 1x Endo H reaction buffer and two-
16 fold dilution of Endo H. The enzyme was omitted in control reaction. All procedures
17 were made following the guideline of New England Biolabs for this enzyme.
18 Separated product was visualized by 12% SDS-PAGE and Western blotting with
19 MAb Anti-6xHIS HRP conjugated.

20 21 **RESULTS**

22 23 *Expression vector construction and P. pastoris transformation*

24 The expected 956 bp of viral DNA fragment (Fig. 1A) that encode for
25 truncated form of gD (Fig. 1B) was amplified by PCR with set of primers listed above.

Constructed expression vector pPICZ α B/tgD was used for *E. coli* strain TOP10F transformation, which result in several colonies Zeocin resistant. About 15 colonies were picked for an ultra-rapid screening procedure (Jouglard et al. 2006) which showed 12 recombinants also confirmed by colony PCR with the same primer set used for viral DNA amplification. One of these clones was sequenced. A BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) was performed showing a perfect alignment with the original sequence of BoHV-5 gD (100% identity). Then, *P. pastoris* strain KM71H was transformed with linearized pPICZ α B/tgD by electroporation and after 3 days several colonies appeared on YPDS plates inoculated with 100 and 200 μ l of recovery cell in 1 M Sorbitol 1 hour after transformation. The screening was performed by colony blotting assay in which cells grown on BMMY plates are induced with methanol and the secreted proteins detected with MAb Anti-6xHIS HRP conjugated (Fig. 2). From sixty colonies chosen for colony blotting assay, fifteen shown positive recombinant protein expression in different levels and one of these positive colonies with apparently higher expression level was chosen for shaker flasks and bioreactor growth.

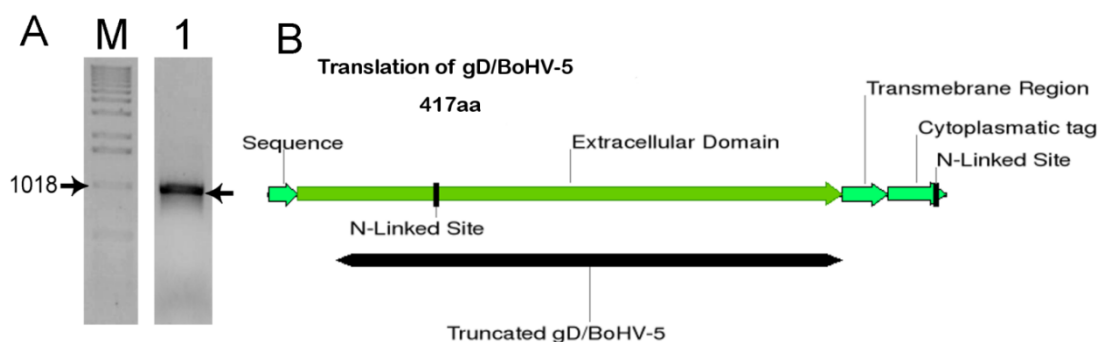


Figure 1. A – PCR amplification of gD gene of BoHV-5. Lane M: Invitrogen 1 kb DNA Ladder Marker; Lane 1: The specific 956 bp PCR product after 0.8% agarose gel electrophoresis. B – Schematic construction of BoHV-5 gD gene.

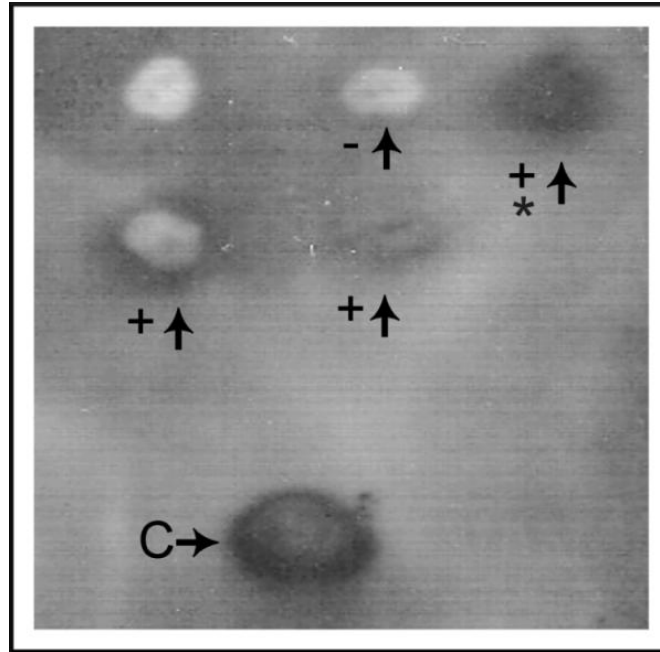


Figure 2. Colony blotting analysis of transformed *P. pastoris* strain KM71H with MAb Anti-6xHIS HRP conjugated. Arrows indicate negative colony or positive colonies expressing tgD with 6xHis tag; Selected recombinant colony for scale up expression test is indicated with an asterisk; C – Recombinant LTB from *E.coli* used as positive control.

Expression of tgD on shaker and bioreactor cultures

Recombinant *P. pastoris* expressing tgD of BoHV-5 on higher level chosen by colony blotting assay was replicated and stored at -70 °C on glycerol. This clone was also used for small scale expression on shaker performed to confirm time of expression after induction. Secreted protein was detected by dot blotting assay and better results were obtained with 48 h of induction (Fig 3). As negative control, non transformed *P. pastoris* KM71H was also grown in BMGY and induced with 1% methanol on BMMY medium. In bioreactor, methanol induction process continued for a period of 5 days. After 24 h of cell grown in glycerol, when this was exhausted,

cells were induced with 1% methanol. Protein secretion was detected by dot blotting, as described above.

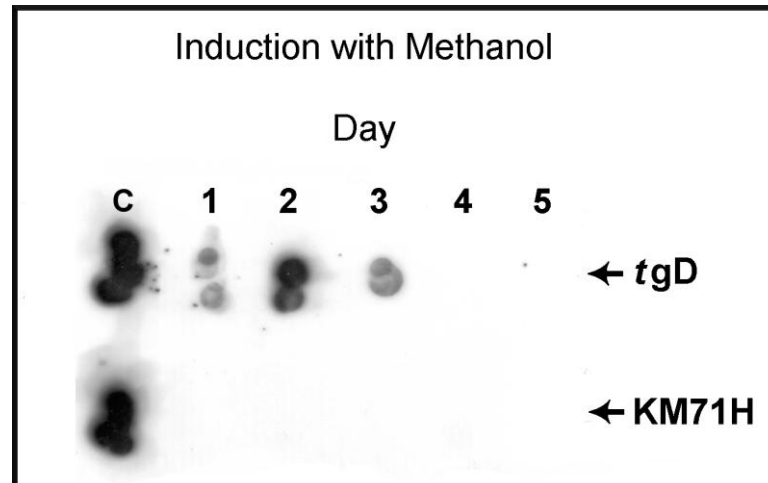


Figure 3. Dot blotting analysis of *tgD* expression on shaker with MAb Anti-6xHis HRP conjugated. Dot blotting of supernatant collected after each 24 h of induction with 1% methanol. At day 2, collected samples represent the maximum of induction time for expression on shaker. C – Recombinant LTB from *E. coli* used as positive control.

Purification and quantification of purified tgD

Protein fractionating by salting-out with ammonium sulfate shows that *tgD* expressed in *P. pastoris* was better precipitated in a range of 60% and 70% of salt saturation. Proteins were detected by 12% SDS-PAGE (Fig 4). Collected samples of affinity chromatography (60 and 70%) and samples non-submitted to this step were concentrated by ultra-filtration with Centriprep 50YM that reduce 80% of the volume (Fig 4). High purified *tgD* obtained with affinity chromatography was utilized as standards, while precipitated and concentrated supernatant was use as a raw sample to evaluate antigenic responses. The SDS-PAGE performed shows, in higher purified

tgD two bands, one with ~55 kDa and another with ~50 kDa that might suggest that partial glycosylation occurs. In raw samples we also observed the same two bands, and others that also might indicate differences in glycosylation patterns or endogenous proteins of *P. pastoris*. Purified proteins were quantified by BCA Proteins Assay and resulted in a yield of ~ 190 mg/L.

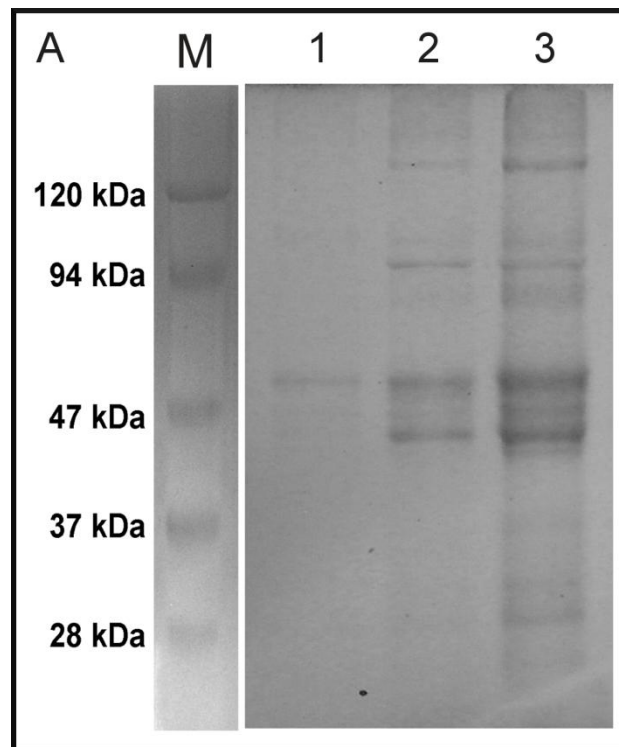


Figure 4. The 12% SDS-PAGE and Dot blotting analysis of saturation levels with MAb Anti-6xHis HRP conjugated. A - Lane M: BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker, Lanes 1-3, 50, 60 and 70% of saturation level of ammonium sulfate utilized, respectively

Glycosylation analysis

As demonstrated in Fig. 5, Western blotting with secreted protein submitted to Endo-H activity secreted tgD was sensitive to enzyme. Our construction for tgD added only extracellular domain glycosylation site and glycosylated tgD expressed in *P. pastoris* had ~55 kDa while deglycosylated decreased no more that 4kDa suggesting that hiperglycosylation did not occur.

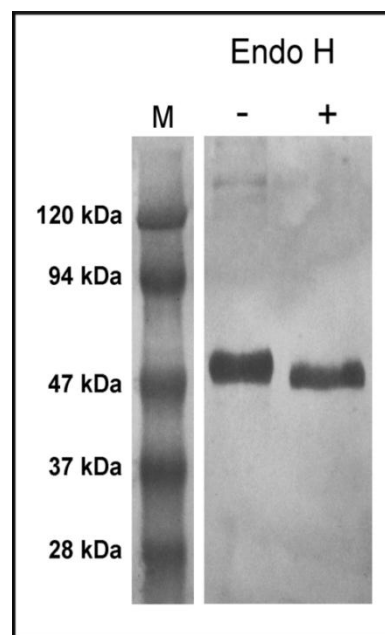


Figure 5. Western blotting analysis of Endo-H sensitivity of tgD with MAb Anti-6xHis HRP conjugated. Lane M: BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker; Purified recombinant BoHV-5 tgD incubated with (+) or without (-) Endo H.

Antigenic characterization of tgD by Western blotting

Truncated form of gD BoHV-5 expressed in *P. pastoris* was detected by polyclonal anti-tgD antibodies (Fig. 6) produced in mice. Anti-BoHV-5 serum of animals immunized with BoHV-5 vaccine also detected tgD (Fig. 7). Band with ~55kDa and others of lower and upper sizes were detected, showing that tgD might form dimmers and might have differences on glycosylation patterns. Control sera of non immunized animals did not show any reaction with tgD (data not shown) or nonspecific reactions with KM71H proteins in Western blotting.

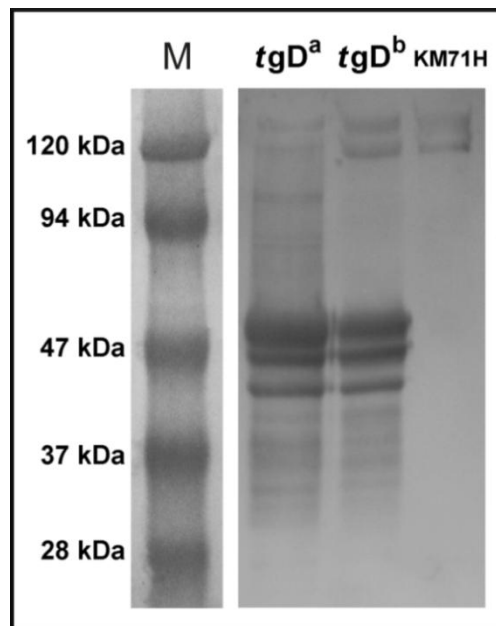


Figure 6. Western blotting analysis of recombinant tgD with polyclonal antibody anti-tgD of BoHV-5. Lane M: BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker; Lane (tgD^a): recombinant protein precipitated and purified by Ni-NTA affinity chromatography. Lane (tgD^b): recombinant protein precipitated with ammonium sulfate as a single step purification. Lane KM71H: supernatant of non transformed yeast cells after methanol induction used as negative control.

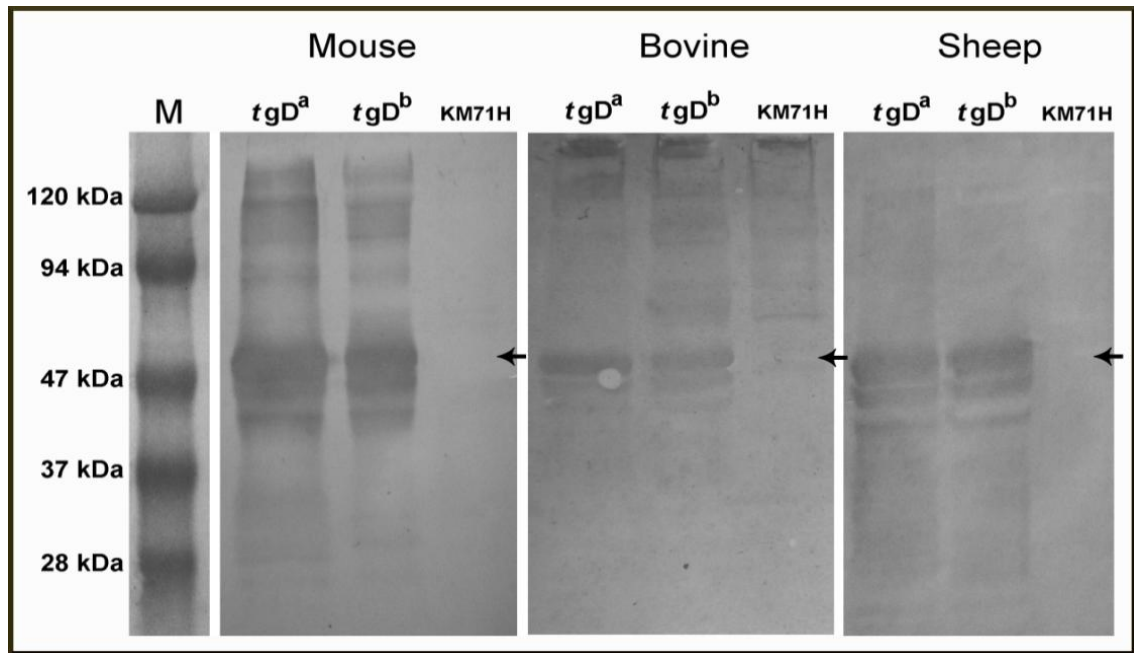


Figure 7. Western blotting analysis of recombinant tgD with Polyclonal sera of mouse, bovine and sheep immunized with BoHV-5. Lane M: BioPioneer Low Range Pre-Stained Protein Marker; Lanes (tgD^a) recombinant protein precipitated and purified by Ni-NTA affinity chromatography. Lane (tgD^b): recombinant protein precipitated with ammonium sulfate as a single step of purification. Lane KM71H: supernatant of non transformed yeast cells after methanol induction used as negative control.

DISCUSSION

In this work, we demonstrate, for the first time, the successfully expression of a truncated form of gD of BoHV-5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, showing that antigenic properties of native gD of BoHV-5 are preserved in the recombinant protein. Constructed expression vector pPICZ α B/gD BoHV-5 uses the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating pre-pro signal peptide to promote secretion of

the recombinant protein. Fifteen colonies expressing recombinant glycoprotein were detected by MAb Anti 6xHis in colony blotting assay, and we could observe that not all of them secreted the same amount of recombinant protein. This could happen due to different copy numbers of integration vector in clones, or due to some interference in assay procedure, although colonies exhibited approximately the same size. Induction of expression in shaker allowed us to confirm that the chosen clone was able to express our protein of interest and to set parameters to induction. As expression in shaker does not result in high yields of recombinant protein (data not shown), we decide to scale up the expression to a 1.5 L bioreactor. In bioreactor a yield of tgD ~190 mg/L was obtained after concentration with 60% and 70% of ammonium sulfate saturation with or without affinity chromatography.

We chose to adopt two strategies to purify the recombinant glycoprotein: i) ammonium sulfate precipitation and desalting by dialysis and ultra-filtration with Centriprep device, and ii) the same procedure, but with Ni-NTA affinity chromatography step after dialysis and, then purified protein fractions were ultra-filtrated. These procedures allowed us to evaluate the applicability of a more simple and inexpensive purification method, such as ammonium sulfate precipitation (Hebert et al. 1973), as a single purification step. We did not observe any interference of single step purified proteins with ammonium sulfate in antigenicity reactions with sera tested.

It is know that yeast *P. pastoris* could link both N- and O- oligosaccharides to glycoproteins on pathways that are simple but similar to other eukaryotics cells (Cereghino and Cregg, 2000; Daly and Hearn, 2005; Gellissen, 2000). N-linked oligosaccharide side chains produced on glycoproteins expressed in *P. pastoris* have been shown to be mainly of the high-mannose type where the length of the

oligosaccharide chains added to proteins is on average 8-9 mannose residues per site (Cereghino and Cregg, 2000; Gellissen, 2000; Sugrue et al. 1997). However, *P. pastoris* has been shown previously to hyperglycosylate recombinant proteins with addition of many mannose residues (Montesino, et al. 1998; Ruitenberg et al. 2001; Scorer et al. 1993).

The BoHV-5 gD sequence shows two N-glycosylation sites, one at cytoplasmic tag and other at extracellular domain. This gD appears to lack one of potential N-glycosylation sites at extracellular domain, in comparison with BoHV-1 gD sequence (Abdelmagid et al. 1995). Although the recombinant BoHV-5 tgD does not possesses the cytoplasmic tag, it may not affect the glycosylation patterns of recombinant tgD, because it probable that the cytoplasmic N-glycosylation site of native BoHV-5 gD was not glycosylated, as suggested for BoHV-1 gD (Tikoo et al. 1993). To further evaluate the pattern of N-glycosylation of tgD expressed in *P. pastoris*, we treated the recombinant glycoprotein with Endo-H. The tgD shown to be sensitive to Endo-H digestion and a small size reduction of approximately 5 kDa was observed, which may suggest that only small mannose chains were added. This absence of hiperglycosylation is consistent with other glycoproteins expressed in this system, such as the BoHV-1 gD (Zhu et al. 1997, 1999) and Dengue Virus gE (Sugrue et al. 1997). Others viral glycoproteins expressed in *P. pastoris*, such as Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) gp 120 (Scorer et al. 1993) and Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) gD (Ruitenberg et al. 2001) were hyperglycosylated and could altered both antigenicity and immunogenicity of recombinant protein (Sugrue et al. 1997). Predicted size of truncated BoHV-5 gD plus 6xHis tag was approximately 38.5 kDa. So, the high molecular weight of tgD observed even after removal of N-linked sugar could suggest that *P. pastoris* also added O-linked oligosaccharide in

different patterns, however we did not analyze by enzyme digestion the O-glycosylation these recombinant glycoprotein.

The antigenic characterization of *tgD* expressed in *P. pastoris* allowed us to investigate if antibodies from sera of immunized animals with BoHV-5 were able to detect recombinant protein in Western blotting assay. The recombinant *tgD* retain native BoHV-5gD characteristics, based on results obtained. We observe that serum from different species (mouse, bovines and sheep) recognized the *tgD* and different band sizes. This differences in band size suggesting that: i) the recombinant *tgD* could form dimmers; ii) different glycosylation patterns may occurs and iii) degradation of C-terminal region of recombinant protein may occurs, since MAb Anti-6xHis could not recognize this reduced band sizes. We also observe that BoHV-5 *tgD* expressed in *P. pastoris* are immunogenic, since its induced antibodies response in mice vaccinated with recombinant protein (immunization data not shown).

In this study we reported that methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is a convenient heterologous system to express recombinant glycoproteins since this are successfully secreted to the supernatant, its easy purification and its capacity to growth in large scale, at high cells density. The BoHV-5 *tgD* was expressed in *Pichia pastoris* for the first time and presents antigenic characteristics from native BoHV-5 gD that allow its recognition by animal sera of different species immunized with BoHV-5. Further studies will focus in optimize the expression of this glycoprotein, ways to purification and to apply these recombinant glycoprotein as experimental vaccine.

1 **ACKNOWLEDGES**

2
3 We thank Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development
4 (CNPq) for financial support (Project 478461/2004-6 and Technical Support
5 Scholarship); Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Prof. Dr. Carlos Gil Turnes and Prof.
6 Dr. José Antônio Aleixo from Biotechnology Center of Federal University of Pelotas,
7 RS, Brazil, for technical support and research supplies. We also thank Prof. Dr. Rudi
8 Weiblen from Federal University of Santa Maria, RS, Brazil, for providing BoHV-5
9 strain SV507/99.

11 **REFERENCES**

- 12
13 Abdelmagid, O.Y., Minocha, H.C., Collins, J.K., Chowdhury, S.I., 1995. Fine
14 mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes
15 by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD.
16 Virology, 206, 242-253.
- 17 Ashbaugh, S.E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S.,
18 Collins, J.K., 1997. Specific detection of shedding and latency of Bovine Herpesvirus
19 1 and 5 using a Nested Polymerase Chain Reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 387-
20 394.
- 21 Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Tikoo, S.L., 1996. Immunology of
22 Bovine Herpesvirus 1 infection. Vet. Microbiol. 53, 31-42.
- 23 Bagust, T.J., Clarck, L., 1972. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in
24 calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. J. Comp. Pathol. 82, 375-383.

- 1 Belknap, E.B., Collins, J.K., Ayres, V.K., Schultheiss, P.C., 1994. Experimental
2 infection of neonatal calves with neurovirulent Bovine Herpesvirus type 1.3. Vet.
3 Pathol. 31, 358-365.
- 4 Carrilo, B.J., Ambrogi, A., Schudel, A., Vazquez, M., Dahme, A., Pospischil A., 1983.
5 Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. Zentralbl.
6 Veterinarmed. B. 30, 327-332.
- 7 Cascio, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Ames, A.D., Collins, J.K., 1999.
8 Encephalitis induced by Bovine Herpesvirus 5 and protection by prior vaccination of
9 infection with Bovine Herpesvirus 1. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 134-139.
- 10 Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the
11 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24, 45-66.
- 12 Chowdhury, S.I., Lee, B.J., Ozkul, A., Weiss, M.L., 2000. Bovine Herpesvirus 5
13 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory
14 pathway of the rabbit. J. Virol. 74, 2094-2106.
- 15 Claus, M.P., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Lunardi, M., Alfieri, A.A., 2007. Bovine
16 Hepesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and Multiplex-PCR in central
17 nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds. Braz. J.
18 Microbiol. 15, 485-490.
- 19 Collins, J.K., Ayers, V.K., Whetstone, C.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., 1993.
20 Antigenic differences between the major glycoproteins of Bovine Herpesvirus type
21 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. J. Gen. Virol. 74, 1509-1517.
- 22 Colodel, E.M., Nakazato, L., Weiblen, R., Mello, R.M., Silva, R.R.P., Souza, M.A.,
23 Filho, J.A.O, Caron, L., 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por
24 Herpesvírus Bovino no Estado de Mato Grosso. Brasil. Cienc. Rural. 32, 293-298.

- 1 Csellner, H., Walker, C., Wellington, J.E., McLure, L.E., Love, D.N., Whalley, J.M.,
2 2000. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell
3 fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in
4 mice. Arch. Virol. 145, 2371-2385.
- 5 d'Offay, J.M., Mock, R.E., Fulton, R.W., 1993. Isolation and characterization of
6 encephalic Bovine Herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. Am. J.
7 Vet. Res. 54, 534-539.
- 8 Daly, R., Hearn, M.T., 2005. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a
9 useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 18,
10 119-138.
- 11 Dasika, G.K., Letchworth, G.J., 1999. Cellular expression of Bovine Herpesvirus 1 gD
12 inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary
13 infection. Virology. 245, 24-36.
- 14 Delhon, G., Moraes, M.P., Lu, Z., Afonso, C.L., Flores, E.F., Weiblen, R., Kutish,
15 G.F., Rock, D.L., 2003. Genome of Bovine Herpesvirus 5. J. Virol. 77, 10339-10347.
- 16 Dubuisson J., Israel B.A., Letchworth G.J., 1992. Mechanism of Bovine Herpesvirus
17 type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. J.
18 Gen. Virol. 73, 2031-2039.
- 19 Engels, M., Giuliani, C., Wild, P., Beck, T.M., Loepfe, E., Wyler, R., 1986. The
20 genome of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic
21 potential compared to know BHV-1 strain by restriction site mapping and cross-
22 hybridization. Virus Res. 6, 57-73.
- 23 Filgueira, D.M.P., Zamorano, P.I., Dominguez, M.G., Taboga, O., Zajac, M.P.D.M.,
24 Puntel, M., Romera, S.A., Morris, T.J., Borca, M.V., Sadir, A.M., 2003. Bovine Herpes

- 1 virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV)
2 vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine*, 21, 4201-4209.
- 3 French, E.L., 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and
4 characterization on the causal agent. *Australian Vet. J.* 38, 216-221.
- 5 French, E.L., 1962. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and a
6 virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Vet. J.* 38, 555-556.
- 7 Gellissen, G., 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl.*
8 *Microbiol. Biotechnol.* 54, 741-750.
- 9 Geraghty, R.J., Jogger, C.R., Spear, P.G., 2000. Cellular expression of
10 Alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous
11 Alphaherpesvirus by blocking access to a shared gD receptor. *Virology*, 268, 147-
12 158.
- 13 Gomes, L.I., Rocha, M.A., Costa, E.A., Lobato, Z.I.P., Mendes, L.C.N., Borges, A.S.,
14 Leite, R.C., Barbosa-Stancioli, E.F., 2002. Detecção de Herpesvírus Bovino 5
15 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootecn.* 54, 217-
16 220.
- 17 Goodnough, M.C., Hammer, B., Sugiyama, H., Johnson, E.A., 1993. Colony
18 immunoblot assay of botulinal toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2339-2342.
- 19 Han, X., Ye, L.-B., Li, B., Bo, G., Cai, W., Hong, Z., She, Y.-L., Ye, L., Kong, L.-B.,
20 Wu, Z.-H., 2006. Expression, purification, and characterization of the Hepatitis B virus
21 entire envelope large protein in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* 49, 168-175.
- 22 Hanon, E., Meyer, G., Vanderplasschen, A., Dessy-Doizé, C., Thiry, E., Pastoret, P.-
23 P., 1998. Attachment but not penetration of Bovine Herpesvirus 1 is necessary to
24 induce apoptosis in target cells. *J. Virol.* 72, 7638-7641.

- 1 Hanon, E., Keil, G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Griebel, P.,
2 Vanderplasschen, A., Riksewijk, F.A.M., Babiuk, L.A., Pastoret, P.-P., 1999. Bovine
3 Herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology*, 257,
4 191-197.
- 5 Hardy, E., Martínez, E., Diago, D., Díaz, R., González, D., Herrera, L., 2000. Large-
6 scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *J.*
7 *Biotech.* 77, 157-167.
- 8 Hebert, G.A., Pelham, P.L., Pittman, B., 1973. Determination of the optimal
9 ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat
10 antisera. *Appl. Microbiol.* 25, 26-36.
- 11 Hutchings, D.L., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L.A., 1990. Lymphocyte
12 proliferative responses to separate bovine herpesvirus-1 proteins in immune cattle. *J.*
13 *Virol.* 64, 5114-5122.
- 14 Jiang, W.Z., Jin, N.Y., Li, Z.J., Zhang, L.S., Wang, H.W., Zhang, Y.J., Han, W.Y.,
15 2005. Expression and characterization of Gag protein of HIV-1_{CN} in *Pichia pastoris*. *J.*
16 *Virol. Method.* 123, 35-40
- 17 Jouglard, S.D., Medeiros, M.A., Vaz, E.K., Bastos, R.G., Cunha, C.W., Armoa,
18 G.R.G., Dellagostin, O.A., 2006. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation
19 method for screening recombinant colonies. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*
20 H71, 234.
- 21 Kucinskaite, I., Jouzapaitis, M., Serva, A., Zyirbliene, A., Johnson, N., Staniulis, J.,
22 Fooks, A.R., Müller, T., Sasnauskas, K., Ulrich, R.G., 2007. Antigenic
23 characterization of yeast-expressed Lyssavirus nucleoproteins. *Virus Genes*, 35,
24 512-529.

- 1 Lee, K.-H., Hong, H.-J., Lim, S.-M., Cheon, S.-H., Kim, D.-I., 2006. Expression of
2 human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (hCTLA4) fused with Hepatitis B surface
3 antigen (HBsAg) using *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 481-485.
- 4 Li, Y., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L.A., Liang, X., 1995.
5 Characterization of cell-binding properties of Bovine Herpesvirus 1 glycoproteins B,
6 C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J. Virol.* 69, 4758-4768.
- 7 Li, Z.-X., Hong, G.-Q., Hu, B., Liang, M.-J., Xu, J., Li, L., 2007. Suitability of yeast-
8 and *Escherichia coli*- expressed Hepatitis B virus core antigen derivatives for
9 detection of anti-HBc antibodies in human sera. *Protein Express. Purif.* 56, 293-300.
- 10 Liang, X., Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Fitzpatrick, D.R., Zamb,
11 T.J., 1991. Bovine Herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its
12 major glycoproteins gI, gIII, gIV. *J. Virol.* 65, 1124-1132.
- 13 Liu, R.S., Yang, K.-Y., Lin, J., Lin, Y.-W., Zhang, Z.-H., Zhang, J., Xia, N.-S., 2004.
14 High-yield expression of recombinant SARS Coronavirus nucleocapsid protein in
15 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *World. J. Gastroentero.* 10, 3602-3607.
- 16 Martinez-Donato, G., Acosta-Rivero, N., Morales-Grillo, J., Musacchio, A., Vina, A.,
17 Alvarez, C., Figueroa, N., Guerra, I., Garcia, J., Varas, L., Muzio, V., Dueñas-
18 Carrera, S., 2006. Expression and processing of Hepatitis C virus structural proteins
19 in *Pichia pastoris* yeast. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 342, 625-631.
- 20 Metzler, A.E., Schudel, A.A., Engels, M., 1986. Bovine Herpesvirus 1: molecular and
21 antigenic characteristics of variant isolated from calves with neurological disease.
22 *Arch. Virol.* 87, 205-217.
- 23 Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., Cremata, J.A., 1998. Variation in N-linked
24 oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic
25 yeast *Pichia pastoris*. *Protein, Express. Purif.* 14, 197-207.

- 1 Protein Purification Handbook, *Principles and Methods*, GE-Health Care, Edition AC,
2 Version 18-1132-29.
- 3 Riet-Corrêa, G., Duarte, M.D., Barbosa, J.D., Oliveira, C.M.C., Cerqueira, V.D., Brito,
4 M.F., Riet-Corrêa, F., 2006. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por
5 Herpesvírus Bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 26, 44-46.
- 6 Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, L.G., Rosa, J.C.A., 1997.
7 Diferenciação entre os vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (BHV-1) e
8 herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet.*
9 *Bras.* 17, 41-44.
- 10 Roehe, P.M., Teixeira, M.B., Esteves, P.A., et al. 1998. Situação do BHV-1 na
11 América do Sul, In *Proceedings of: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino*
12 *(Tipo 1 e 5), Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*, 1998, Santa Maria: Universidade
13 Federal de Santa Maria, Brasil (1998) 89-96.
- 14 Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert,
15 M.J., 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123, 425-449.
- 16 Rogan, D., Babiuk, L.A., 2005. Novel vaccines from biotechnology. *Rev. Sci. Techn.*
17 *Off. Int. Epizoot.* 24, 159-174.
- 18 Ruitenbergh, K.M., Gilkerson, J.R., Wellington, J.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 2001.
19 Equine Herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is
20 hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of
21 EHV-1 disease. *Virus Res.* 79, 125-135.
- 22 Salvador, S.C., Lemos, R.A.A., Riet-Corrêa, F., Roehe, P.M., Osório, A.L.A.R., 1998.
23 Meningoencefalite em bovinos causada por Herpesvírus Bovino-5 no Mato Grosso
24 do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18, 75-82.

- 1 Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th Ed,
- 2 Cold Spring Harbor Lab. Press, New York,
- 3 Sanches, A.W.D., Langohr, I.M., Stigger, A.L., Barros, C.S.L., 2000. Doenças do
- 4 sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20, 113-118.
- 5 Schwyzer, M., Ackermann, M., 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses.
- 6 *Vet. Microbiol.* 53, 17-29.
- 7 Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J., Romanos, M.A., 1993. The intracellular
- 8 production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia*
- 9 *pastoris*. *Gene*, 136, 111-119.
- 10 Souza, V.F., Melo, S.V., Esteves, P.A., Schmidt, C.S., Gonçalves, D.A., Schaefer, R.,
- 11 Silva, T.C., Almeida, R.S., Vicentini, F., Franco, A.C., Oliveira, E.A., Spilki, F.R.,
- 12 Weiblen, R., Flores, E.F., Lemos, R.A., Alfieri, A.A., Pituco, E.M., Roehe, P.M., 2002.
- 13 Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos
- 14 monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 22, 13-18.
- 15 Sugrue, R.J., Fu, J., Howe, J., Chan, Y.-C., 1997. Expression of the Dengue virus
- 16 structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J.*
- 17 *Gen. Virol.* 78, 1861-1866.
- 18 Tikoo, S.K., Fitzpatrick, D.R., Babiuk, L.A., Zamb, T.J., 1990. Molecular cloning,
- 19 sequencing, and expression of functional Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV in
- 20 transfected bovine cells. *J. Virol.* 64, 5132-5142.
- 21 Tikoo, S.K., Parker, M.D., van den Hurk, J.V., Kowalski, J., Zamb, T.J., Babiuk, L.A.,
- 22 1993. Role of N-linked glycans in antigenicity, processing, and cell surface
- 23 expression of Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV. *J. Virol.* 67, 726-733.

- 1 Valera, A.R. Costa, E.F., Traveria, G., Alvarado, M.F.P., Chialva, M., Galosi, C.M.,
2 2000. Brote de Meningoencephalitis por Herpesvirus Bovino (BHV-5): em La
3 província de Buenos Aires, Argentina. Med. Vet. 17, 84-87.
- 4 van Drunen Littel-van den Hurk, S., Parker, M.D., Massie, B., van den Hurk, J.V.,
5 Harland, R., Babiuk, L.A., Zamb, T.J., 1993. Protection of cattle from BHV-1 infection
6 by immunization with recombinant glycoprotein gIV. Vaccine, 11, 25-35.
- 7 van Kooij, A., Middel, J., Jakab, F., Elfferich, P., Koedijk, D.G.A.M., Feijlbrief, M.,
8 Scheffer, A.J., Degener, J.E., The, T.H., Scheek, R.M., Welling, G.W., Welling-
9 Wester. S., 2002. High level expression and secretion of truncated forms of Herpes
10 Simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast *Pichia*
11 *pastoris*. Protein Express. Purif. 25, 400-408.
- 12 Vogel, F.S.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Kunrath, C.F., 2002. Atividade neutralizante
13 anti-Herpesvírus Bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados
14 com vacinas contra o BHV-1. Cien. Rural, 32, 881-883.
- 15 Vogel, F.S.F., Caron, L., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Mayer, S.V.,
16 Bastos, R.G., 2003. Distribution of Bovine Herpesvirus type 5 DNA in the central
17 nervous systems of latently, experimentally infected calves. J. Clin. Microbiol. 41,
18 4512-4520.
- 19 Wang, C.Y., Lou, Y.L., Chen, Y.T., Li, S.K., Lin, C.H., Hsieh, Y.C., Liu, H.J., 2007.
20 The cleavage of the hemagglutinin protein of H5N2 Avian Influenza Virus in yeast, J.
21 Virol. Method. 146, 239-297.
- 22 Weiblen, R., Barros, C.S., Canabarro, T.F., Flores, I.E., 1989. Bovine
23 Meningo encephalitis from IBR virus. Vet. Rec. 124, 666-667.
- 24 Wild, P., Schraner, E.M., Peter, J., Loepfe, E., Engels, M., 1998. Novel entry pathway
25 of Bovine Herpesvirus 1 and 5. J. Virol. 72, 9561-9566.

- 1 Whetstone, C.A., Seal, B.S., Miller, J.M., 1993. Variability occurs in the inverted
2 repeat region of genomic DNA from Bovine Herpesvirus 1 respiratory, genital and
3 Bovine Herpesvirus 5 encephalitis isolates. *Vet. Microbiol.* 38, 181-189.
- 4 Zajac, M.P.D.M., Puntel, M., Zamorano, P., Sadir, A., Romera, S., 2006. BHV-1
5 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81,
6 327-334.
- 7 Zhao, L.H., Yu, X.H., Jiang, C.L., Wu, Y.G., Shen, J.C., Kong, W., 2007. Studies on
8 antigenicity of Human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) external glycoprotein
9 as well as its expression in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 23,
10 457-461.
- 11 Zhu, X., Letchworth, G.J., 1996. Mucosal and systemic immunity to Bovine
12 Herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in
13 cattle. *Vaccine*, 14, 61-69.
- 14 Zhu, X., Wu, S., Letchworth, G.J., 1997. Yeas-secreted Bovine Herpesvirus type 1
15 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. *Vaccine*,
16 15, 679-688.
- 17 Zhu, X., Wu, S., Letchworth, G.J., 1999. A chimeric protein comprised of Bovine
18 Herpesvirus type 1 glycoprotein D and bovine interleukin-6 is secreted by yeast and
19 possesses biological activities of both molecules. *Vaccine*, 17, 269-282.

3 CONCLUSÃO

O estudo realizado demonstrou que a utilização da levedura *P. pastoris* como um sistema de expressão de proteínas heterólogas é viável, principalmente quando o objetivo da pesquisa é a expressão de proteínas que sofrem modificações pós-traducionais em eucariotos, tais como a glicosilação. A expressão da forma truncada da gD do BoHV-5 e a sua caracterização, quanto à presença de glicosilação e a antigenicidade, possibilitará que futuros estudos sejam realizados com esta proteína recombinante, tais como a otimização da sua expressão em Bioreator, padronizando o procedimento e a avaliação imunogênica, através de experimentos de imunização de animais susceptíveis a infecções por BoHV-5 e de modelos biológicos.

4 REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, O. Y.; MINOCHA, H. C.; COLLINS, J. K.; CHOWDHURY, S. I. Fine mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**, v. 206, p. 242-253, 1995.
- AMBAGALA, A. P. N.; SOLHEIM, J. C.; SRIKAMARAN, S. Viral interference with MHC class I antigen presentation pathway: the battle continues. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, p. 1-15, 2005.
- ATHMARAM, T. N.; BALI, G.; KAHNG, G. G.; DWARAKANATH, S. Heterologous expression of Bluetongue VP2 viral protein fragment in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, v. 35, p. 265-271, 2007.
- BABIUK, L. A.; ROUSE, B. T. Herpesvirus vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p. 63-76, 1996.
- BABIUK, L. A.; van DRUNEN-LITTEL-van den HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of Bovine Herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 31-42, 1996.
- BAGUST, T. J.; CLARCK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 375-383, 1972.
- BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. **Oncogene**, v. 17, p. 3261-3270, 1998.
- BARENFUS, M.; DELLA QUADRI, C. A.; MCINTYRE, R. W.; SCHROEDER, R. J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 725-728, 1963.

- 1 BARTHA, A.; HAJDU, G.; ALDASSY, P.; PACZOLAY, G. Occurrence of
2 encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in
3 Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, p. 145-151,
4 1969.
- 5 BISHT, H.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression and
6 purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B
7 surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p.
8 84-96, 2001.
- 9 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio**
10 **Brasileiro**: Desempenho do comércio exterior. Prospecto de Divulgação, 2006.
11 116p. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em Março de 2007.
- 12 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio**
13 **Brasileiro**: qualidade e sanidade na conquista de novos mercados. Prospecto de
14 Divulgação. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em Março de 2007.
- 15 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balança Comercial**
16 **do Agronegócio**, 2007. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em Março
17 de 2007.
- 18 CARRILLO, B. J.; AMBROGÍ, A.; SCHUDEL, A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, A.;
19 POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina.
20 **Zentralblatt fur Veterinarmedizin B**, v. 30, n. 5, p. 327-332, 1983.
- 21 CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; AMES, A. D.; COLLINS, J.
22 K. Encephalitis induced by Bovine Herpesvirus 5 and protection by prior vaccination
23 of infection with Bovine Herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic**
24 **Investigation**, v. 11, p. 134-139, 1999.
- 25 CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein
26 production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 422-
27 427, 1999.
- 28 CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the
29 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66,
30 2000.

- 1 CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of
2 recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current**
3 **Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.
- 4 CHASE, C. C. L.; CARTER-ALLEN, K.; LOHFF, C.; LETCHWORTH, G. J. Bovine
5 cells expressing Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by
6 BHV-1, Herpes Simplex Virus, and Pseudorabies Virus. **Journal of Virology**, v. 64,
7 n. 10, p. 4866-4872, 1990.
- 8 CHOWDHURY, S. I.; LEE, B. J.; OZKUL, A.; WEISS, M. L. Bovine Herpesvirus 5
9 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory
10 pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, v. 74, n. 5, p. 2094-2106, 2000.
- 11 CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus Bovino tipo 5 e
12 meningoencefalite herpética bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 131-
13 141, 2002.
- 14 CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A. Bovine
15 Herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and MULTIPLEX-PCR in
16 central nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds.
17 **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 485-490, 2007.
- 18 COHRS, R. J.; GILDEN, D. H. Human Herpesvirus Latency. **Brain Pathology**, v. 11,
19 p. 465-474, 2001.
- 20 COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; WHETSTONE, C. A.; van DRUNEN LITTEL-van den
21 HURK, S. Antigenic differences between the major glycoproteins of Bovine
22 Herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **Journal of**
23 **General Virology**, v. 74, p. 1509-1517, 1993.
- 24 COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R. M.; SILVA, R. R. P. da;
25 SOUZA, M. de A.; FILHO, J. A. de O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em
26 bovinos causada por Herpesvírus Bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência**
27 **Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.
- 28 CONNOLLY, S. A.; WHITBECK, J. C.; RUX, A. H.; KRUMMENACHER, C.; van
29 DRUNEN LITTEL-van den HURK, S. COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.
30 Glycoprotein D homologs in Herpes Simplex Virus type 1, Pseudorabies Virus, and

- 1 Bovine Herpes Virus type 1 bind directly to Human HveC (Nectin-1) with different
2 affinities. **Virology**, v. 280, p. 7-18, 2001.
- 3 COOK, C. B.; SPLITTER, G. A. Characterization of bovine mononuclear cell
4 population with natural cytotoxic activity against Bovine Herpesvirus – 1 infected
5 cells. **Cellular Immunology**, v. 120, p. 240-249, 1989.
- 6 COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*:
7 purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological**
8 **Chemistry**, v. 44, p. 2279-2289, 1980.
- 9 COX, G. J. M.; ZAMB, T. J.; BABIUK, L. A. Bovine Herpesvirus 1: immune responses
10 in mice and cattle injected with plasmid DNA. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p.
11 5664-5667, 1993.
- 12 CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia*
13 *pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5,
14 n. 12, p. 3376-3385, 1985.
- 15 CSELLNER, H.; WALKER, C.; WELLINGTON, J. E.; McLURE, L. E.; LOVE, D. N.;
16 WHALLEY, J. M. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and
17 cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune
18 response in mice. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2371-2385, 2000.
- 19 d'OFFAY, J. M.; MOCK, R. E.; FULTON, R. W. Isolation and characterization of
20 encephalitic Bovine Herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America.
21 **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 534-539, 1993.
- 22 DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a
23 useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular**
24 **Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.
- 25 DASIKA, G. K.; LETCHWORTH, G. J. Cellular expression of Bovine Herpesvirus 1
26 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their
27 primary infection. **Virology**, v. 245, p. 24-36, 1999.

- 1 DASIKA, G. K.; LETCHWORTH, G. J. Homologous and heterologous interference
2 requires Bovine Herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry.
3 **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1041-1049, 2000.
- 4 DE PAULA, R. R.; SOUZA, M. A.; COLODEL, E. M.; HÜBNER, S. O.; BRUM, K. B.;
5 JORGE, K. B. C.; DAMASCENO, A. D. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em
6 um bovino do Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
7 **Zootecnia**, v. 57, p. 2, 2005.
- 8 DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN,
9 R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of**
10 **Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.
- 11 DENIS, M.; SLAOUI, M.; KEIL, G.; BABIUK, L. A.; ERNST, E.; PASTORET, P.-P.;
12 THIRY, E. Identification of different target glycoproteins for Bovine Herpes virus type
13 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation.
14 **Immunology**, v. 78, p. 7-13, 1993.
- 15 DESHPANDE, M. S.; AMBAGALA, T. C.; HEGDE, N. R.; HARIHARAN, M. J.;
16 NAVARATNAM, M.; SRIKUMARAN, S. Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific
17 for Bovine Herpesvirus-1 by DNA immunization. **Vaccine**, v. 20, p. 3744-3751, 2002.
- 18 DIEL, D. G.; FONSECA, E. T. da; SOUZA, S. F. de; MAZZANTI, A.; BAUERMANN,
19 F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar
20 as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos,
21 dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p.
22 164-170, 2005.
- 23 DIEL, D. G.; ALMEIDA, S. R.; BRUM, M. C. S.; DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.;
24 FLORES, E. F. Acute and latent infection by Bovine Herpesvirus type 5 in
25 experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 257-267, 2007.
- 26 ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia
27 por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de
28 bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p.
29 123-131, 2004.

- 1 ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P.; BECK, T. M.; LOEPFE, E.; WYLER, R. The
2 genome of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic
3 potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-
4 hybridization. **Virus Research**, v. 6, n. 1, p. 57-73, 1986.
- 5 ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant Herpesvirus infections.
6 **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15, 1996.
- 7 FARNÓS, O.; BOUÉ, O.; PARRA, F.; MARTÍN-ALONSO, J. M.; VALDÉS, O.;
8 JOGLAR, M.; NAVEA, L.; NARANJO, P.; LLEONART, R. High-level expression and
9 immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60
10 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 215-
11 224, 2005.
- 12 FARNÓS, O.; RODRÍGUEZ, M.; CHIONG, M.; PARRA, F.; BOUÉ, O.; LORENZO,
13 N.; COLÁS, M.; LLEONART, R. The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus
14 VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-
15 mediated immune response following intranasal immunization in mice. **Veterinary**
16 **Microbiology**, v. 114, p. 187-95, 2006.
- 17 FILGUEIRA, D. M. P.; ZAMORANO, P. I.; DOMÍNGUEZ, M. G.; TABOGA, O.;
18 ZAJAC, M. P. Del M.; PUNTEL, M.; ROMERA, S. A.; MORRIS, T. J.; BORCA, M. V.;
19 SADIR, A. M. Bovine Herpes virus gD protein produced in plants using a
20 recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity.
21 **Vaccine**, v. 21, p. 4201-4209, 2003.
- 22 FILHO, E. J. F.; ALVARENGA, M.; FERREIRA, P. M.; CARVALHO, A. U. de.
23 Abordagem clínica das neuropatias dos ruminantes. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE
24 BUIATRIA, 2, 2005, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Anais do...** Belo
25 Horizonte: ABMG, 2005.
- 26 FLAÑO, E.; HUSAIN, S. M.; SAMPLE, J. T.; WOODLAND, D. L.; BLACKMAN, M. A.
27 Latent murine γ -Herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic
28 cells, and macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 1074-1081, 2000.

- 1 FLAÑO, E.; KIM, I.-J.; WOODLAND, D. L.; BLACKMAN, M. A. γ -Herpesvirus latency
2 is preferentially maintained in splenic germinal center and memory B cells. **The**
3 **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 10, p. 1363-1372, 2002.
- 4 FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization
5 on the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221, 1962.
- 6 FRENCH, E. L. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and a virus
7 isolated from calves with encephalitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 555-
8 556, 1962.
- 9 GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied**
10 **Microbiology & Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.
- 11 GERAGHTY, R. J.; JOGGER, C. R.; SPEAR, P. G. Cellular expression of
12 Alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous
13 Alphaherpesvirus by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**, v. 268, p.
14 147-158, 2000.
- 15 GERAGHTY, R. J.; FRIDBERG, A.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G. H.;
16 EISENBERG, R. J.; SPEAR, P. G. Use of chimeric Nectin-1 (HveC)-related receptors
17 to demonstrate that ability to bind Alphaherpesvirus gD is not necessarily sufficient
18 for viral entry. **Virology**, v. 285, p. 366, 375, 2001.
- 19 GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A.; LOBATO, Z. I. P.; MENDES, L. C. N.;
20 BORGES, A. S.; LEITE, R. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Detecção de
21 Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo**
22 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002.
- 23 GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; SOUZA, J. G.; COSTA, E. A.; BARBOSA-STANCIOLI,
24 E. F. Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) in Bull semen: amplification and sequence
25 analysis of the *US4* gene. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 495-
26 504, 2003.
- 27 GOUGH, A.; JAMES, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis.
28 **The Veterinary Journal**, v. 16, p. 313-314, 1975.

- 1 GRANZOW, H.; KLUPP, B. G.; FUCHS, W.; VEITS, J.; OSTERRIEDER, N.;
2 METTENLEITER, T. C. Egress of Alphaherpesviruses: comparative ultrastructural
3 study. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3675-3684, 2001.
- 4 GREWAL, A. S.; ROUSE, B. T.; BABIUK, L. A. Mechanisms of resistance to
5 herpesviruses: comparison of the effectiveness of different cell types in mediating
6 Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 15, n. 3,
7 p. 698-703, 1977.
- 8 HAN, X.; BARTLAM, M.; JIN, Y.; LIU, X.; HE, X.; CAI, X.; XIE, Q.; RAO, Z. The
9 expression of SARS-CoV M gene in *Pichia pastoris* and the diagnostic utility of the
10 expression product. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 105-111, 2004.
- 11 HAN, X.; YE, L.-B.; LI, B.; BO, G.; CAI, W.; HONG, Z.; SHE, Y.-L.; YE, L.; KONG, L.-
12 B.; WU, Z.-H. Expression, purification and characterization of the Hepatitis B virus
13 entire envelope large protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and**
14 **Purification**, v. 49, p. 168-175, 2006.
- 15 HANON, E.; MEYER, G.; VANDERPLASSCHEN, A.; DESSY-DOIZÉ, C.; THIRY, E.;
16 PASTORET, P.-P. Attachment but not penetration of Bovine Herpesvirus 1 is
17 necessary to induce apoptosis in target cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p.
18 7638-7641, 1998.
- 19 HANON, E.; KEIL, G.; van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S.; GRIEBEL, P.;
20 VANDERPLASSCHEN, A.; RIKSEWIJK, F. A. M.; BABIUK, L. A.; PASTORET, P.-P.
21 Bovine Herpesvirus 1- induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. **Virology**,
22 v. 257, p. 191-197, 1999.
- 23 HARDY, E.; MARTÍNEZ, E.; DIAGO, D.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, D.; HERRERA, L.
24 Large-scale production of recombinant Hepatitis B surface antigen from *Pichia*
25 *pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 157-167, 2000.
- 26 HOUNSELL, E. F.; DAVIES, M. J.; RENOUF, D. V. O-linked protein glycosylation
27 structure and function. **Glycoconjugate Journal**, v. 13, n. 1, p. 19-26, 1996.
- 28 INVITROGEN, **EasySelect™ Pichia Expression Kit**: A manual of methods for
29 expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Cat.
30 nº K1780-01, version H, INVITROGEN, 2005. 74p.

- 1 JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Imunidade
2 Inata. In: **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6.ed. Porto
3 Alegre: Artmed, 2007. p. 55-75.
- 4 JIANG, W. Z.; JIN, N. Y.; LI, Z. J.; ZHANG, L. S.; WANG, H. W.; ZHANG, Y. J.; HAN,
5 W. Y. Expression and characterization of Gag protein of HIV-1_{CN} in *Pichia pastoris*.
6 **Journal of Virological Methods**, v. 123, p. 35-40, 2005.
- 7 JONES, Clinton. Herpes Simplex Virus type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency.
8 **Clinical Microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 79-95, 2003.
- 9 JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of Bovine Herpesvirus type 1,
10 its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of
11 improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.
- 12 KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A.; RUULS, R. C.; KEIL, G. M.; THIRY, E.;
13 PASTORET, P. P.; van OIRSCHOT, J. T.; Virulence, immunogenicity and
14 reactivation of Bovine Herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or
15 in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v. 16, n. 8, p. 802-809, 1998.
- 16 KOOIJ, A. van; MIDDEL, J.; JAKAB, F.; ELFFERICH, P.; KOEDIJK, D. G. A. M.;
17 FEIJLBRIEF, M.; SCHEFFER, A. J.; DEGENER, J. E.; THE, T. H.; SCHEEK, R. M.;
18 WELLING, G. W.; WELLING-WESTER, S. High level expression and secretion of
19 truncated forms of Herpes Simples virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the
20 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 25, p.
21 400-408, 2002.
- 22 KUKURUZINSKA, M. A.; LENNON, K. Protein N-glycosylation: molecular genetics
23 and functional significance. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 9, n. 4,
24 p. 415-448, 1998.
- 25 LEE, K.-H.; HONG, H.-J.; LIM, S.-M.; CHEON, S.-H.; KIM, D.-I. Expression of Human
26 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (hCTLA4) fused with Hepatitis B surface antigen
27 (HBsAg) using *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 481-
28 485. 2006.
- 29 LI, Y.; van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S.; BABIUK, L. A.; LIANG, X.
30 Characterization of cell-binding properties of Bovine Herpesvirus 1 glycoproteins B,

- 1 C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **Journal of Virology**, v.
2 69, n. 8, p. 4758-4768, 1995.
- 3 LI, Z.-X.; HONG, G.-Q.; HU, B.; LIANG, M.-J.; XU, J.; LI, L. Suitability of yeast- and
4 *Escherichia coli*-expressed Hepatitis B virus core antigen derivatives for detection of
5 anti-HBc antibodies in human sera. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p.
6 293-300, 2007.
- 7 LIANG, X.; BABIUK, L. A.; van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S.; FITZPATRICK,
8 D. R.; ZAMB, T. J. Bovine Herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated
9 by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. **Journal of Virology**, v. 65, n. 3, p. 1124-
10 1132, 1991.
- 11 LIU, D.; ZHANG, Y.; YU, X.; JIANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y.; JIN, Y.; NIU, J.; QU, N.;
12 LIU, M.; KONG, W. Assembly and immunogenicity of Human Papillomavirus type 16
13 major capsid protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. **Chemical Research in Chinese**
14 **Universities**, v. 23, n. 2, p. 200-203, 2007.
- 15 LIU, R.-S.; YANG, K.-Y. LIN, J.; LIN, Y.-W.; ZHANG, Z.-H.; ZHANG, J.; XIA, N.-S.
16 High-yield expression of recombinant SARS Coronavirus nucleocapsid protein in
17 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n.
18 24, p. 3602-3607, 2004.
- 19 MARSHALL, R. I.; ISRAEL, B. A.; LETCHWORTH, G. J. Monoclonal antibody
20 analysis of Bovine Herpesvirus -1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural
21 infection. **Virology**, v. 165, p. 338-347, 1988.
- 22 MARTINEZ-DONATO, G.; ACOSTA-RIVERO, N.; MORALES-GRILLO, J.;
23 MUSACCHIO, A.; VINA, A.; ALVAREZ, C.; FIGUEROA, N.; GUERRA, I.; GARCIA,
24 J.; VARAS, L.; MUZIO, V.; DUEÑAS-CARRERA, S. Expression and processing of
25 Hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. **Biochemical and**
26 **Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 625-631, 2006.
- 27 METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine Herpesvirus 1: molecular
28 and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological
29 disease. **Archives of Virology**, v. 87, p. 205-217, 1986.

- 1 MEURENS, F.; KEIL, G. M.; MUYLEKENS, B.; GOGEV, S.; SCHYNTS, F.; NEGRO,
2 S.; WIGGERS, L.; THIRY, E. Interspecific recombination between two ruminant
3 Alphaherpesviruses, Bovine Herpesviruses 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 78, n.
4 18, p. 9828-9836, 2004.
- 5 MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of Bovine
6 Herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General**
7 **Virology**, v. 80, p. 2849-2859, 1999.
- 8 MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.;
9 COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent
10 infections of calves with Bovine Herpesvirus types 1 and 5. **Archives in Virology**, v.
11 146, p. 633-652, 2001.
- 12 MUYLEKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine
13 Herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**,
14 v. 38, p. 181-209, 2007.
- 15 NESBURN, A. B.; GHIASE, H.; WECHSLER, S. L. Ocular safety and efficacy of an
16 HSV-1 gD vaccine during primary and latent infection. **Investigative Ophthalmology**
17 **& Visual Science**, v. 31, n. 8, p. 1497-1502, 1990.
- 18 OIRSCHOT, J. T. van; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. M. Advances in the
19 development and evaluation of Bovine Herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary**
20 **Microbiology**, v. 53, p. 43-54, 1996.
- 21 OIRSCHOT, J. T. van; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. M.; STEGEMAN, J. A.
22 The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of**
23 **Biotechnology**, v. 44, p. 75-81, 1996.
- 24 OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; ROSINHA, G. M. S.; RODARTE, R. S.; RECH, E.
25 L.; SPLITTER, G. A. Biolistic-mediated gene transfer using the Bovine Herpesvirus-1
26 glycoprotein D is an effective delivery system to induce neutralizing antibodies in its
27 natural host. **Journal of Immunological Methods**, v. 245, p. 109-118, 2000.
- 28 PALMER, L. D.; LEARY, T. P.; WILSON, D. M.; SPLITTER, G. A. Bovine natural
29 killer-like cell response against cell lines expressing recombinant Bovine Herpesvirus
30 type 1 glycoproteins. **The Journal of Immunology**, v. 145, p. 1009-1014, 1990.

- 1 PEDRAZA, F. J. O.; ALESSI, A. C. Encefalitis bovina por Herpesvirus Bovino tipo 5
2 (HVB-5). Una revisión. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 17, n. 2, p.
3 148-155, 2004.
- 4 PEREZ, S. E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M. R.; OSORIO, F. A.; FLORES, E.
5 F.; ODEÓN, A. C. Primary infection, latency, and reactivation of Bovine Herpesvirus
6 type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 437-444, 2002.
- 7 PIDONE, C. L.; GALOSI, C. M.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. Herpesvirus Bovinos 1
8 y 5. **Analecta Veterinaria**, v. 19, n. 1/2, p. 40-50, 1999.
- 9 RANKIN, R.; PONTAROLLO, R.; GOMIS, S.; KARVONEN, B.; WILLSON, P.;
10 LOEHR, B. I.; GODSON, D. L.; BABIUK, L. A.; HECKER, R.; van DRUNEN LITTEL-
11 van den HURK, S. CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the
12 immune responses of cattle to Bovine Herpesvirus-1 glycoprotein D. **Vaccine**, v. 20,
13 p. 3014-3022, 2002.
- 14 RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.;
15 CERQUEIRA, V. D.; BRITO, M. de F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e
16 polioencefalomalacia causada por Herpesvírus Bovino-5 no Estado do Pará.
17 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 44-46, 2006.
- 18 RISSI, D. R.; RECH, R. R.; FLORES, E. F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.
19 Meningoencefalite por Herpesvírus Bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
20 27, n. 7, p. 251-260, 2007.
- 21 ROEHE, P. M.; SILVA, T. C. da; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. de A.
22 Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e
23 herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa**
24 **Veterinária Brasileira**, 17, n. 1, p. 41-44, 1997.
- 25 ROEHE, P. M.; TEIXEIRA, M. F. B.; ALMEIDA, R. S. Situação do BHV-1 e BHV-5 no
26 Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO (TIPO 1
27 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria, Rio
28 Grande do Sul, Brasil. **Anais do...** Santa Maria: UFSM, 1998. p. 89-96.

- 1 ROGAN, D.; BABIUK, L. A. Novel vaccines from biotechnology. **Revue Scientifique**
2 **et Technique de l'Office International des Epizooties**, v. 24, n. 1, p. 159-174,
3 2005.
- 4 ROIZMAN, B.; SEARS, A. E. An inquiry into the mechanisms of Herpes Simplex
5 Virus latency. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 41, p. 543-573, 1987.
- 6 ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON,
7 A. C.; STUDDERT, M. J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of**
8 **Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.
- 9 ROUSE, B. T.; WARDLEY, R. C.; BABIUK, L. A. Antibody-Dependent Cell-Mediated
10 Cytotoxicity in cows: comparison of effector cell activity against heterologous
11 erythrocyte and Herpesvirus-infected bovine target cells. **Infection and Immunity**, v.
12 13, n. 5, p. 1433-1441, 1976.
- 13 ROUSE, B. T.; GREWAL, A. S.; BABIUK, L. A.; FUJIMIYA, Y. Enhancement of
14 Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity of Herpesvirus-infected cells by
15 complement. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 660-665, 1977.
- 16 RUITENBERG, K. M.; GILKERSON, J. R.; WELLINGTON, J. E.; LOVE, D. N.;
17 WHALLEY, J. M. Equine Herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is
18 hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of
19 EHV-1 disease. **Virus Research**, v. 79, p. 125-135, 2001.
- 20 SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSORIO,
21 A. L. A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por Herpesvírus Bovino-5 no
22 Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p.
23 75-82, 1998.
- 24 SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças
25 do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária**
26 **Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 113-118, 2000.
- 27 SANTOS, C.; REETZ, E. R.; BELING, R. R.; VENCATO, A.; RIGON, L.; CORRÊA, S.
28 **Anuário Brasileiro da pecuária 2007**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa
29 Cruz, 2007. 128p.

- 1 SCHATZMAYR, H. G. Novas perspectivas em vacinas virais. **História, Ciência,**
2 **Saúde – Manguinhos**, v. 10, p. 655-669, 2003.
- 3 SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses.
4 **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.
- 5 SCHYNTS, F.; MEURENS, F.; DETRY, B.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E.
6 Rise and survival of Bovine Herpesvirus 1 recombinants after primary infection and
7 reactivation from latency. **Journal of Virology**, v. 77, n. 23, p. 12535-12542, 2003.
- 8 SILVA, A. M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SUR, H. J.; OSORIO,
9 F. A.; FLORES, E. F. Experimental infection of sheep with Bovine Herpesvirus type-5
10 (BHV-5): acute and latent infection. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 89-99.
- 11 SOUZA, V. F.; MELO, S. V.; ESTEVES, P. A., SCHIMIDT, C. S.; GONÇALVES, D.
12 A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T. C.; ALMEIDA, R. S.; VINCENTINI, F.; FRANCO, A.
13 C.; OLIVEIRA, E. A.; SPILKI, F. R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; LEMOS, R. A.;
14 ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M.; ROEHE, P. M. Caracterização de Herpesvírus
15 Bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa**
16 **Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18, 2002.
- 17 SPEAR, P. G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an update. **Journal of**
18 **Virology**, v. 77, n. 19, p. 10179-10185, 2003.
- 19 SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; FRANCO, A. C.; LIMA, M.; HOLZ, C. L.; BATISTA,
20 H. B. R.; DRIEMEIER, D.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P. M.
21 Neurovirulência e neuroinvasividade de Herpesvírus Bovinos tipos 1 e 5 em coelhos.
22 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 58-63, 2002.
- 23 STEWART, J. P.; USHERWOOD, E. J.; ROSS, A.; DYSON, H.; NASH, T. Lung
24 epithelial cells are a major site of murine Gammaherpesvirus persistence. **Journal of**
25 **Experimental Medicine**, v. 187, n. 12, p. 1941-1951, 1998.
- 26 SUGRUE, R. J.; FU, J.; HOWE, J.; CHAN, Y.-C. Expression of the Dengue virus
27 structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles.
28 **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997.

- 1 SUNIL-CHANDRA, N. P.; EFSTATHIOU, S.; NASH, A. A. Murine Gammaherpesvirus
2 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes *in vivo*. **Journal of General**
3 **Virology**, v. 73, p. 3275-3279, 1992.
- 4 TEUTON, J. R.; BRANDT, C. R. Sialic Acid on Herpes Simplex Virus type 1 envelope
5 glycoproteins is required for efficient infection of cells. **Journal of Virology**, v. 81, n.
6 8, p. 3731-3739, 2007.
- 7 THIRY, E.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; THIRY, J.;
8 VANDERPLASSCHEN, A.; SCHYNTS, F. Recombination in the Alphaherpesvirus
9 Bovine Herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 171-177, 2006.
- 10 THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.;
11 VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to
12 Bovine Herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, p. 169-190, 2006.
- 13 THORNE, K. J. I.; NORMAN, J. M.; HAYDOCK, S. F.; LAMMAS, D. A.; DUFFUS, P.
14 H. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity against IBR-infected bovine
15 kidney cells by ruminant neutrophils: the role of lysosomal cationic protein.
16 **Immunology**, v. 53, p. 275-282, 1984.
- 17 TIKOO, S. K.; FITZPATRICK, D. R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Molecular cloning,
18 sequencing, and expression of functional Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV in
19 transfected bovine cells. **Journal of Virology**, v. 64, n. 10, p. 5132-5142, 1990.
- 20 TIKOO, S. K.; PARKER, M. D.; van den HURK, J. V.; KOWALSKI, J.; ZAMB, T. J.;
21 BABIUK, L. A. Role of N-linked glycans in antigenicity, processing, and cell surface
22 expression of Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV. **Journal of Virology**, v. 67, n.
23 2, p. 726-733, 1993.
- 24 TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em
25 leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.
- 26 VALDÉS, I.; HERMIDA, L.; ZULUETA, A.; MARTÍN, J.; SILVA, R.; ÁLVAREZ, M.;
27 GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G. Expression in *Pichia pastoris* and immunological
28 evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**, v.
29 35, p. 23-30, 2007.

- 1 VALERA, A. R.; COSTA, E. F.; TRAVERIA, G.; ALVARADO, M. F. P.; CHIALVA, M.;
2 GALOSI, C. M. Brote de meningoencefalitis por Herpesvirus bovino (BHV-5): em la
3 provincia de Buenos Aires, Argentina. **Medicina Veterinaria**, v. 17, n. 4, p. 84-87,
4 2000.
- 5 van DRUNEN-LITTEL-van den HURK, S.; BABIUK, L. A. Polypeptide specificity of
6 the antibody response after primary and recurrent infection with Bovine Herpesvirus-
7 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 274-282, 1986.
- 8 van DRUNEN-LITTEL-van den HURK, S.; PARKER, M. D.; MASSIE, B.; van den
9 HURK, J. V.; HARLAND, R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Protection of cattle from
10 BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. **Vaccine**, v. 11,
11 p. 25-35, 1993.
- 12 VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade
13 neutralizante anti-Herpesvírus Bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de
14 bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 881-
15 883, 2002.
- 16 VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.;
17 MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of Bovine Herpesvirus type 5 DNA in the
18 central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of**
19 **Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.
- 20 WAGNER, E. K.; BLOOM, D. C. Experimental investigation of Herpes Simplex Virus
21 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 419-443, 1997.
- 22 WANG, C. Y.; LUO, Y. L.; CHEN, Y. T.; LI, S. K.; LIN, C. H.; HSIEH, Y. C.; LIU, H. J.
23 The cleavage of the hemagglutinin protein of H5N2 avian influenza virus in yeast.
24 **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 293-297, 2007.
- 25 WECK, K. E.; KIM, S. S.; VIRGIN, H. W.; SPECK, S. H. Macrophages are the major
26 reservoir of latent murine Gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. **Journal of**
27 **Virology**, v. 73, p. 3273-3283, 1999.
- 28 WEI, H.; JIANG, L.; XUE, Y.; FANG, D.; GUO, H. Secreted expression of Dengue
29 virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of**
30 **Virological Methods**, v. 109, p. 17-23, 2003.

- 1 WEIBLEN, R.; BARROS, C. S. de; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. Bovine
2 Meningoencephalitis from IBR virus. **The Veterinary Records**, v. 124, n. 25, p. 666-
3 667, 1989.
- 4 WENSKE, E. A.; BRATTON, M. W.; COURTNEY, R. J. Endo- β -N-
5 Acetylglucosaminidase H sensitivity of precursors to Herpes Simplex Virus type 1
6 glycoproteins gB and gC. **Journal of Virology**, v. 44, n. 1, p. 241-248, 1982.
- 7 WHETSTONE, C. A.; SEAL, B. S.; MILLER, J. M. Variability occurs in the inverted
8 repeat region of genomic DNA from Bovine Herpesvirus 1 respiratory, genital and
9 Bovine Herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 181-
10 189, 1993.
- 11 WHITBECK, J. C.; PENG, C.; LOU, H.; XU, R.; WILLIS, S. H.; DE LEON, M. P.;
12 PENG, T.; NICOLA, A. V.; MONTGOMERY, R. I.; WARNER, M. S.; SOULIKA, A. M.;
13 SPRUCE, L. A.; MOORE, W. T.; LAMBRIS, J. D.; SPEAR, P. G.; COHEN, G. H.;
14 EISENBERG, R. J. Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus (HSV) binds directly to
15 HVEM, a member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily and a
16 mediator of HSV entry. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 6083-6093, 1997.
- 17 WHITLEY, R. J.; GNANN, J. W. The epidemiology and clinical manifestations of
18 Herpes Simplex virus infections. In: **The Human Herpesviruses**. Edited by B.
19 Roizman, R. J. Whitley, R. J. & C. Lopez. New York: Raven Press, p. 69-105, 1993.
- 20 WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry
21 pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9561-
22 9566, 1998.
- 23 WINKELMANN, E. R.; SILVA, L. F. da; MAYER, S. V.; MAZZUTTI, K. C.; WEIBLEN,
24 R.; FLORES, E. F. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra
25 uma cepa do Herpesvírus Bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína C (gC). **Ciência**
26 **Rural**, v. 37, n. 4, p. 1066-1072, 2007.
- 27 ZAJAC, M. Del M.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.; SADIR, A.; ROMERA, S. BHV-1
28 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in**
29 **Veterinary Science**, v. 81, p. 327-334, 2006.

- 1 ZHAO, L. H.; YU, X. H.; JIANG, C. L.; WU, Y. G.; SHEN, J. C.; KONG, W. Studies on
2 antigenicity of Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) external glycoprotein as
3 well as its expression in *Pichia pastoris*, **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 23, n.
4 3, 457-461, 2007.
- 5 ZHU; X.; LETCHWORTH, G. J. Mucosal and systemic immunity to Bovine
6 Herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in
7 cattle. **Vaccine**, v. 14, n. 1, p. 61-69, 1996.
- 8 ZHU, X.; WU, S.; LETCHWORTH, G. J. Yeast-secreted Bovine Herpesvirus type 1
9 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. **Vaccine**,
10 v. 15, n. 6/7, p. 679-688, 1997.
- 11 ZHU, X.; WU, S.; LETCHWORTH, G. J. A chimeric protein comprised of Bovine
12 Herpesvirus type 1 glycoprotein D and bovine interleukin-6 is secreted by yeast and
13 possesses biological activities of both molecules. **Vaccine**, v. 17, p. 269-282, 1999.
- 14