

Expressão induzível de complexo *Cas9*-RNAg como mecanismo de combate ao BoHV-1

Inducible expression of *Cas9*-gRNA complex as a defense system against BoHV-1

RESUMO

Victor Gabriel de Faria Pastre
victorpastre@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Flavia Regina Oliveira de Barros
flaviabarros@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) gera elevados prejuízos na produtividade de rebanhos bovinos. A infecção por esse tipo de vírus causa a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e leva ao comprometimento dos tratos respiratório, reprodutivo e nervoso dos animais, além de ocasionar abortos e reduzir a taxa de fertilidade. A erradicação do BoHV-1 não é esperada uma vez que o mesmo se encontra disseminado em todo o mundo. A utilização de técnicas da biologia molecular moderna apresenta-se como potencial forma de combate à propagação desse tipo de vírus. Este estudo objetivou desenvolver um mecanismo de combate ao BoHV-1 através de um sistema de expressão induzível por tetraciclina do complexo *Cas9*-RNAg. Assim, projetou-se o vetor molecular e o fragmento para recombinação homóloga adequados para a modificação mediada por CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), considerando potenciais clivagens *off-target* e a eficácia do sistema de combate ao vírus.

PALAVRAS-CHAVE: Engenharia genética. Biotecnologia. Herpesvírus.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) causes high losses in cattle productivity. The infection of BoHV-1 causes infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and leads to deterioration of the respiratory, reproductive and nervous tracts of the animals, in addition to causing abortions and reduced fertility rate. The eradication of BoHV-1 infections is not expected since it is spread worldwide. The application of modern molecular biology techniques is a potential way to fight against this type of virus. Here, we aimed to develop an antiviral mechanism against BoHV-1 through a tetracycline inducible expression system of *Cas9*-gRNA complex. Hence we designed the appropriate molecular vector and the homologous recombination fragment for the CRISPR-mediated (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) modification considering potential off-target effects and the efficacy of the antiviral system.

KEYWORDS: Genetic engineering. Biotechnology. Herpesvirus.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O BoHV-1 é um agente etiológico responsável por grandes prejuízos em rebanhos de bovinos utilizados para fins comerciais (MELO; RAMOS; LEITE, 2012). Esse vírus causa o comprometimento dos tratos respiratório, reprodutivo e nervoso, estando relacionado à diversas condições clínicas (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2004).

Infecções por BoHV-1 estão ligadas à duas doenças de grande importância econômica: a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB). No entanto, o BoHV-1 também é associado com diversas outras condições, como a encefalite (MARIN et al., 2020).

O BoHV-1 encontra-se altamente disseminado em diversos países e, apesar da existência de vacinas, não é esperada a erradicação de sua presença em um curto prazo de tempo, sendo o seu combate, portanto, altamente necessário (ALVES et al., 2019). A transmissão do BoHV-1 ocorre pelo contato com fluidos de animais contaminados, tais como: secreções, anexos fetais, sêmen e inalação de aerossóis. Uma vez contaminado, a infecção não tem cura e o animal se torna um reservatório permanente de BoHV-1, apenas apresentando quadros de latência de sintomas (LEVINGS; ROTH, 2013).

Atualmente, são encontrados diferentes tipos de vacina contra o BoHV-1 no mercado, tais como: vacinas com vírus inativado, atenuado, recombinante e com marcadores. Apesar disso, no Brasil, apenas as vacinas com vírus inativado e atenuado termossensível são comercializadas (COSTA et al., 2017).

Estudos demonstram que as vacinas com o BoHV-1 inativado e atenuado previnem os sintomas clínicos e a liberação do vírus, no entanto, podem não tornar os animais vacinados imunes a infecção. As vacinas inativadas usualmente apresentam baixa imunogenicidade, enquanto que as vacinas atenuadas geram a possibilidade de estabelecimento de infecção latente e, portanto, o uso desse tipo de vacina apresenta restrições (JONES; DA SILVA; SINANI, 2011; ZHAO; XI, 2011).

A utilização de técnicas da engenharia genética tem se mostrado um potencial método para o desenvolvimento de mecanismos de combate à diferentes tipos de vírus. A ferramenta de edição genética CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) tem sido aplicada com sucesso para o desenvolvimento de vacinas recombinantes e outros sistemas de combate a doenças virais, gerando novas perspectivas de aplicações terapêuticas (CHANG et al., 2019; KOUJAH; SHUKLA; NAQVI, 2019).

Uma possível forma de combate ao BoHV-1 é a expressão da enzima Cas9 e de um RNAg pela própria célula hospedeira do vírus, podendo atingir, dessa forma, todas as células em que o vírus se encontra alojado. Estudos demonstram que a expressão da enzima Cas9 de maneira constitutiva em linhagens de camundongos não provocou alterações nos animais (PLATT et al., 2014).

De modo a evitar um gasto de energia desnecessário em células não infectadas e reduzir as chances de clivagens indesejadas (*off-targets*), a expressão da enzima Cas9 pode ser controlada. A partir da utilização de uma sequência promotora induzível é possível controlar a expressão de um gene por fatores externos, sendo o promotor controlado pela presença de tetraciclina é um exemplo funcional deste método. Utilizando este tipo de promotor, a expressão

da proteína condicionado por ele ocorrerá em todas as células em que houver a presença da tetraciclina no seu interior (GOSSEN; BUJARD, 1992).

A ferramenta CRISPR-*Cas9* pode ser utilizada para a realização de um knock-in em fibroblastos bovinos, promovendo a inserção do gene da enzima *Cas9* acoplado a um ativador sensível à tetraciclina e de uma sequência de um gene essencial para o BoHV-1, responsável por dar origem ao RNAg. Essa modificação potencialmente dá origem a um mecanismo de combate a infecções causadas pelo vírus e pode servir como base para posterior desenvolvimento de mecanismo de combate a outros tipos de vírus.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo desenvolver um mecanismo de combate ao BoHV-1 através de um sistema de expressão induzível do complexo *Cas9*-RNAg ativada por promotor de resposta à tetraciclina.

MATERIAL E MÉTODOS

A região alvo para realização do *knock-in* no genoma bovino foi selecionada com base na literatura, considerando os potenciais efeitos sinérgicos da inserção de novas sequências em um genoma e as possíveis clivagens *off-target* geradas pela utilização do sistema CRISPR-*Cas9*, os quais podem gerar consequências indesejáveis às células modificadas, como a indução de mutações inesperadas.

Quanto ao vetor molecular, foi definida a utilização do plasmídeo pX330 spCas9-mSA (GU; POSFAI; ROSSANT, 2018) para a expressão conjunta da enzima *Cas9* e do RNAg para clivagem do DNA bovino, na posição onde posteriormente será inserido o gene da *Cas9* e o RNAg para o genoma viral. Para a obtenção da sequência do RNAg para clivar o DNA bovino foram desenvolvidos *primers* com extremidades adaptadoras, visando amplificar a região no genoma bovino para posterior digestão com enzimas de restrição e inserção na sequência do plasmídeo.

A definição do alvo do sistema de combate ao BoHV-1 foi feita considerando que a clivagem na posição escolhida deve levar a inativação do vírus e, portanto, deve ocorrer em uma região do genoma considerada essencial para sua viabilidade. Dessa forma, a predileção do alvo do RNAg utilizou os resultados de Robinson et al. (2008) sobre os genes essenciais e não essenciais do BoHV-1.

A montagem da sequência do fragmento molde foi realizada a partir de sequências do genoma bovino e de diferentes plasmídeos. Foram desenvolvidos *primers* a partir do genoma completo da espécie *Bos taurus*, disponível na plataforma GenBank (ID: 82), para amplificar as sequências dos braços de homologia do fragmento molde, correspondentes a 500 pares de base (pb) localizados antes e após o local de clivagem no genoma bovino. As sequências correspondentes ao cassete de expressão da *Cas9* e do RNAg foram obtidas no mapa do plasmídeo usado como base do vetor molecular. As sequências dos elementos responsáveis pelo sistema de ativação por tetraciclina da expressão da *Cas9* foram obtidas no plasmídeo pCW57.1 (ABDISALAAM et al., 2020).

ATIVIDADES PROGRAMADAS PARA A PRÓXIMA FASE DO PROJETO

Devido à crise sanitária global causada pela pandemia de Covid-19, parte das atividades do trabalho não puderam ser realizadas. Tais atividades, descritas nos próximos parágrafos, seriam realizadas no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis da Universidade de São Paulo durante estágio supervisionado, no entanto, o adiamento foi necessário tendo em vista o cenário atual.

O vetor molecular plasmidial será gerado a partir da inserção da sequência do RNAg para clivagem do genoma bovino, obtido através da amplificação por PCR do fragmento usando os *primers* previamente definidos, na sequência do plasmídeo pX330 spCas9-mSA. Esse processo ocorrerá através da digestão com enzimas de restrição, ligação dos fragmentos e clonagem do vetor em bactérias *Escherichia coli*.

Da mesma maneira, os fragmentos de sequência que darão origem ao molde para recombinação homóloga serão amplificados, adaptados e unidos, promovendo a obtenção da sequência adequada para a realização do *knock-in*. O vetor molecular e o fragmento molde obtido serão submetidos ao processo de sequenciamento para confirmação de cada etapa da clonagem.

O material genético necessário para criação do sistema de combate ao BoHV-1 será inserido em células de fibroblastos bovinos, previamente cultivadas *in vitro*, utilizando o processo de lipofecção. Para isso, será utilizado o reagente Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, California, EUA), conforme protocolo disponibilizado pelo fornecedor.

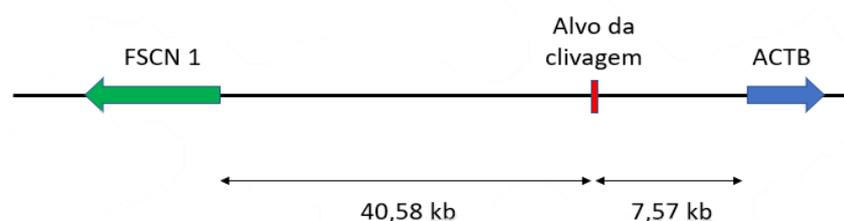
A confirmação da inserção do fragmento na região alvo será realizada a partir da amplificação do genoma das células modificadas e posterior sequenciamento. Já a eficácia do sistema em clivar a sequência viral após ativação será feita através da co-transfecção de plasmídeos contendo a sequência viral nos fibroblastos modificados. A sequência alvo do mecanismo se encontra entre uma região promotora e um gene de uma proteína fluorescente, a qual não será expressa no caso de clivagem da sequência viral.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

LOCAL DE INSERÇÃO DO *KNOCK-IN* NO GENOMA BOVINO

O *locus* alvo da inserção escolhido foi uma região intergênica, localizada no cromossomo 25, com 561 pb, representado na Figura 1.

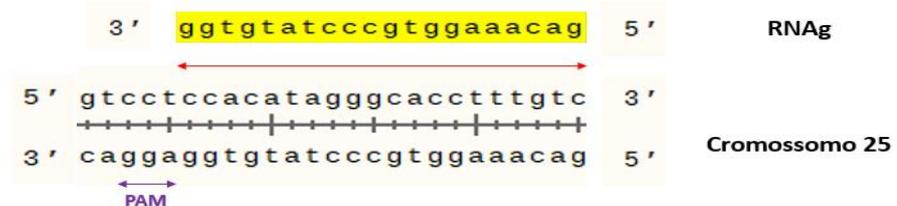
Figura 1 – Localização do alvo da clivagem no cromossomo 25 da espécie *Bos taurus*



Fonte: Autoria própria (2019).

Essa região encontra-se entre os genes *FSCN1* (*Fascin actin-bundling protein* 1) e o gene da beta-actina (*ACTB*), sendo altamente conservada tanto no DNA humano quanto no bovino e no murino. Gao et al. (2017) utilizou essa região para realizar um *knock-in* no genoma bovino, mediado por diferentes variações do sistema CRISPR-Cas. O estudo em questão realizou a inserção, com eficiência e reduzidos *off-targets*, do gene *NRAMP1* (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein* 1) em fibroblastos bovinos, que demonstraram um aumento de sua resistência à tuberculose. Através desses dados, foi definido o RNAg para clivagem do DNA do presente estudo, visto na Figura 2.

Figura 2 – RNAg alinhado ao local de clivagem no genoma bovino



Fonte: Autoria própria (2020).

A escolha do RNAg baseou-se nos resultados de Gao (2017), os quais definiram a eficiência de clivagem e os efeitos *off-target* de diferentes alvos para clivagem na região da Figura 1, elegendo o RNAg visto na Figura 2, que corresponde as posições 38791496 até 28791515 (20pb) do cromossomo 25 da espécie *Bos taurus*, como o mais seguro e eficiente dentre os analisados.

VETOR MOLECULAR

O plasmídeo pX330 spCas9-mSA, foi definido como vetor molecular para a entrega do material genético necessário para a clivagem do DNA bovino na posição desejada. O plasmídeo escolhido conta com a estrutura para expressão da enzima *Cas9* e da parte estrutural do RNAg, responsável por se acoplar à enzima, havendo necessidade de inserção da sequência do RNAg que determinará o alvo da clivagem, utilizando a endonuclease *BbsI*.

Por conta disso, para amplificar a região do genoma bovino correspondente ao RNAg de modo a possibilitar sua ligação ao plasmídeo na posição adequada, foi necessário desenvolver extremidades adaptadoras para inserir o sítio de restrição da enzima *BbsI*.

A amplificação da sequência com as extremidades adaptadoras permite sua ligação ao plasmídeo através de processo de digestão utilizando a enzima de restrição e posterior junção das sequências utilizando a enzima DNA ligase. Essa ligação ocorre entre uma região promotora e a parte estrutural do RNAg, fazendo com que a sequência amplificada se torne a parte do RNAg que indica o local de clivagem.

SEQUÊNCIA-ALVO DO RNA GUIA NO GENOMA VIRAL

Os genes essenciais e não essenciais para a replicação do BoHV-1 foram definidos por Robinson et al. (2008) usando um sistema de inserção mutagênica

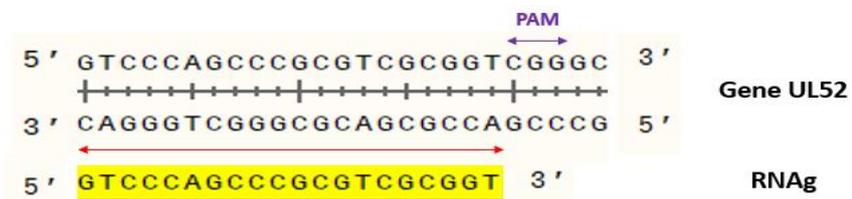
aleatória para avaliação do efeito da interrupção de cada gene. Os resultados mostraram que clones mutantes que possuíam a interrupção de certos genes apresentavam total incapacidade de replicação, tendo seu genoma não detectado em células controladamente infectadas pelos mesmos. Dentre esses genes, o denominado UL52 foi o escolhido como alvo do sistema de combate ao BoHV-1.

O gene UL52 corresponde a uma subunidade do complexo enzimático helicase-primase presente em diferentes vírus da mesma família do BoHV-1. Este complexo enzimático está diretamente ligado ao processo de replicação viral nas células, o que caracteriza a definição do UL52 como gene essencial (COLLOT et al., 2016). No genoma do BoHV-1 (GenBank ID: 4781) essa região corresponde a uma sequência de 5589pb localizada entre as posições 1649 e 7237 pb.

Utilizando a ferramenta para design de RNAg (ATUM) foram elencados diferentes alvos para clivagem na região do gene UL52. Considerando os potenciais efeitos de clivagens *off-target* no genoma bovino pelo próprio mecanismo de combate ao BoHV-1 e a posição da clivagem no gene viral, a sequência-alvo do mecanismo de combate foi definida (Figura 3).

A sequência definida corresponde à posição 2168 na sequência do gene UL52, sendo assim, sua utilização como RNAg promove a clivagem em uma posição considerada essencial do genoma viral. Utilizando a ferramenta BLASTn, a sequência da Figura 3 não demonstrou possuir um correspondente homólogo exato no genoma bovino, minimizando possíveis clivagens no genoma da própria célula portadora do sistema de combate ao BoHV-1.

Figura 3 – RNAg alinhado ao local de clivagem no genoma viral

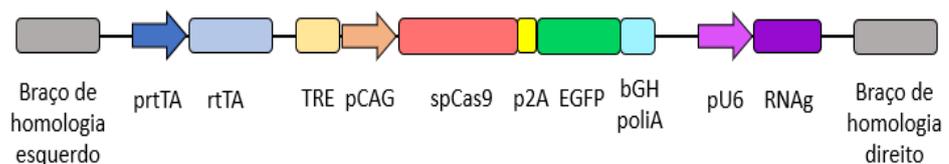


Fonte: Autoria própria (2020).

FRAGMENTO PARA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

A Figura 4 representa a disposição dos elementos do sistema de combate ao BoHV-1 no fragmento que servirá de molde para a realização do *knock-in* por recombinação homóloga.

Figura 4 – Mapa do fragmento molde para recombinação homóloga.



Fonte: Autoria própria (2020).

A montagem do fragmento deu-se através da junção de sequências obtidas em diferentes plasmídeos com o RNAg para clivagem do genoma viral e as regiões de homologia com o genoma bovino. Os braços de homologia foram obtidos na plataforma GenBank, a partir do genoma completo da espécie *Bos taurus*. A eficiência da inserção da sequência desejada no genoma está intrinsicamente ligada as regiões dos braços de homologia, pois estes são responsáveis pelo reconhecimento da sequência molde como parte do genoma, induzindo, dessa maneira, o mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga (HE; LI; FENG, 2018).

O sistema de ativação de expressão por tetraciclina baseia-se na expressão constitutiva de uma proteína (rtTA) capaz de se ligar a sequência do elemento de resposta à tetraciclina (TRE) e, através disso, promover a expressão do gene localizado após a sequência TRE. No entanto, a capacidade de ligação da rtTA depende diretamente da presença da tetraciclina ou seus derivados, substâncias pelas quais a proteína apresenta alta afinidade (BORTESI et al., 2012; WEYLER; MORSCHHÄUSER, 2012). Sendo assim, na ausência desses antibióticos, o TRE não será estimulado por ligação, impedindo a expressão da *Cas9*, agindo como um mecanismo de controle da expressão.

O gene da *Cas9* encontra-se ligado ao gene de uma proteína verde fluorescente (EGFP) que será utilizada como indicador de expressão. Esses genes encontram-se separados por uma sequência de autoclivagem (p2A), a qual promove a geração de duas proteínas, correspondentes a cada gene, a partir de um único RNA mensageiro gerado pela transcrição do fragmento. Este segmento é finalizado pela sequência bGHpoliA, elemento que permite a estabilização e tradução do RNA mensageiro.

Além disso, o fragmento também conta com um promotor de expressão constitutiva (pU6) seguido do RNAg para clivagem do genoma viral. A constante expressão do RNAg não implica em um risco de clivagens *off-target*, uma vez que não haverá a presença constante da enzima *Cas9*.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento *in silico* do vetor molecular e do fragmento molde para recombinação homóloga é de grande relevância aos estudos de biologia molecular no que diz respeito a novas aplicações da ferramenta CRISPR-*Cas9*. A utilização prática dos elementos desenvolvidos poderá comprovar a funcionalidade da inserção do mecanismo nas células bovinas e sua eficácia para eliminar a presença do BoHV-1.

Além disso, o tipo de sistema proposto no trabalho abre espaço para ampla exploração da geração sistemas utilizando a *Cas9* para combate de doenças virais, haja visto que o alvo do RNAg pode ser alterado de maneira simples, mantendo o restante dos elementos do sistema.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Bin Gu da *Michigan State University* (MSU) pela doação dos plasmídeos utilizados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

ABDISALAAM, S. et al. Dysfunctional telomeres trigger cellular senescence mediated by cyclic GMP-AMP synthase. **The Journal of biological chemistry**, v.295, p. 1144-1160, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012962>. Acesso em: 20 ago. 2020

ALVES, S. V. P. et al. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 135–140, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.020>. Acesso em: 12 ago. 2020.

BORTESI, L. et al. Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells. **BMC Biotechnology**, v. 12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-40>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CHANG, P. et al. Application of HDR-CRISPR/Cas9 and erythrocyte binding for rapid generation of recombinant turkey herpesvirus-vectored avian influenza virus vaccines. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines7040192>. Acesso em: 28 ago. 2020.

COLLOT, M. et al. High conservation of herpes simplex virus UL5/UL52 helicase-primase complex in the era of new antiviral therapies. **Antiviral Research**, v. 128, p. 1–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.01.015>. Acesso em: 27 ago. 2020.

COSTA, E. P. DA et al. BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 254–263, 2017. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p254-263%20\(RB649\)](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p254-263%20(RB649)). Acesso em: 20 jul. 2020.

GAO, Y. et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>. Acesso em: 12 ago. 2020.

GOSSEN, M.; BUJARD, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5547–5551, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>. Acesso em: 12 ago. 2020.

GU, B.; POSFAI, E.; ROSSANT, J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 632–637, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4166>. Acesso em: 10 ago.

HE, X.; LI, Y. X.; FENG, B. New Turns for High Efficiency Knock-In of Large DNA in Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9465028>. Acesso em: 27 jun. 2020.

JONES, C.; SINANI, D. Regulation of the latency – reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. **Journal of Neurovirology**, v. 1, p. 535–545, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0060-3>. Acesso em: 27 jun. 2020.

KOUJAH, L.; SHUKLA, D.; NAQVI, A. R. CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, n. January, p. 0–1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.004>. Acesso em: 10 ago. 2020.

LEVINGS, R. L.; ROTH, J. A. Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252313000042>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MARIN, M. et al. Distinctive features of bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 and the virus-host interactions that might influence clinical outcomes. **Archives of Virology**, Springer Vienna, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04494-5>. Acesso em: 2 set. 2020.

MELO, C.; RAMOS, A.; LEITE, R. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 122–127, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10229>. Acesso em: 27 jun. 2020.

PLATT, R. J. et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 440–455, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>. Acesso em: 28 ago. 2020.

ROBINSON, K. E. et al. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2851–2863, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002501-0>. Acesso em: 28 ago. 2020.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203, 2004. Disponível em: <http://uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2054>. Acesso em: 10 jul. 2020.

WEYLER, M.; MORSCHHÄUSER, J. Tetracycline-inducible gene expression in *Candida albicans*. **Methods in Molecular Biology**, v. 845, n. 8, p. 201–210, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_13. Acesso em: 28 ago. 2020.

ZHAO, X.; XI, J. The vaccines for Bovine Herpesvirus Type 1: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 50-54, 2011. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/95879>. Acesso em: 27 jun. 2020