

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular

**CONSTRUÇÃO DE BACULOVÍRUS
RECOMBINANTES CONTENDO O
GENE DA PRÉ-PRÓ-RENINA
HUMANA**

Dulcyane Neiva Mendes

Brasília, DF
2006



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Mestrado em Patologia Molecular

Construção de baculovírus recombinantes contendo o gene da pré-pró-renina humana

Dulcyane Neiva Mendes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, DF

2006

Trabalho realizado no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Luiz Alberto Simeoni e co-orientação da Dra. Marlinda Lobo de Souza, com suporte financeiro da EMBRAPA/CAPES-UnB.

Banca Examinadora

Formaram parte da Banca:

- Dr. Luiz Alberto Simeoni (orientador)
Universidade de Brasília - UnB

- Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Universidade de Brasília – UnB

- Dra. Maria Elita Batista de Castro
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN

Suplente:

- Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Universidade de Brasília - UnB

Aprovada em 21 de dezembro de 2006.

A Deus e à minha família, em especial,
aos meus pais, Derly e Mendes.
Com todo amor!!!

“Qualquer substância pode ser um veneno.
A diferença entre o veneno e o remédio é tão somente a dose.”
(Paracelsus 1493-1501)

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudo durante parte da realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular pela oportunidade de realização do curso.

À Dra. Marlinda que foi minha maior incentivadora para a realização deste trabalho cedendo seu laboratório para a prática dos procedimentos aqui citados e a responsável pela minha dedicação à área de pesquisa, me fazendo fugir da minha formação clínica desde a graduação.

Ao professor Luiz Simeoni por me aceitar como sua aluna de mestrado e por me puxar sempre para as atividades do Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB.

Ao professor Francisco por sugerir e ceder o gene da pré-pró-renina para expressão da renina em sistema baculovírus.

À Dra. Elita Castro pela cooperação na realização deste trabalho e relevantes informações.

Ao professor Bergmann pelas relevantes sugestões, paciência e apoio com as fotos de microscopia eletrônica.

Aos professores da Pós-Graduação que me auxiliaram nas matérias realizadas e por todo o conhecimento transmitido.

Ao William pelos preciosos conselhos de bancada e por toda ajuda nos procedimentos, à Raimundinha pela ajuda por detrás dos bastidores, à Zildinha que por muitas vezes me cedeu suas células e aos companheiros de laboratório (Briana, Neiva, Syomara, Filipe, Daya, Geraldo, Ayeska, Babi, Lorena) pela amizade, apoio e pelas risadas.

À Alessandra Menezes, doutoranda do Laboratório de Farmacologia Molecular, por ceder prontamente os materiais referentes à renina para a realização deste trabalho e por compartilhar conhecimentos, dúvidas e respostas sobre a renina e todo o processo envolvido.

À Rosana Falcão (CENARGEN) e ao Bruno Arrivabene (UnB) por me auxiliarem na preparação das amostras a serem analisadas em microscópio eletrônico.

À equipe de Urologia do HRAN (Dr. Ricardo Monteiro), pelo auxílio na solução de uma etapa de fundamental importância dos experimentos.

Aos meus amigos (Dânnia, Dayanne, Fernanda, Lorena, Mari, Mary, Cadu, Cíntia,...) e primos (Lidiane, Wendel, Daviane, Evelyse,...) que sempre me ajudaram a manter a mente saudável para poder enfrentar as lutas da bancada.

Ao meu namorado Jônatas pelo apoio, carinho, interesse, amizade, incentivo e amor.

Aos meus pais Derly e Mendes, que sempre acreditaram em mim, pelo amor, compreensão, dedicação e “paitrocínio” durante não só este período mas, por toda uma vida; à minha irmã Caroline pelo incentivo e por me ajudar a “encontrar” amostra de rim para uso como controle positivo no *western blotting* e *dot blot*; e à minha família de um modo geral pelo apoio incondicional.

A Deus pela vida, pela proteção em todos os momentos e por permitir que eu atingisse mais este ideal.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na pesquisa, elaboração e realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!

Sumário

Lista de ilustrações.....	xiii
Lista de símbolos e abreviaturas.....	xvi
Resumo.....	xix
Abstract.....	xxi
Introdução.....	01
I Baculovírus.....	01
I.1 Áreas de aplicação.....	01
I.2 Taxonomia, características gerais e estrutura.....	02
I.3 Ciclo de infecção.....	05
I.4 Cultura de células.....	08
II Baculovírus como vetor de expressão gênica.....	10
II.1 Sistema de expressão baculovírus.....	10
II.2 Glicosilação.....	13
II.3 Sistema vSyn VIgal de expressão (recombinação homóloga).....	14
II.4 Sistema Bac-to-Bac de expressão (recombinação sítio-específica).....	16
III Renina.....	19
III.1 Características gerais e estrutura.....	19
III.2 Cascata renina-angiotensina-aldosterona.....	21
III.3 SRA: Hipertensão Arterial e Sistema Cardiovascular e Renal.....	23
III.4 Importância.....	23
Objetivos.....	24
Justificativa.....	25
Estratégias.....	26
Materiais.....	28
1. Vírus.....	28
2. Linhagens celulares de insetos.....	28

3. Insetos.....	28
4. Bactérias.....	29
5. Plasmídeos.....	29
5.1 Plasmídeo pRHR1100.....	29
5.2 Plasmídeo pBluescript (pBS).....	30
5.3 Plasmídeo de transferência pSynXIV VI ⁺ X3 (pSyn).....	30
5.4 Plasmídeo pFastBac HTc (HTc).....	32
6. Oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>).....	33
7. Anticorpos.....	33
8. Reagentes.....	34
9. Soluções.....	34
10. Tampões.....	36
11. Meios de cultura.....	37
11.1 Meio de cultura de células de inseto.....	37
11.2 Meio de cultura para bactéria – LB.....	38
Metodologia.....	39
Métodos gerais.....	39
1. Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	39
2. Eletroforese em gel de agarose.....	39
3. Recuperação de bandas isoladas em gel de agarose.....	39
4. Preparação de células competentes XL-1 blue.....	40
5. Transformação de células competentes XL-1 blue.....	40
6. Transformação de células competentes DH10Bac.....	41
7. Isolamento de plasmídeos por fervura (“miniprep”).....	41
8. Isolamento de DNA de bacmídeo recombinante.....	42
9. Amplificação de plasmídeos.....	42
10. Purificação do DNA plasmideal por lise alcalina (maxiprep).....	42
11. Rotina de manutenção de células de inseto.....	43
12. Co-transfecção.....	43
13. Microextração rápida de DNA viral a partir de células.....	44
14. PCR.....	45
15. Gel desnaturante de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE).....	46
16. Cinética da síntese de proteínas.....	47

17. Autoradiograma da cinética da síntese de proteínas.....	48
18. Transferência do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose (<i>Western</i>)..	48
19. Ensaio imunogênico <i>Western Blotting</i>	49
20. Ensaio imunogênico <i>Dot blot</i>	50
21. Isolamento de clones virais por <i>plaque assay</i>	51
22. Amplificação viral.....	51
23. Infecção de lagartas com os vírus recombinantes através de injeção intra-hemocélica.....	52
24. Infecção de lagartas com o vírus recombinante vRen através de ingestão oral.....	52
25. Preparação de células para microscopia eletrônica.....	53
26. Preparação de poliedros para microscopia eletrônica.....	53
27. Processamento de amostras para análise em microscópio eletrônico.....	53
Métodos Específicos.....	54
1. Purificação do gene da pré-pró-renina.....	54
1.1 Confirmação do plasmídeo pRHR1100	54
1.2 Amplificação e purificação do plasmídeo pRHR1100.....	54
1.3 Retirada do gene da pré-pró-renina do pRHR1100.....	54
1.4 Purificação do gene da pré-pró-renina.....	54
2. Amplificação do gene da pré-pró-renina após clonagem em pBluescript.....	54
2.1 Clonagem da pré-pró-renina em pBluescript.....	54
2.2 Amplificação, purificação e seqüenciamento do plasmídeo pBSRen.....	55
3. Construção de vírus recombinantes por recombinação homóloga com vírus vSyn VI ⁻ gal.....	55
3.1 Purificação da pré-pró-renina para inserção no sistema de expressão vSyn VI ⁻ gal.....	55
3.2 Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSynXIV VI ⁺ X3.....	55
3.3 Amplificação e purificação do plasmídeo pSynRen.....	55
3.4 Co-transfecção do plasmídeo pSynRen com o DNA do vírus vSyn VI gal para produção do vírus recombinante em células de insetos.....	56
3.5 Infecção celular com o vírus recombinante vRen (P0) em placa de 6 poços.....	56
3.6 Amplificação do vírus recombinante vRen (P1) em frasco T-25.....	56

4. Construção de vírus recombinante utilizando sistema baculovírus Bac-to-Bac.....	57
4.1 Purificação da pré-pró-renina para inserção no pFastBac HTc.....	57
4.2 Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pFastBac HTc.....	57
4.3 Transformação do HTcRen em células DH10Bac e purificação do bacmídeo recombinante - BacRen.....	57
4.4 Transfecção do BacRen em células de insetos para produção do vírus recombinante (vRenbac).....	58
4.5 Infecção celular com o vírus recombinante vRenbac (P0) em placa de 6 poços.....	58
4.6 Amplificação do vírus recombinante vRenbac (P1) em frasco T-25.....	58
5. Análise e seleção dos vírus recombinantes.....	59
5.1 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE).....	59
5.2 Purificação do DNA dos vírus recombinantes (P2) por micro extração rápida.....	59
5.3 Confirmação da presença do gene da pré-pró-renina por PCR do DNA dos vírus....	59
5.4 Seleção do vírus recombinante vRen por <i>plaque assay</i>	59
Resultados.....	60
1. Confirmação do plasmídeo pRHR1100.....	60
2. Construção do plasmídeo recombinante pBSRen (Clonagem da pré-pró-renina no pBluescript).....	61
3. Construção do plasmídeo recombinante pSynRen (Clonagem da pré-pró-renina no pSyn).....	64
4. Construção do plasmídeo recombinante HTcRen	68
5. Construção do bacmídeo recombinante BacRen (Transformação do HTcRen em DH10Bac).....	70
6. Construção do vírus recombinante ocluso positivo vRen (Recombinação homóloga)	73
7. Construção do vírus recombinante ocluso negativo vRenbac (Transfecção do BacRen).....	76
8. Análise das células por microscopia eletrônica.....	80
9. Detecção de produtos de expressão <i>in vitro</i> (células).....	91
10. Alterações morfológicas após infecção <i>in vivo</i>	98
Discussão.....	104
Conclusão e Considerações Finais.....	109
Referências Bibliográficas.....	110

Lista de ilustrações

Figura 1 - Células de inseto infectadas com baculovírus AcMNPV-L1.....	03
Figura 2 - Ultraestrutura da partícula viral.....	03
Figura 3 - Fenótipos do nucleopoliedrovírus.....	04
Figura 4 - Esquema da infecção por baculovírus via oral.....	06
Figura 5 - Ciclo de infecção do baculovírus nas células do intestino médio da lagarta.....	07
Figura 6 - Principais passos para a obtenção de baculovírus recombinantes.....	13
Figura 7 - A recombinação homóloga.....	15
Figura 8 - A transposição do gene de interesse para um bacmídeo selvagem.....	17
Figura 9 - Esquema da transposição do gene de interesse para um bacmídeo selvagem.....	18
Figura 10 - Estrutura tridimensional da pró-renina.....	20
Figura 11 - Esquema do sistema renina-angiotensina.....	21
Figura 12 - Plasmídeo pRHR1100.....	29
Figura 13 - Plasmídeo pBS e seu Múltiplo Sítio de Clonagem (MCS).....	30
Figura 14 - Plasmídeo pSynXIV VI ⁺ X3 e em detalhe os sítios de clonagem.....	31
Figura 15 - Plasmídeo pFastBac HTc.....	32
Figura 16 - Múltiplo sítio de clonagem do pFastBac HTc.....	33
Figura 17 - Confirmação do plasmídeo pRHR1100.....	60
Figura 18 - Confirmação da linearização do pBS e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pRHR1100.....	62
Figura 19 - Plasmídeo recombinante pBSRen.....	63
Figura 20 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pBS.....	63
Figura 21 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pBS.....	64
Figura 22 - Confirmação da abertura do pSyn e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen.....	66
Figura 23 - Plasmídeo recombinante pSynRen.....	66
Figura 24 - Clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn.....	67
Figura 25 - Confirmação da clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo pSyn.....	67
Figura 26 - Confirmação da abertura do pFastBac HTc e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen.....	69
Figura 27 - Plasmídeo recombinante HTcRen.....	69

Figura 28 - Confirmação da clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo HTc.....	70
Figura 29 - Placas de meio onde foram inoculadas as transformações em DH10Bac para seleção do BacRen.....	71
Figura 30 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo através da PCR com <i>primers</i> específicos da renina.....	72
Figura 31 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo através da PCR com os <i>primers</i> M13.....	72
Figura 32 - Análise morfológica de células Sf21, 72 h após o ensaio, por microscopia ótica.....	75
Figura 33 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus recombinante vRen..	76
Figura 34 - Análise morfológica de células Sf21, 72 h após o ensaio, por microscopia ótica.....	77
Figura 35 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus recombinante vRenbac.....	78
Figura 36 - Sítio de transposição do bacmídeo.....	79
Figura 37 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo recombinante (BacRen) por transposição.....	79
Figura 38 - Células High five controle (aumento de 10.000x).....	81
Figura 39 - Células High five infectadas com vRen (aumento de 4.000x).....	81
Figura 40 - Células High five infectadas com vRen (aumento de 5.000x).....	82
Figura 41 - Células High five infectadas com vRen (aumento de 15.000x).....	82
Figura 42 - Células High five infectadas com vRen (aumento de 25.000x).....	83
Figura 43 - Células High five infectadas com vRen (aumento de 60.000x).....	83
Figura 44 - Células High five infectadas com vRenbac (aumento de 20.000x).....	84
Figura 45 - Células High five infectadas com vRenbac (aumento de 50.000x).....	84
Figura 46 - Células High five infectadas com vRenbac (aumento de 80.000x).....	85
Figura 47 - Células Sf21 controle (aumento de 6.000x).....	85
Figura 48 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 12.000x).....	86
Figura 49 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 20.000x).....	86
Figura 50 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 25.000x).....	87
Figura 51 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 50.000x).....	87
Figura 52 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 5.000x).....	88
Figura 53 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 15.000x).....	88
Figura 54 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 15.000x).....	89
Figura 55 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 30.000x).....	89

Figura 56 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 50.000x).....	90
Figura 57 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 80.000x).....	90
Figura 58 - Análise do perfil de proteínas de células Sf21 sadias e infectadas com vírus 72 hp.i.....	91
Figura 59 - Cinética da síntese de proteínas em células High five infectadas com vRen.....	92
Figura 60 - Membrana de nitrocelulose onde foi feito <i>dot blot</i> das amostras recombinantes com vRen em células Sf21.....	94
Figura 61 - Membrana de nitrocelulose onde foi feito <i>dot blot</i> das amostras recombinantes com vRen em células High five.....	94
Figura 62 - Análise do perfil de proteínas de células Sf21 sadias e infectadas com vírus 72 hp.i.....	95
Figura 63 - Cinética da síntese de proteínas em células Sf21 infectadas com vRenbac.....	96
Figura 64 - Membrana de nitrocelulose onde foi realizado o <i>dot blot</i> das amostras recombinantes com vRenbac em células Sf21.....	97
Figura 65 - Membrana de nitrocelulose onde foi realizado o <i>dot blot</i> das amostras recombinantes com vRenbac em células High five.....	97
Figura 66 - Proporção de lagartas mortas e vivas quando infectadas com o vírus vRen por diferentes vias.....	99
Figura 67 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> injetadas com vírus vRen x sem sinal de infecção.....	99
Figura 68 - Lagartas não infectadas e infectadas com vírus AcMNPV ou vRen.....	100
Figura 69 - Proporção de lagartas mortas e vivas quando infectadas com o vírus vRenbac para as duas espécies.....	101
Figura 70 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> injetadas com vRenbac x sem sinal de infecção.....	101
Figura 71 - Lagartas infectadas com vírus vRenbac.....	102
Figura 72 - Gráfico comparativo de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> injetadas com vRen ou vRenbac infectadas x sem sinal de infecção.....	103
Figura 73 - Gráfico comparativo entre lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> injetadas com vRen ou injetadas com vRenbac.....	103

Lista de símbolos e abreviaturas

<i>AcMNPV</i>	- <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
<i>AgMNPV</i>	- <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AI	- Angiotensina I
AII	- Angiotensina II
Amp ⁺	- Adição de ampicilina
AT1	- Receptores do tipo 1 de angiotensina II
AT2	- Receptores do tipo 2 de angiotensina II
A _{660m}	- Absorbância a 660 m
B.O.D.	- Demanda bioquímica de oxigênio
BSA	- Albumina sérica bovina
BV	- Vírus brotado = <i>budded virus</i>
cDNA	- DNA complementar
Ci	- Curie
dH ₂ O	- Água destilada
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
ECV	- Vírus extracelular
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ex.	- Exemplo
g	- Grama
g	- Velocidade de sedimentação em Unidade Gravitacional
Gal	- Galactose
Genta	- Gentamicina
GlcNAc	- N-acetilglicosamina
GV	- <i>Granulovirus</i> (gênero da família <i>Baculoviridae</i>)
h	- Hora(s)
hp.i.	- Hora(s) pós-infecção
IPTG	- Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
iREN	- Inibidores da renina
JG	- Justaglomerulares

Kan	- Kanamicina
Kb	- Kilobase = 1000 pares de bases
kDa	- KiloDaltons
L	- Litro
LB	- Meio de cultura Luria-Bertani
M	- Molar
MCS	- Múltiplo sítio de clonagem (<i>Multiple Cloning Site</i>)
µg	- Micrograma = 10^{-6} grama
mg	- Miligrama = 10^{-3} grama
min.	- Minuto(s)
µL	- Microlitro = 10^{-6} litro
mL	- Mililitro = 10^{-3} litro
mM	- Milimolar
MOI	- Multiplicidade de infecção
ng	- Nanograma = 10^{-9} gramas
nm	- Nanômetro
NPV	- <i>Nucleopolyhedrovirus</i> (gênero da família <i>Baculoviridae</i>)
NP-40	- Nonidet-P40
Obs	- Observação
ODV	- Vírus derivados de poliedros ou vírus oclusos (<i>occluded derived virus</i>)
pb	- Pares de base
pBS	- pBluescript
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	- Potencial de hidrogênio
PIB	- Corpo de oclusão poliédrico (<i>polyhedral inclusion bodies</i>)
P _{polh}	- Promotor da poliedrina
q.s.p.	- Quantidade suficiente para (completar solução)
RIPA	- <i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
RNA	- Ácido ribonucléico
RNase	- Ribonuclease
rpm	- Rotações por minuto
s.	- Segundo(s)
SDS	- Dodecilsulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)

SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS
SRA	- Sistema renina-angiotensina
S-RAA	- Sistema renina-angiotensina-aldosterona
Taq polimerase	- Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> (bactéria termófila)
TBS-T	- Solução salina de Tris com Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TE	- Tampão Tris-EDTA
TEMED	- N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
Tetra	- Tetraciclina
T _m	- Temperatura média de desnaturação
Tris	- Tris(hidroximetil)aminometano
U	- Unidade enzimática
UV	- Ultravioleta
V	- Volts
x-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
°C	- Graus Celsius
~	- Aproximadamente

Resumo

Baculovírus são vírus de insetos que têm sido utilizados como bioinseticidas para controle de pragas agrícolas, bem como importante ferramenta em Biotecnologia como vetor de expressão gênica. O sistema de expressão utilizando baculovírus em células de insetos fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas. A renina humana, uma proteína produzida principalmente pelos rins e responsável pelo controle da pressão sanguínea e do balanço salino, é a chave principal para o desencadeamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona que culmina no aumento da pressão sanguínea. Neste trabalho é proposta a produção da renina, com base na construção de baculovírus recombinantes, visando o estudo mais aprofundado tanto de suas propriedades quanto de inibidores que possam ser empregados na indústria farmacêutica.

Inicialmente dois baculovírus recombinantes contendo o gene da pré-pró-renina humana foram construídos. No sistema vSyn VIgal o fragmento da pré-pró-renina (~1,4 Kb) foi inserido no vetor de expressão pSynXIV VI⁺X3 e por recombinação homóloga com DNA viral levou a formação de vírus recombinante ocluso positivo. No sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) o fragmento da pré-pró-renina foi inserido em bacmídeo, por transposição, e levou a formação de vírus recombinante ocluso negativo. A presença do gene da pré-pró-renina nos vírus recombinantes foi confirmada após amplificação do gene por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* específicos da pró-renina. Para identificação das proteínas virais produzidas durante a infecção foi feita cinética da síntese de proteínas por marcação radioativa (³⁵S-metionina), em células de inseto High five e Sf21, em diferentes tempos pós-infecção (0, 24, 48 e 72 h). Na fase muito tardia da infecção foi observada a síntese de duas proteínas de cerca de 40 kDa e 47 kDa, que correspondem ao peso molecular esperado para a pró-renina e a renina, ou formas glicosiladas da mesma. Como esperado, a análise das proteínas por ensaio imunológico, utilizando anticorpo policlonal contra a renina, mostrou sinal de hibridização nas amostras das células infectadas com os vírus recombinantes contendo o gene da pré-pró-renina (Sf21 e High five). Embora nas células High five não infectadas (*mock infected*) não tenha havido marcação com o anticorpo, foi, entretanto, detectado sinal de hibridização não esperado em células Sf21 não infectadas (*mock infected*), o que deve ser devido à hibridização inespecífica.

A análise ultraestrutural das células infectadas com vírus recombinante revelou que houve indução de efeitos citopáticos típicos por infecção com baculovírus. Entretanto, no vírus

recombinante ocluso positivo parece não ter havido a correta inclusão dos vírions na matriz protéica resultando na formação de poliedros com pouco ou nenhum vírion em seu interior. Finalmente, larvas de *Anticarsia gemmatalis* e de *Spodoptera frugiperda* foram infectadas para investigar as alterações morfológicas causadas pelos vírus. Sinais claros de que houve mudanças na fisiologia larval foram observados quando, além dos sintomas da doença, a lagarta infectada apresentou mudança de coloração do tegumento para cor rosa. Essa coloração não é observada na lagarta infectada com o vírus selvagem AcMNPV.

As alterações ultraestruturais apresentadas pelas células e as mudanças na coloração da cutícula das larvas infectadas mostram que está havendo diferença na expressão protéica entre o vírus selvagem e os vírus recombinantes. Os resultados obtidos até o momento indicam ter havido a expressão de uma proteína com peso molecular esperado para a renina e que estaria interferindo, de alguma forma, no processo de oclusão da partícula viral bem como na fisiologia do inseto.

Abstract

Baculovirus are insect viruses being used as bioinsecticides for agricultural pest control as well as an important tool in Biotechnology as gene expression vector. The baculovirus expression system in insect cells gives an appropriate environment for eukaryotic proteins synthesis. The human renin is a protein produced mainly in the kidney and responsible for blood pressure and salt balance controls and is the principal key to the role of renin-angiotensin-aldosterone system that culminates in the blood pressure rise. In this work the renin production is proposed, based on the construction of recombinant baculoviruses, aiming the studies development of the protein properties as well as the inhibitors that may be used in the pharmaceutical industry.

Initially, two recombinant baculoviruses containing the preprorenin gene were constructed. In the vSyn VIgal system the preprorenin fragment (~1.4 Kb) was inserted in the pSynXIV VI⁺X3 vector, homologous recombined with the viral DNA, leading to an occluded virus assembly. In the Bac-to-Bac system (Invitrogen) the preprorenin fragment was inserted in the bacmid, by transposition, leading to a negative occluded virus assembly. The presence of the preprorenin gene in the recombinant viruses was confirmed by its amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with specific primers for prorenin. For identification of the viral proteins produced during infection, the kinetics of protein synthesis was done by radioactive labeling (³⁵S-metionin), in High five and Sf21 insect cells, at different times post infection (0, 24, 48 and 72h). In the very late phase of infection the synthesis of two proteins about 40 kDa and 47 kDa was observed. These polypeptides correspond to the molecular weight expected for prorenin and renin, or any of their corresponding glycosilated forms. Protein analysis by immunological assay, using polyclonal antibodies against renin, showed a hybridization signal in infected cells samples with the recombinant viruses containing the preprorenin gene (Sf21 and High five). Although there was no hybridization signal in mock infected High five cells, there was an unexpected signal detected in mock infected Sf21 cells, which could be somehow due to unspecific labeling of the antibody.

Ultrastructural analyses of infected cells showed that there was induction of typical cytopathic effects with baculovirus infection. However, with the occluded recombinant virus it seemed that there was no correct virion inclusion in the protein matrix resulting in polyhedra formation with few or none virions inside. Finally, *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda* larva were infected to further investigate the morphological alterations caused by

the viruses. Clear signs of larval physiology change were observed when in addition to the common symptoms of the disease the infected larvae presented a tegument change to a pinkish color. This color is not observed in larvae infected with the wild type AcMNPV.

The ultrastructural alterations in infected cells and the change in the color cuticle of infected larvae show that there is a protein expression difference between the wild type and the preprorenin recombinant viruses. The data obtained until now indicate that there is a protein being expressed with the expected molecular weight for renin and that it is somehow interfering with the occlusion process of the viral particle as well as with the insect physiology.

Introdução

P A R T E I

Baculovírus

I.1 - Áreas de aplicação

Os efeitos adversos ao Homem e ao meio ambiente decorrentes do emprego de inseticidas químicos de amplo espectro têm levado a uma busca contínua de alternativas, visando implementação de programas de manejo integrado de pragas, nos quais os entomopatógenos têm papel importante por sua ocorrência natural ou sua utilização como inseticidas biológicos (Tanada & Kaya, 1993; Alves, 1998).

Baculovírus são vírus exclusivamente de artrópodos e compreendem o maior e mais estudado grupo de vírus de insetos. Tem sido relatada a ocorrência de baculovírus em mais de 500 espécies de insetos, sendo a maioria da ordem Lepidoptera (Miller, 1997; Possee *et al.*, 1997; Theilmann *et al.*, 2005). Compreendem o único grupo de vírus que sofreu extensivos testes de segurança, provando ser inofensivo à microrganismos, vertebrados e plantas (Payne, 1986; Groner, 1989; Miller, 1997). Sua especificidade e segurança por não infectarem vertebrados, além da facilidade de sua aplicação pelo homem do campo, são vantagens que contribuem para sua utilização como bioinseticida.

O Brasil possui o maior programa mundial de uso de vírus de insetos. Trata-se da utilização do *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), denominado Baculovírus anticarsia, desenvolvido a partir de 1977 pela EMBRAPA-Soja (Londrina- PR) para o controle da lagarta da soja. Ao lado das vantagens ecológicas no uso do vírus, existe uma vantagem econômica de aproximadamente 70% quando comparado ao uso de pesticidas químicos (Moscardi, 1999; Moscardi & Souza, 2002). O vírus vem sendo aplicado em 2 milhões de hectares de soja com demanda atual para 4 milhões de hectares (Szewczk *et al.*, 2006).

Além de bioinseticidas, nas duas últimas décadas, os baculovírus têm sido largamente empregados como vetores de expressão de genes heterólogos, proporcionando um amplo uso na medicina como agentes terapêuticos, profiláticos e para diagnose (Miller, 1988; Luckow & Summers, 1988; Maeda, 1989; King & Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Bonning & Hammock, 1996; Kost, 2000; Kaba *et al.*, 2004). As proteínas expressas nas

células de inseto são, em sua maioria, biologicamente ativas e imunologicamente similares às proteínas naturais.

Os baculovírus podem ainda ser excelentes candidatos à vetores de terapia gênica, devido ao fato de já ter sido demonstrado que eles são capazes de penetrar em células de mamíferos, embora não ocorra a replicação viral. O fato dos baculovírus não produzirem efeitos citopáticos nas células de mamíferos infectadas, aliado a uma alta taxa de produção de proteínas heterólogas, pode ser útil no uso de baculovírus como vetores de terapia gênica (Tani *et al.*, 2003).

I.2 - Taxonomia, características gerais e estrutura

Os baculovírus possuem como principais características o envelopamento de seu capsídeo e um DNA circular, dupla-fita, *supercoiled* contendo entre 80 e 200 Kb. Seu nome é derivado do formato baculiforme (formato de bastão) de seu nucleocapsídeo onde o DNA é empacotado medindo cerca de 30 a 60 nm de largura por 250 a 300 nm de comprimento (Ribeiro *et al.*, 1998; Theilmann *et al.*, 2005).

O baculovírus mais estudado é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), que contém um DNA de aproximadamente 134 Kb. O seqüenciamento do genoma deste vírus revelou um total de 154 ORFs (*open reading frames*) codificantes (Ayres *et al.*, 1994).

A família *Baculoviridae* é dividida em dois gêneros segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, diferenciados pelo tamanho e forma dos seus corpos de oclusão (Fauquet *et al.*, 2005): o *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e o *Granulovirus* (GV). Mais recentemente, foi proposto que os baculovírus podem ser divididos em quatro gêneros baseados na especificidade do hospedeiro: *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) e *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros) (Jehle *et al.*, 2006).

Os baculovírus do gênero NPV, como o nome diz, são vírus que causam o acúmulo, após a infecção, de múltiplas estruturas poliédricas no núcleo das células do inseto (Figura 1). Os poliedros são compostos quase que exclusivamente pela proteína poliedrina, expressa de modo mais abundante na fase tardia da infecção e medem em geral de 0,5 a 15 µm de diâmetro (Figura 2) (Williams & Faulkner, 1997; Braunagel *et al.*, 2003).

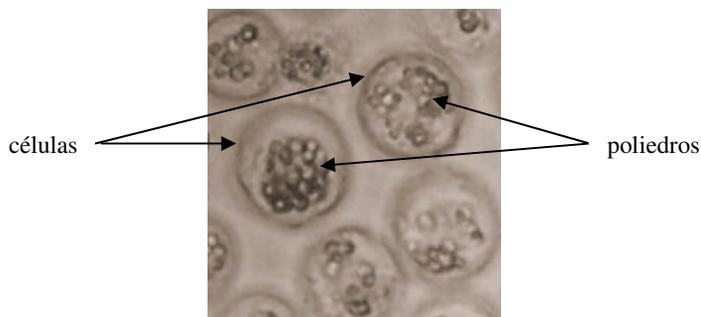


Figura 1 - Células de inseto infectadas com baculovírus AcMNPV-L1. Os baculovírus formam envoltórios protéicos que podem ser observados como estruturas poliédricas dentro das células, os poliedros.

Os GV são caracterizados por possuírem forma cilíndrica e serem menores que os NPV, com aproximadamente 300 nm de diâmetro e 500 nm de comprimento (Federici, 1997; Theilmann *et al.*, 2005).

Os NPV podem conter apenas um nucleocapsídeo por envelope, ou seja, por vírion (*single nucleopolyhedrovirus* - SNPV) ou vários nucleocapsídeos envolvidos por um único envelope (*multiple nucleopolyhedrovirus* - MNPV), enquanto os GV geralmente possuem um, ou raramente dois vírions por grânulo. A principal proteína dos NPV é denominada poliedrina, com peso molecular em torno de 30 kDa, que corresponde a cerca de 95% do seu conteúdo protéico e constitui 20% da proteína total das células de inseto infectadas com baculovírus na fase muito tardia da infecção (Williams & Faulkner, 1997). Assim como a poliedrina, a granulina é o principal componente protéico do grânulo.

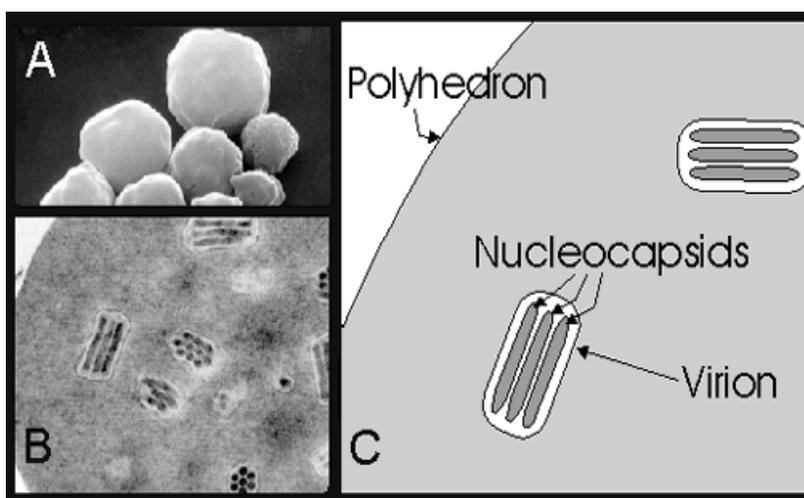


Figura 2 – Ultraestrutura da partícula viral. A) Poliedros vistos por microscopia de varredura; B) Corte transversal de um poliedro visto por microscopia de transmissão; C) Diagrama do corte transversal do poliedro. Micrografia eletrônica (A&B) by Jean Adams, graphic © by V. D'Amico (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/baculoviruses.html>).

Um diferencial dos baculovírus é seu ciclo de vida que se distingue de outros vírus por produzir duas progênes infecciosas com funções diferentes, mas indispensáveis para a sua propagação natural: o vírus extracelular e o vírus ocluso (Figura 3). Apesar de serem diferentes na morfologia do vírion, composição protéica, especificidade do tecido e de desempenharem papéis distintos no ciclo de vida do vírus, as duas formas são genotipicamente idênticas (Blissard & Rohrmann, 1990).

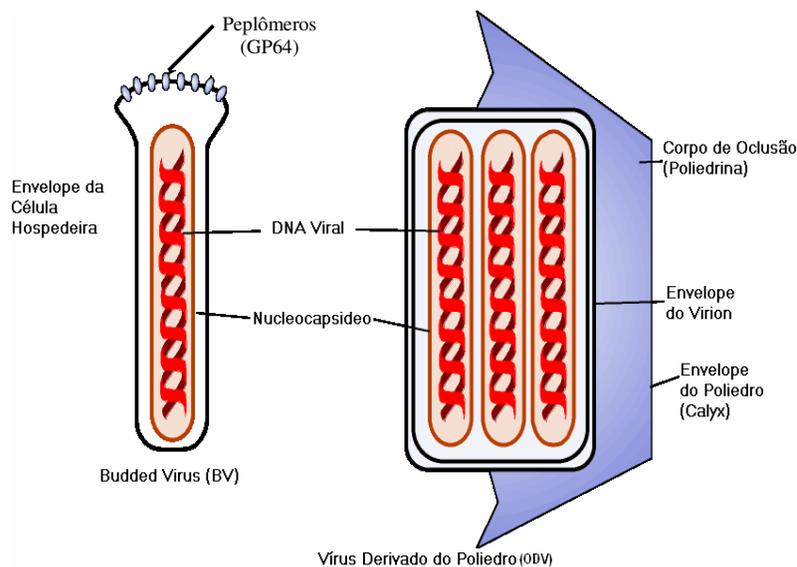


Figura 3 - Fenótipos do nucleopoliedrovírus. Adaptado de Kalmakoff & Ward, 2003.

Quando encontrados na forma extracelular podem ser chamados de vírus extracelulares (*extracellular virus* - ECV) ou vírus brotados (*budded virus* - BV) e são produzidos por volta de 12 a 20 horas (h) após a infecção. Os BV produzidos espalham a infecção à outras células, ou seja, são responsáveis pela infecção sistêmica e por isso podem ser usados na infecção em culturas celulares. Os BV são caracterizados pela presença de nucleocapsídeos simples (DNA e proteínas) envoltos por envelopes frouxos, derivados da membrana plasmática, apresentando projeções de superfície denominadas peplômeros, compostos principalmente pela glicoproteína viral GP64 (Figura 3). A região do peplômero está envolvida nos processos de reconhecimento de membrana durante a adsorção do vírus pela célula (Whitford *et al.*, 1989; Blissard, 1996). A proteína GP64 é essencial para a transmissão da infecção de célula para célula (Monsma *et al.*, 1996).

A montagem do nucleocapsídeo ocorre no núcleo de células infectadas enquanto que a aquisição da membrana (envelope) pode ocorrer por dois processos: síntese *de novo* (Stoltz *et*

al., 1973) dentro do próprio núcleo celular ou brotamento através da membrana plasmática celular.

O vírus ocluso (*occluded derived virus* - ODV) é produzido mais tarde (após 20 h) no núcleo da célula, continuando até a morte celular por volta de 72 h após a infecção. O vírus ocluso é resultante da incrustação de vírions envelopados em uma matriz protéica composta basicamente pela poliedrina. É responsável pela transmissão horizontal, ou seja, de inseto a inseto, sendo usado assim para a infecção de larvas.

Os dois fenótipos virais (Figura 3) também diferem no mecanismo de entrada. Os BV entram via endocitose adsorptiva que envolve vários passos – o vírion se liga ao receptor da célula hospedeira, ocorre a invaginação da membrana plasmática do hospedeiro, formação de uma vesícula endocítica contendo o vírion envelopado, acidificação do endossomo, ativação da proteína de fusão do envelope viral, fusão da membrana viral e endossomal e liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (Volkman & Goldsmith, 1985; Charlton & Volkman, 1993; Blissard, 1996). Estudos detalhados feitos por Long *et al.* (2006), sugerem que os BV utilizam o processo de endocitose mediado por clatrina para entrar nas células. Os ODV interagem diretamente com receptores da membrana plasmática na superfície celular, ou seja, ocorre fusão de membrana mediada por receptores específicos (Granados & Lawler, 1981; Horton & Burand, 1993).

Durante a infecção de células de inseto por baculovírus, um dos mecanismos de defesa da célula é o suicídio celular programado que é denominado apoptose. Entretanto, o vírus possui mecanismos para evitar o processo de apoptose da célula hospedeira pela expressão de genes (*p35* e *iap*) capazes de codificar proteínas que bloqueiam direta ou indiretamente a apoptose, fazendo com que a infecção prossiga normalmente (Crook *et al.*, 1993; Duckett *et al.*, 1996; Clem, 1997).

I.3 - Ciclo de infecção

A principal rota natural de infecção é por meio da ingestão de partículas ODV pelo inseto susceptível juntamente com seu alimento (folha). Essas partículas são bastante estáveis e podem permanecer durante anos no ambiente sem perder a atividade (Volkman & Keddie, 1990). A matriz protéica do cristal (poliedrina) protege os vírions contra inativação no meio ambiente devido à desidratação e aos raios ultra-violeta e, dessa forma, assegurando a liberação dos vírions no sítio primário de infecção (Figura 4).

O ambiente altamente alcalino (pH 10,5) do lúmen do intestino médio da larva do inseto e a ação de enzimas proteolíticas dissolvem rapidamente os corpos de oclusão e as partículas

virais (vírions) são liberadas no lúmen digestivo dando início à infecção das células colunares epiteliais do intestino médio, por meio de fusão dos nucleocapsídeos virais com a membrana das microvilosidades (Blissard, 1996).

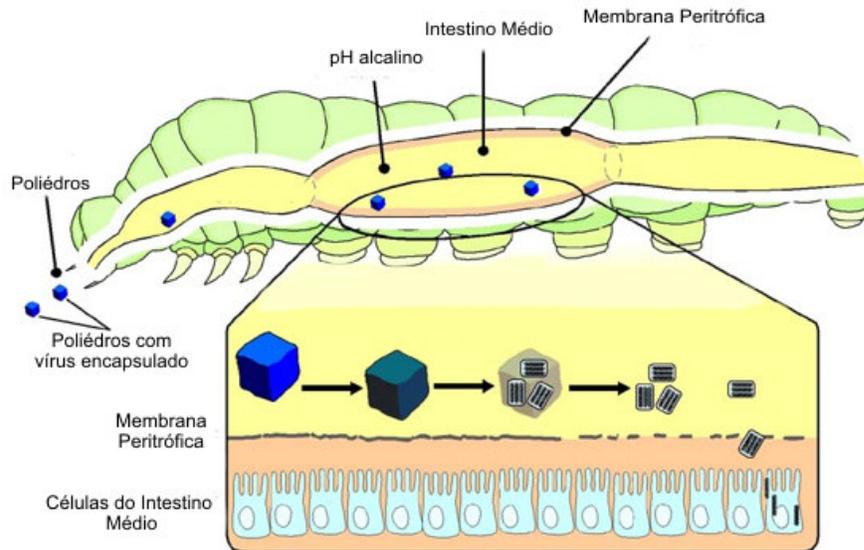


Figura 4 - Esquema da infecção por baculovírus via oral. Adaptado de Kalmakoff & Ward, 2003.

Após a entrada no núcleo o DNA viral é replicado e novos nucleocapsídeos são produzidos em torno de 8 h (Figura 5). Nesta etapa pode ser observada a hipertrofia nuclear e a formação do estroma virogênico. Esses nucleocapsídeos são transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio e eventualmente são liberados para infectar células do sistema traqueal. Estas células atravessam a lâmina basal e podem conduzir vírus tanto para células epidermais da traquéia quanto para a hemolinfa (Engelhard *et al.*, 1994). Em geral, a partir de 12 h pós-infecção (hp.i.), os primeiros nucleocapsídeos atravessam a membrana nuclear e a membrana plasmática levando consigo o envelope. Este último facilita a adsorção do BV à nova célula hospedeira. A infecção em insetos da ordem Lepidoptera geralmente se espalha rapidamente para outros tecidos (infecção secundária).

Algumas proteínas têm sido relacionadas à liberação das partículas virais do corpo do inseto, durante os estágios finais da infecção, por meio da desintegração dos tecidos por proteases, tais como: a quitinase (Hawtin *et al.*, 1995) e a catepsina (Funk *et al.*, 1997). Essas são proteínas tardias que são secretadas pela célula infectada e se acumulam dentro da larva à medida que a infecção prossegue. Elas agem para dissolver os tecidos do inseto e, em particular, a cutícula da larva sendo que após a morte, que ocorre em poucos dias, esta última se rompe liberando corpos de oclusão no meio ambiente.

Sintomas típicos da infecção por NPV incluem: perda de apetite, geotropismo negativo, flacidez e clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células da epiderme e do tecido adiposo.

A infecção das larvas por baculovírus acontece principalmente nos primeiros estágios da larva, período em que as lagartas são mais susceptíveis à infecção viral. A progressão e os sinais da infecção dependem de vários fatores incluindo o *instar* larval em que foi feito, a dose de infecção, a nutrição das larvas, a temperatura do ambiente, o nível de especificidade do vírus com seu hospedeiro e as características físicas das larvas (Federici, 1997).

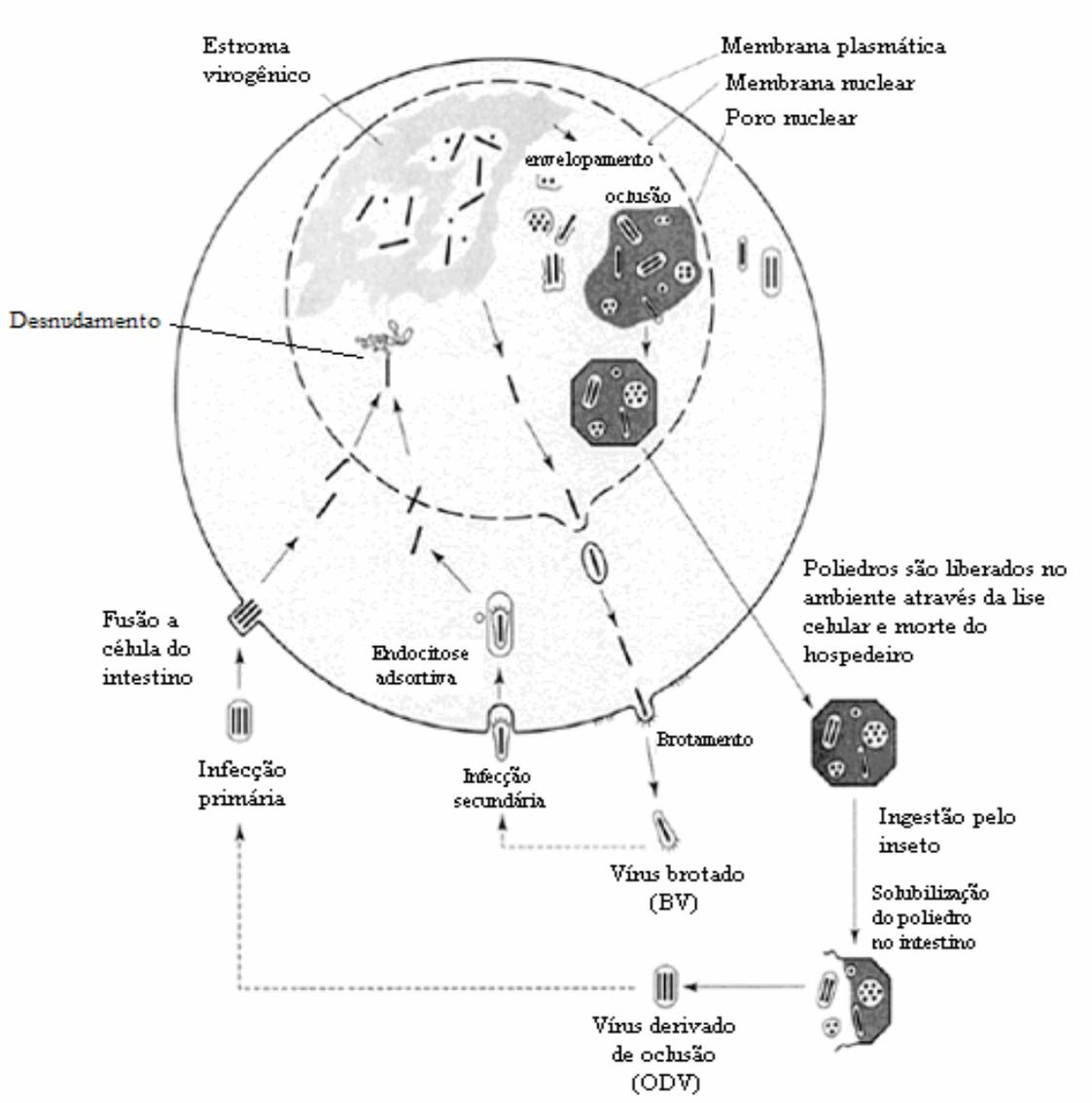


Figura 5 - Ciclo de infecção do baculovírus nas células do intestino médio da lagarta (BioEngineering - Baculovirus Picture Book - Baculovirus infection in pictures by Linda Lua, <www.cheque.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo_picturebook.html>).

I.4 - Cultura de células

O desenvolvimento de metodologias em cultura de células, com o estabelecimento de diferentes linhagens de células de inseto, permitiu o avanço do conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na interação vírus-célula hospedeira e abriu perspectivas para produção *in vitro* de baculovírus.

As linhagens celulares IPBL Sf21 AE e Tn 368 foram inicialmente as mais utilizadas no estudo do vírus AcMNPV. As culturas primárias de células Sf21 foram preparadas a partir de ovários imaturos de pupas originárias do inseto *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho) (Vaughn *et al.*, 1977). As células Tn 368 foram estabelecidas a partir do ovário de adultos de *Trichoplusia ni* (lagarta do repolho) (Hink, 1970). Atualmente as linhagens Sf9, derivada da linhagem Sf21 (Summers & Smith, 1987), e BTI-Tn5B1-4 (Granados *et al.*, 1994) têm sido as mais utilizadas devido ao amplo uso de baculovírus como vetor de expressão gênica.

A regulação da expressão gênica dos NPV pode ser dividida em três fases (O'Reilly *et al.*, 1992):

- Inicial (*early* - reprogramação celular ou fase da síntese de vírus): Uma vez no núcleo da célula o DNA do vírus começa a ser transcrito sendo que os RNAs podem ser detectados 30 minutos (min.) após a infecção (Chisholm & Henner, 1988). Durante esta fase, que precede a replicação do DNA viral (entre 0 e 6 hp.i.), ocorrem rearranjos no citoesqueleto e a cromatina da célula hospedeira se dispersa no núcleo.

- Tardia (*late* - produção de vírus extracelulares): Período em que ocorre replicação do DNA viral, expressão de genes tardios e produção de vírus extracelulares. Compreende o período entre 6 e 20 hp.i. A produção de BV é logarítmica entre 12 e 20 hp.i., decaindo em seguida (Knudson & Harrap, 1976). Nesta fase também é formado o estroma virogênico (estrutura elétron-densa) e ocorre a montagem dos nucleocapsídeos contendo o DNA viral.

- Muito tardia (*very late* - produção de vírus oclusos): Inicia-se cerca de 20 hp.i. Durante esta fase ocorre o processo de oclusão. O promotor do gene de poliedrina é ativado por volta de 18 hp.i. (Montor & Sogayar, 2003). Os vírions são montados no núcleo, envelopados *de novo* por um mecanismo ainda não compreendido e então imersos na matriz de poliedrina do corpo de oclusão. As proteínas P10 e poliedrina são predominantemente sintetizadas até 72 h. Estruturas fibrilares, formadas pela proteína viral P10, acumulam-se no núcleo e no citoplasma (Van Der Wilk *et al.*, 1987), podendo estar relacionadas à

desintegração celular (Williams *et al.*, 1989). Após este período as proteínas não são mais sintetizadas, havendo morte ou lise celular.

A primeira indicação, por meio de microscopia ótica, dessa fase de oclusão é a presença de diversos corpos de oclusão no núcleo. Os poliedros se dispõem em forma de anel no núcleo celular onde se acumulam. Van Oers *et al.* (1993) sugerem o envolvimento da proteína P10 na desintegração nuclear levando à liberação dos poliedros de células infectadas. Os efeitos citopáticos de infecção, observados em nível óptico, não são muito variáveis em diferentes linhagens celulares.

Foi descrito inicialmente por Volkman e Summers (1975), após infecção com AcMNPV, alterações como o arredondamento celular, aumento do núcleo, aparecimento de protusões (extensões) celulares e formação de poliedros. O número de vírions por poliedro é bastante variável (3-60 dependendo da espécie). O envelope do poliedro, também chamado de *calyx*, não é uma membrana verdadeira, pois é composto basicamente por carboidratos e proteínas (Adams & McClintock, 1991; O'Reilly *et al.*, 1992).

PARTE II

Baculovírus como vetor de expressão gênica

II.1 - Sistema de expressão baculovírus

Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetores de expressão foram publicados por Smith *et al.* (1983) e Pennock *et al.* (1984) que usaram o AcMNPV para produzir β -interferon e β -galactosidase, respectivamente em células *Spodoptera frugiperda*.

O vírus AcMNPV tem sido usado como o vetor de escolha, pois sua variedade de hospedeiros não é tão limitada como o de outros baculovírus. Além disso, o maior conhecimento do seu genoma permitiu a manipulação de baculovírus utilizando seus promotores fortes (Miller, 1997).

Dentre os objetivos dos sistemas de expressão está a produção de proteínas em grandes quantidades, a custos mais baixos. Entretanto, o maior desafio está na obtenção de produtos ativos. Apesar do cultivo de bactérias ser mais econômico que o de células de inseto, muitas vezes o custo do processo de purificação das proteínas expressas em bactérias é alto, tornando a expressão em células de inseto vantajosa. A produção de proteínas em bactérias requer métodos drásticos de purificação, passando por etapas de desnaturação e renaturação protéica, podendo resultar na inativação das proteínas produzidas (Montor & Sogayar, 2003).

Comparado a outros sistemas de cultura de células animais, o sistema de expressão células de insetos/baculovírus resulta em uma expressão mais rápida e em uma concentração maior de proteínas recombinantes (Palomares & Ramírez, 2002). Uma outra vantagem do sistema é a manutenção de células de inseto em suspensão, sendo possível cultivar as células em bioreatores de diferentes capacidades. Casos de expressão de altas concentrações de proteínas heterólogas a 25-50% da proteína total de células infectadas são conhecidos (Matsuura *et al.*, 1987). A produção da maioria dos produtos expressos está na faixa de 10-100 mg para cada 10^9 células (O'Reilly *et al.*, 1992).

O sistema de expressão de baculovírus em células de insetos fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas oferecendo condições para que ocorra o dobramento adequado da estrutura da proteína, formação de pontes dissulfídicas, oligomerização e modificações pós-traducionais (incluindo clivagem de peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação) similares às produzidas em células de mamíferos (O'Reilly *et al.*, 1992).

Células de inseto são capazes de reconhecer peptídeos sinalizadores de secreção e podem, portanto, secretar proteínas solúveis. A remoção do peptídeo sinalizador, liberando apenas a proteína de interesse no meio de cultura, simplifica o processo de purificação da proteína expressa. Por outro lado, visando facilitar o processo de purificação de proteínas não secretáveis, técnicas que permitem a adição de um peptídeo sinalizador de secreção a estas proteínas podem ser empregadas, levando a liberação de tais proteínas para o meio de cultura. No entanto, às vezes as proteínas envolvidas são muito hidrofóbicas o que faz com que fiquem retidas na membrana celular. Neste caso, é possível adicionar a essas proteínas uma cauda de histidina, para facilitar sua purificação utilizando-se colunas de níquel, as quais retêm esse aminoácido juntamente com a proteína de interesse (Montor & Sogayar, 2003).

A tecnologia para construção de vetores de baculovírus é baseada em plasmídeos de transferência, que são unidades replicativas que contêm regiões flanqueadoras do gene que se pretende substituir no genoma viral, seu promotor, incluindo ou não a sequência codificadora, e um sítio de clonagem. A origem de replicação e genes de seleção são derivados de plasmídeos bacterianos como os da série pUC (Miller *et al.*, 1986). A montagem é feita em plasmídeos por causa da fragilidade do DNA viral devido ao seu grande tamanho (80-220 Kb).

A escolha do promotor utilizado para clonagem deve ser feita de acordo com o contexto desejado para a expressão. Nas primeiras construções de vetores para o sistema de baculovírus (Smith *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984; Summers & Smith, 1987), o gene da poliedrina (*polh*) foi inicialmente escolhido para manipulação por possuir um promotor forte e pelo fato de seu produto não ser essencial ao ciclo de infecção do vírus. Este promotor é ativado na fase tardia da infecção facilitando a expressão de produtos que possam interferir na regulação da expressão dos outros genes virais ou impedir a montagem e propagação do vírus. A comparação da sequência do gene da poliedrina de vários baculovírus mostrou ser esta altamente conservada (Rohrmann, 1986; Zanotto *et al.*, 1993). A expressão durante a fase de oclusão é vantajosa pelo uso dos promotores fortes e pela possibilidade de expressão tardia de genes citotóxicos. Por outro lado, há um declínio na capacidade de processamento pós-traducional nas células infectadas em consequência de danos ao retículo endoplasmático e ao Aparelho de Golgi, responsáveis por estes processamentos, já comprometidos pela infecção (Jarvis *et al.*, 1990).

Diversos plasmídeos de transferência utilizam-se do promotor do gene que codifica para a proteína P10 (expressão tardia e gene não essencial). No entanto, o uso deste promotor não confere um fenótipo de identificação dos duplos recombinantes, como aqueles desenhados

para o promotor da poliedrina P_{polh} . Todavia foram desenvolvidos métodos de identificação de vírus recombinantes utilizando o gene do *lacZ* regulado pelo promotor P_{10} (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989; Vlak *et al.*, 1990).

O uso de promotores expressos na fase inicial de infecção (antes da replicação de DNA) proporciona mais tempo para expressão do gene heterólogo. Entretanto, podem apresentar problemas de interferência com a replicação viral. Alguns promotores conhecidos da fase inicial não são muito fortes (Morris & Miller, 1992). Estudos de expressão em estágios iniciais de infecção têm sido feitos com genes marcadores (*CAT* e *lacZ*) dirigidos pelos promotores *pcna* - também conhecido como *etl* (Crawford & Miller, 1988), *p35* (Nissen & Friesen, 1989), *egt* (O'Reilly & Miller, 1989) e *da26* (O'Reilly *et al.*, 1990).

Existem ainda os promotores sintéticos, desenhados segundo seqüências encontradas nos promotores fortes ativados na fase muito tardia de infecção, como o P_{XIV} e o P_{syn} . Estes promotores, quando usados em plasmídeos de transferência, permitem expressão de proteínas fusionadas ou não, e expressão simultânea de duas proteínas (O'Reilly *et al.*, 1992).

As vantagens da utilização de baculovírus como vetores de expressão têm feito dele o sistema de expressão eucariótico de escolha em laboratórios de pesquisa. Mais de 500 genes de diferentes origens têm sido expressos por meio deste sistema para uma grande variedade de aplicações. A indústria farmacêutica emprega extensivamente sistemas de expressão para gerar material para testes preliminares de drogas. Entretanto, a utilização dos baculovírus para a produção industrial de medicamentos tem sido limitada por diferenças na glicosilação entre proteínas produzidas por humanos e células de insetos. Mesmo assim, alguns medicamentos de uso veterinário e humano, como a Lysodase (PEGylated-glucocerebrosidase), estão sendo produzidos em células de insetos e atualmente estão em testes clínicos (Palomares *et al.*, 2003).

No início do desenvolvimento de baculovírus como vetor de expressão procurava-se obter baculovírus recombinantes usando a estratégia da recombinação homóloga, ou seja, a troca de segmentos genéticos parecidos (Figura 6 (B₁) e Figura 7). Posteriormente surgiu um sistema de expressão que utiliza a estratégia da recombinação sítio-específica através de transposição (Figura 6 (B₂) e Figura 8).

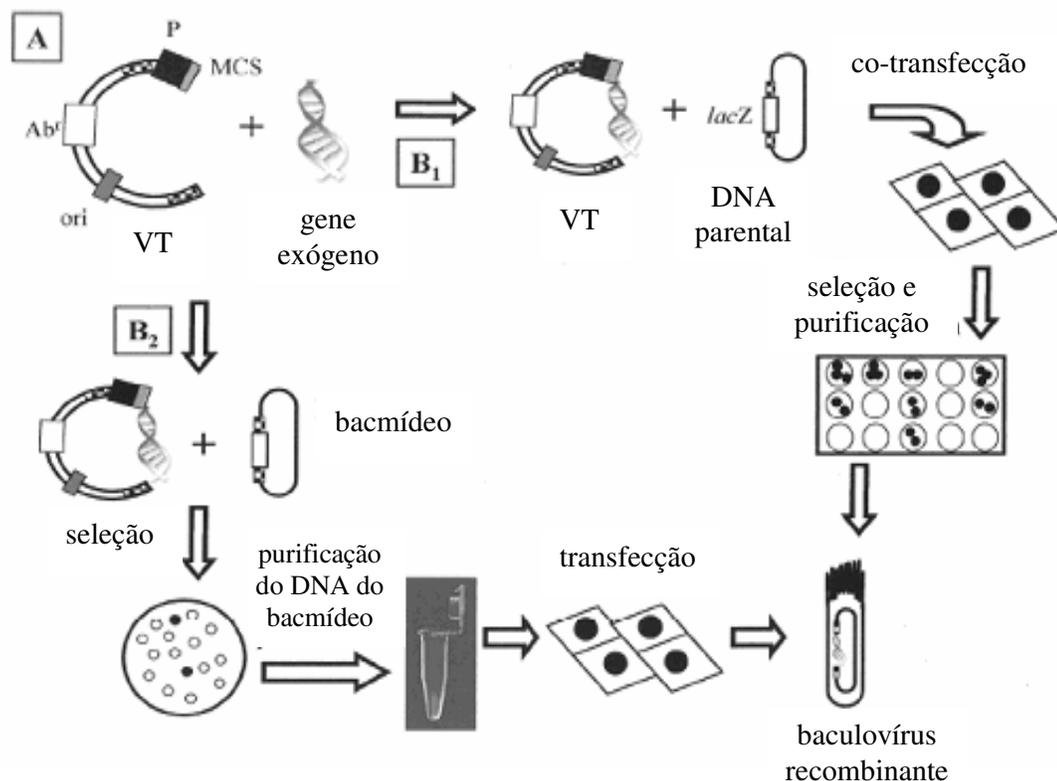


Figura 6 - Principais passos para a obtenção de baculovírus recombinantes. (A) O vetor de transferência (VT) é representado com seus elementos principais (ori, origem de replicação bacteriana; Ab^r, marcador de resistência à antibiótico; P, promotor; MCS, múltiplo sítio de clonagem; sítio de recombinação homóloga). Dependendo do vetor de transferência utilizado, dois caminhos podem ser utilizados: (B₁) Método tradicional em que ocorre a recombinação homóloga em células de inseto; (B₂) Método de transposição do bacmídeo, em que ocorre a recombinação sítio-específica (Palomares *et al.*, 2003 com adaptações).

II.2 - Glicosilação

Entre as modificações pós-traducionais melhor executadas em células de inseto encontra-se a glicosilação, sendo uma das mais importantes pois está associada à taxa de *clearance* das proteínas e a certas propriedades destas, como antigenicidade, imunogenicidade, atividade biológica específica, solubilidade, resistência à inativação térmica, correto enovelamento, diminuição da vida média e resistência ao ataque de proteases (Montor & Sogayar, 2003). A glicosilação de proteínas ocorre em algumas etapas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e várias enzimas estão envolvidas nesse processo. A maioria das proteínas secretadas e proteínas de membrana produzidas por células de mamíferos podem converter cadeias laterais de *high mannose* em estruturas complexas contendo resíduos de ácido siálico e galactose (glicosilação complexa). Em contraste, a maioria das proteínas produzidas por células de inseto produz *high mannose* e a converte em

paucimanose (glicosilação híbrida), a qual não é típica em proteínas nativas de humanos (Kost *et al.*, 2005). Devido aos diferentes perfis de glicosilação, a utilidade comercial dos baculovírus como vetores de expressão para a produção de proteínas terapêuticas humanas está, no presente, limitada. Entretanto, esta situação pode mudar pelo melhoramento da capacidade dos baculovírus de produzir proteínas complexas glicosiladas (Palomares *et al.*, 2003).

Existem três vias de glicosilação de proteínas bem definidas em células eucarióticas: N-glicosilação, O-glicosilação e adição de N-acetilglicosamina *O-linked* (O-GlcNAc). Células de inseto têm todas as três vias, mas elas não são necessariamente as mesmas que as encontradas em eucariotos superiores (Marz *et al.*, 1995). Muitas glicoproteínas biologicamente ativas têm sido sintetizadas em células de inseto (King & Possee, 1992). As seqüências-sinal para glicosilação normalmente funcionam em células de inseto para direcionar a proteína ao retículo endoplasmático. Segundo Thomsen *et al.* (1990) o processo de O-glicosilação em células de inseto parece ser similar, mas não idêntico, ao de mamíferos. É possível que sua estrutura dependa da natureza ou localização da proteína nas células de inseto. A O-glicosilação consiste na adição inicial de resíduo de GalNAc a um resíduo de serina ou treonina. As proteínas recombinantes produzidas em células de inseto são normalmente O-glicosiladas na mesma posição das proteínas nativas (Palomares *et al.*, 2003). A N-glicosilação da proteína é um processo complexo que ocorre no retículo endoplasmático celular e no complexo de Golgi, e envolve a adição seqüencial e remoção de carboidratos ligados a uma asparagina da proteína. Ela começa no retículo endoplasmático quando o oligossacarídeo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ é transferido de um lipídio complexo para uma asparagina na proteína. Modificações resultantes em glicosilação ocorrem no complexo de Golgi (Palomares & Ramírez, 2002). A N-glicosilação é uma das principais modificações pós-traducionais, sendo responsável por alterações na conformação, estabilidade e conseqüentemente na funcionalidade de proteínas em eucariotos.

II.3 - Sistema vSyn VIgal de expressão (recombinação homóloga)

A técnica para se obter baculovírus recombinantes usando a estratégia da recombinação homóloga é a mais antiga e se baseia na troca de segmentos genéticos semelhantes, que ocorre quando duas moléculas de DNA são alinhadas de forma a aproximar seqüências similares (Figura 6 (B₁) e Figura 7).

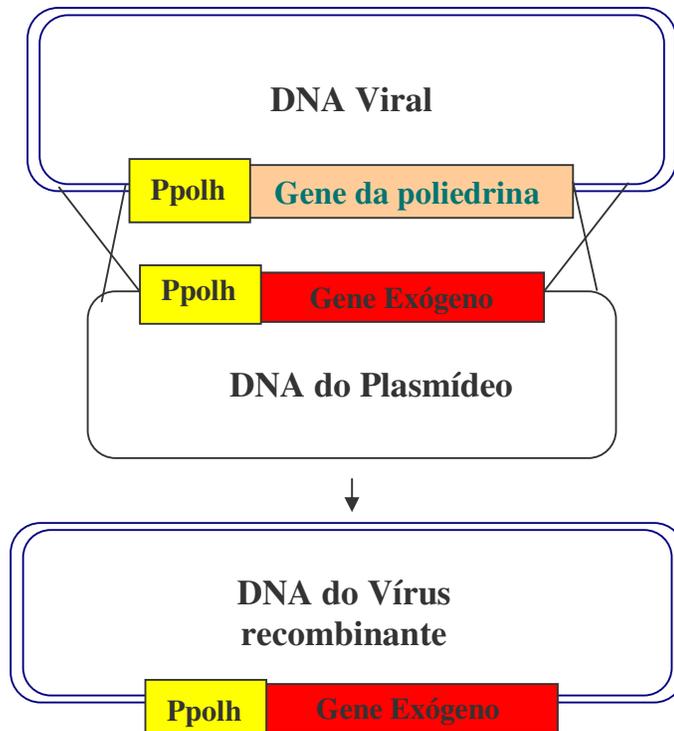


Figura 7 - A recombinação homóloga pode ocorrer quando duas seqüências genéticas semelhantes (no genoma viral selvagem e em um fragmento construído por engenharia genética) se alinham – no caso, o gene da poliedrina é substituído pelo da proteína de interesse.

Como a poliedrina é necessária para a sobrevivência do baculovírus (NPV) no meio ambiente, mas não em cultura de células, o objetivo dessa técnica é substituir a porção codificante da poliedrina pela porção codificante da proteína de interesse. Desse modo, a nova seqüência ficaria sob o controle de um promotor forte, o da poliedrina. Como a poliedrina é hiperexpressada durante a fase muito tardia, a proteína recombinante não é detectada na cultura até cerca de 18 hp.i., embora sua concentração máxima normalmente ocorra entre 48 e 120 hp.i. (Palomares *et al.*, 2003).

Para ocorrer a recombinação homóloga as células de inseto recebem, por meio de co-transfecção, o genoma do baculovírus e outro vetor plasmideal contendo o gene de interesse. A seleção dos vírus recombinantes é realizada pelo chamado ensaio de placas (*plaque assay*).

Para facilitar a identificação outros vírus com parte do genoma do AcMNPV codificando a β -galactosidase foram desenvolvidos (Summers & Smith, 1987; O'Reilly *et al.*, 1990). Desta forma, a seleção de um clone recombinante é facilitada em presença do substrato sintético (x -gal) onde células infectadas com o vírus parental deverão apresentar placas na coloração azul, enquanto que aquelas infectadas com o vírus que recebeu o inserto (com o gene da β -galactosidase interrompido) irão apresentar placas na coloração branca.

Os oito pares de base do gene da poliedrina que circundam o ponto inicial de transcrição são os maiores determinantes para expressão desta proteína (Rankin *et al.*, 1988), por isso, foi criado um promotor mais forte do que o P_{polh} , o promotor P_{XIV} , que foi colocado no plasmídeo pEVmXIV (Ooi *et al.*, 1989).

O promotor P_{syn} foi construído por síntese química a partir da identificação de seqüências curtas (4-8 nucleotídeos) encontradas nos promotores de genes tardios P_{polh} e P_{10} (Wang *et al.*, 1991). Plasmídeos construídos contendo o promotor P_{syn} , o sítio de clonagem e o gene CAT demonstraram que ele apresenta um quinto da eficiência dos promotores P_{polh} ou P_{XIV} , mas sua inserção ao genoma do AcMNPV não duplica uma seqüência já existente, assegurando assim, a sua estabilidade. Estrategicamente, construções utilizando o promotor P_{syn} são interessantes para se equilibrar a expressão simultânea e diferencial de dois genes distintos.

Posteriormente, foi feita a fusão dos promotores P_{syn} e P_{XIV} , dando origem ao chamado promotor P_{synXIV} , que mostrou-se mais eficiente (116%) do que o uso isolado de P_{syn} , P_{XIV} ou P_{polh} . O plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 foi construído tendo o P_{polh} direcionando a expressão da poliedrina numa direção e, no sentido oposto, o P_{synXIV} , direcionando a expressão de genes inseridos no sítio de clonagem (Wang *et al.*, 1991).

Dependendo da presença ou não da região codificadora da poliedrina no plasmídeo, a identificação das células infectadas pelos vírus recombinantes pode ser feita facilmente nas culturas através da observação dos fenótipos ocluso-positivo (formação e visualização de poliedros) ou ocluso-negativo (alteração morfológica da célula sem formação de poliedros). Os recombinantes são selecionados, através de sucessivas purificações por *plaque assay*, quanto à presença de placas contendo vírus oclusos negativos ou de placas com poliedros.

II.4 - Sistema Bac-to-Bac de expressão (recombinação sítio-específica)

Nos últimos anos houve o surgimento de estratégias mais eficientes que a recombinação homóloga, que dispensam o ensaio de placas e utilizam sistemas muito mais simples para a obtenção dos baculovírus recombinantes, sendo um deles a transposição, a mudança de local de um fragmento de DNA dentro de um genoma promovida por enzimas denominadas transposases, desde que a seqüência a ser transposta esteja ladeada por sítios doadores de transposição e haja sítios receptores de transposição no local de destino do fragmento (Montor & Sogayar, 2003).

O desenvolvimento do método de transposição bacteriano *in vivo* foi descrito pela primeira vez em 1993 e mais tarde comercializado como sistema Bac-to-Bac (Kost *et al.*,

2005). Este sistema requer o uso de um bacmídeo (Figura 6 (B₂), Figura 8 e 9), que é o DNA recombinante do baculovírus AcMNPV contendo um relicon mini-F, marcador seletivo e sítio de transposição Tn7. Assim, um bacmídeo pode replicar livremente em *E. coli* e cepas abrigando o bacmídeo e um plasmídeo *helper*, que codifica as funções das transposases Tn7, podem ser usadas para produzir baculovírus vetores de expressão (Figura 8 e 9). Isto é feito introduzindo um plasmídeo doador contendo a seqüência cDNA desejada e um segundo marcador seletivo posicionado entre os lados esquerdo e direito do Tn7.

As funções de transposição providas pelo plasmídeo *helper* moverá o cDNA e o marcador seletivo do plasmídeo doador para o bacmídeo. Isso produz um bacmídeo recombinante que pode ser selecionado, isolado e transfectado em cultura de células de insetos para produzir baculovírus recombinantes.

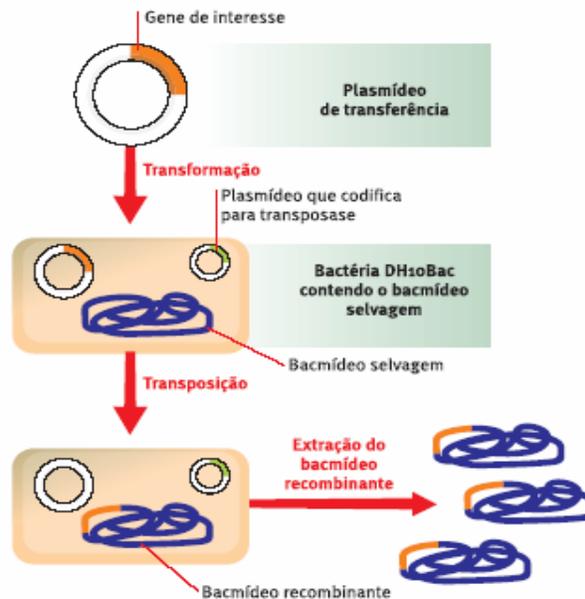


Figura 8 - A transposição do gene de interesse para um bacmídeo selvagem permite obter bacmídeos recombinantes para transfecção em células de inseto (Montor & Sogayar, 2003).

Existe, comercialmente disponível, uma bactéria (DH10Bac) que contém, além do próprio genoma, o bacmídeo selvagem e um plasmídeo auxiliar que codifica para uma transposase. No bacmídeo selvagem há sítios receptores de transposição situados de modo que o fragmento transposto fique sob controle do promotor da poliedrina. Além disso, tais sítios ficam em meio ao gene da enzima β -galactosidase (beta-gal), o que permite identificar os clones dos bacmídeos modificados (que receberam o gene transposto), cultivando as bactérias DH10Bac em placas de meio nutritivo contendo ágar e um substrato (como x-gal ou Blue-gal)

capaz de mudar de cor em contato com a β -galactosidase. Dessa forma, o vetor baculoviral íntegro (onde não ocorreu transposição) produzirá beta-gal e colônias bacterianas azuis, enquanto o vetor recombinante gerará apenas colônias brancas devido à interrupção da sequência codificadora da beta-gal. Assim, já nessa fase, é possível identificar e isolar os bacmídeos recombinantes e distinguí-los dos selvagens antes mesmo de transfectá-los nas células de inseto, eliminando a necessidade de realizar o ensaio de placas. Os bacmídeos são extraídos como se fossem DNA plasmideal e, depois, utilizados para transfectar células de inseto em cultura visando à produção de baculovírus recombinantes (Figura 9).

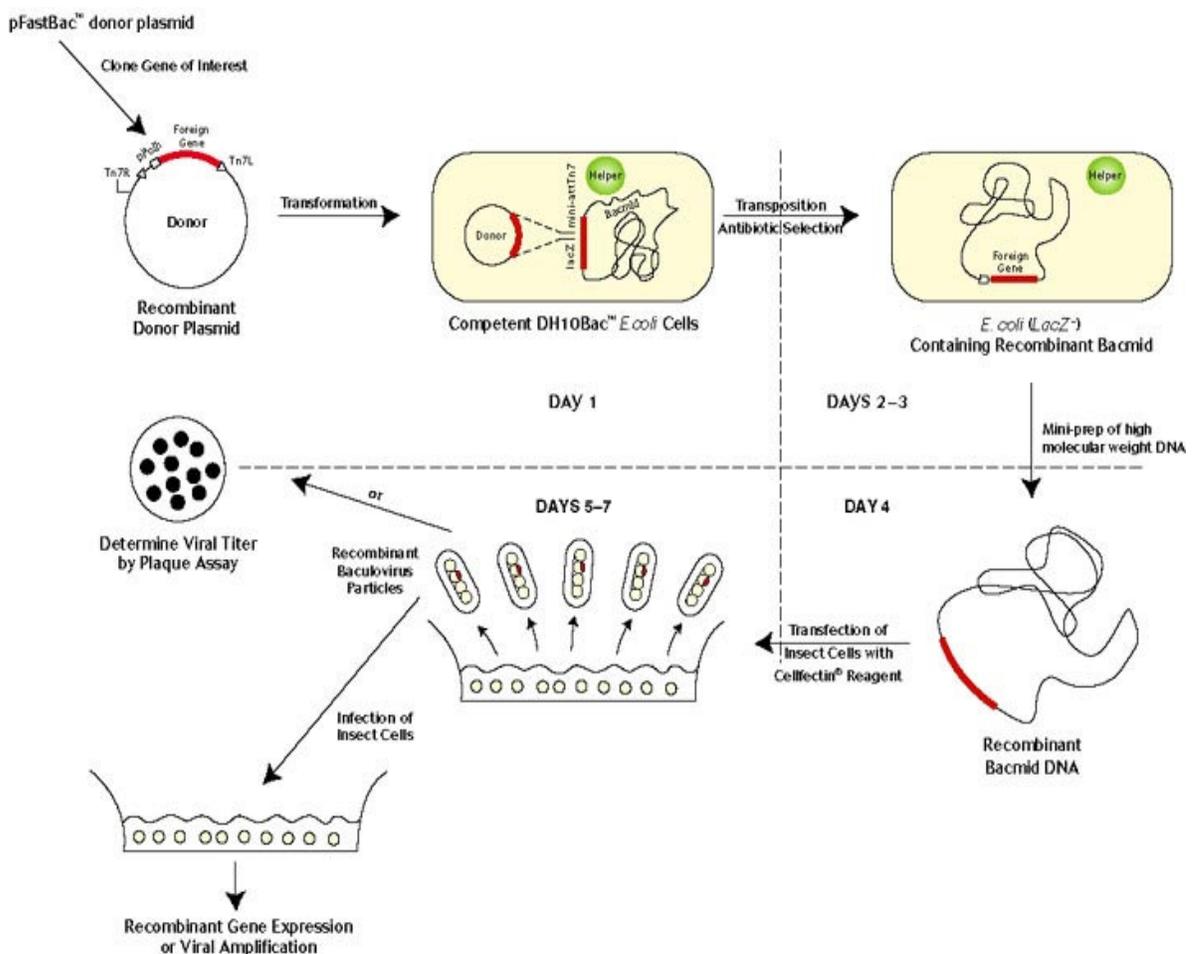


Figura 9 - Esquema da transposição do gene de interesse para um bacmídeo selvagem, com a ajuda da enzima transposase, permitindo obter bacmídeos recombinantes para a transfecção em células de inseto (Invitrogen- www.invitrogen.com).

PARTE III

Renina

A síntese de renina é um fator limitante de todo o sistema renina-angiotensina (SRA). A renina atua sobre o angiotensinogênio (α -2 globulina), seu substrato específico, promovendo a formação de angiotensina I (AI) (Baxter *et al.*, 1995). Posteriormente, a AI sob ação da enzima endotelial conversora de angiotensina (ECA), é convertida em angiotensina II (AII). A AII é um potente vasoconstrictor, participa da regulação do balanço de sódio e potássio e tem sido relacionada ao crescimento celular, reprodução, síntese de hormônio antidiurético e secreção de catecolaminas (Baxter *et al.*, 1995; Sealey & Laragh, 1990). Conseqüentemente, a disfunção do sistema renina-angiotensina-aldosterona (S-RAA) está intimamente relacionada à patogênese da hipertensão arterial, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, doença arteroesclerótica, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral além de outras patologias.

Além disso, a importância do S-RAA está no fato de que os medicamentos mais utilizados no tratamento das doenças cardiovasculares são os inibidores do SRA.

III.1 - Características gerais e estrutura

As células granulosas das arteríolas aferente e eferente são células musculares lisas modificadas que sintetizam, armazenam e liberam a renina, este é o único tecido que sintetiza a pré-pró-renina e tem a capacidade de processá-la à renina ativa e secretá-la na circulação. A renina é secretada de uma maneira regulada do aparato justaglomerular do rim em resposta a vários estímulos fisiológicos (Chu *et al.*, 1991).

A renina sozinha não tem função fisiológica; ela funciona unicamente como uma enzima proteolítica altamente específica com apenas um substrato conhecido, o angiotensinogênio (Porto, 1997).

A renina é inicialmente sintetizada nas células justaglomerulares (JG), que circundam as arteríolas aferentes do rim, como pré-pró-renina, um zimogênio de 406 aminoácidos, que é convertida em pró-renina, um hormônio inativo, durante sua inserção no retículo endoplasmático rugoso, quando são removidos 23 aminoácidos. O peptídeo sinal presente na pró-renina indicada pelo radical pré na nomenclatura é quem vai direcionar a pró-renina ao complexo de Golgi onde vai ser glicosilada e sofrerá o *foldig*. Dois sítios de N-glicosilação foram identificados na renina humana, localizada nos aminoácidos 5 e 75 do sítio carboxi da

pró-renina para o sítio de clivagem da renina (Chu *et al.*, 1991). No complexo de Golgi, uma parcela da pró-renina sintetizada é secretada continuamente (via constitutiva) enquanto outra parcela é direcionada os grânulos secretórios das células JG (via regulada), onde fica armazenada em um ambiente de pH 5,6 e é convertida em renina (forma ativa) por ação específica de uma enzima que remove 43 aminoácidos de sua porção aminoterminal após o par de aminoácidos básicos Lys-Arg. A renina, recém formada, fica armazenada no interior dos grânulos secretórios e só será secretada na corrente sanguínea em resposta a algum estímulo externo, como, por ex., queda da pressão arterial (Baxter *et al.*, 1995; Sealey & Laragh, 1990; Baxter *et al.*, 1991; Hsueh & Baxter, 1991). Até momento não se conhece a enzima responsável por esta conversão, mas algumas enzimas têm sido sugeridas por serem capazes de ativar a pró-renina. Uma forte candidata a ser a enzima conversora de pró-renina é a catepsina B, pois se localiza com a renina nos grânulos secretórios das células JG, quebra o pró-segmento da pró-renina humana *in vitro* e o pH ótimo para processar a pró-renina é 6, o qual é consistente com o pH dentro do grânulo secretório (Almeida *et al.*, 2000; Neves *et al.*, 1996). A pró-renina pode ser também ativada *in vitro* por endopeptidases, como a tripsina e catepsina B, e ainda, de forma não proteolítica, quando em pH ácido e/ou a baixa temperatura (Suzuki *et al.*, 2003).

Como pode ser visto através da Figura 10, a inativação da pró-renina se dá devido ao seu pró-segmento recobrir o sítio ativo impedindo sua interação com o angiotensinogênio. Assim, através da remoção do pró-segmento o sítio ativo fica exposto e torna a renina capaz de gerar AI a partir do angiotensinogênio. A ativação da pró-renina pode ocorrer sem a remoção do pró-segmento através de modificação em sua estrutura conformacional. Acredita-se que em pH ácido ocorra um dobramento do pró-segmento para fora do corpo expondo o sítio ativo da renina, provocando sua ativação (Baxter *et al.*, 1991).

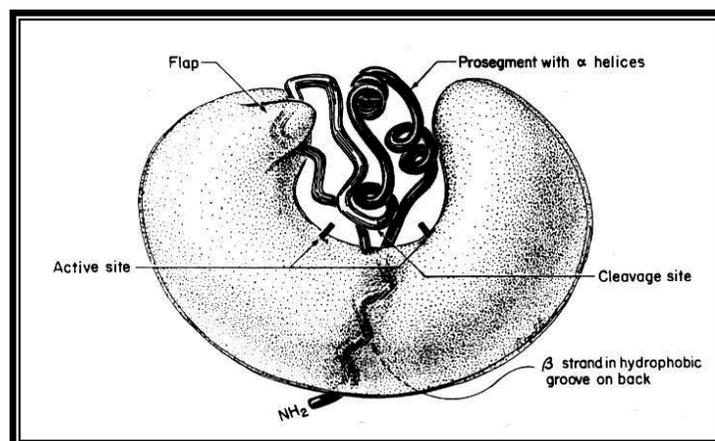


Figura 10 - Estrutura tridimensional da pró-renina (Baxter *et al.*, 1995).

A purificação parcial ou total da renina tem sido descrita usando rins, plasma sanguíneo, carcinomas de células JG e córion de placenta (Egan *et al.*, 1988).

III.2 - Cascata renina-angiotensina-aldosterona

No S-RAA circulante, o angiotensinogênio é produzido pelo fígado e a renina é liberada pelos rins, enquanto que a enzima de conversão de AI em AII (ECA) é mais encontrada na face luminal das células endoteliais vasculares, sendo também descrita em outros tecidos: células musculares lisas dos vasos, cardiomiócitos, túbulo contornado proximal renal e tecido cerebral (Ferrario, 2006).

Conforme ilustrado na Figura 11, a renina cliva por hidrólise catalítica a ligação entre os resíduos 10 e 11 do angiotensinogênio circulante na porção aminoterminal (Phe-His-Leu¹⁰-Val¹¹-Ile) gerando a AI que contém 10 aminoácidos (decapeptídeo) (Araújo *et al.*, 2005). A AI é processada pela ECA, que cliva um dipeptídeo histidil leucina da AI, para o octapeptídeo AII, um potente vasoconstritor envolvido na regulação do balanço salino, da pressão sanguínea, do balanço de fluídos e ainda estimula a secreção de aldosterona, hormônio envolvido no balanço hidroeletrolítico, pelo córtex adrenal. O AII ativa os receptores (1 e 2) de AII, resultando na contração vascular e retenção renal de Na⁺ e de água (van den Eijnden *et al.*, 2001).

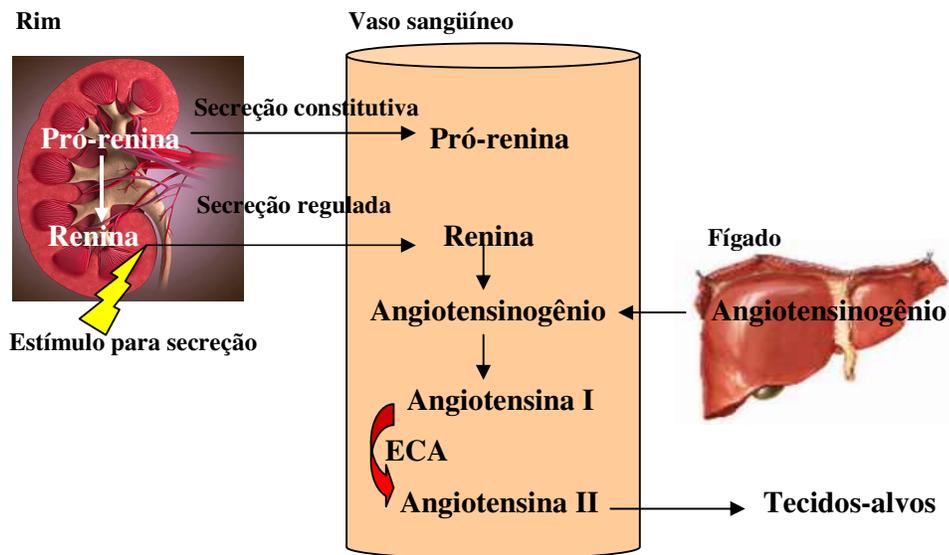


Figura 11 - Esquema do sistema renina-angiotensina.

A AII aumenta a contratilidade cardíaca, regula o fluxo sanguíneo coronário, e é considerada um fator de crescimento estimulando a síntese de colágeno cardíaco, hiperplasia e hipertrofia cardíaca. A AII apresenta várias funções fisiológicas importantes, incluindo: estimulação da secreção do hormônio antidiurético (ADH) e da sede, intensificação da reabsorção de NaCl pelo túbulo proximal (Berne & Levy, 2000). A estimulação dos receptores AT1 está associada à disfunção endotelial, principalmente, como consequência de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição, ativação plaquetária, maior liberação do fator inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), além da ativação de certos genes, ditos *immediate early genes*, tais como o c-fos, c-jun, da hipertrofia miocárdica, formação de tecido conectivo, síntese de endotelina, e ativação de fatores de crescimento, como o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e o TGF-beta 1 (fator de crescimento transformador - beta 1). Já a estimulação dos receptores AT2 pode atenuar os efeitos proliferativos da estimulação dos receptores AT1. Para exercer sua atividade biológica, a AII liga-se, preferencialmente, ao receptor de alta afinidade AT1 existente em uma variedade de tecidos. Assim, a AII exerce suas ações, que vão além de seu grande poder vasoconstritor, estimulando diretamente a reabsorção de sódio no túbulo proximal dos rins e aumentando a produção adrenal da aldosterona que promove a reabsorção tubular distal de sódio. A AII também aumenta a liberação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas, portanto, aumentando a contratilidade miocárdica (Mathews *et al.*, 1996).

A aldosterona atua sobre o rim promovendo retenção de sal e água (Bennett & Plum, 1997), ou seja, aumenta a reabsorção de Na⁺ (em resposta às necessidades do organismo de manter o volume líquido extracelular) e a secreção de K⁺ e H⁺ (que resulta na regeneração de bicarbonato, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ácido-básico) (Porto, 1997).

A lógica fundamental que preside o funcionamento do sistema é responder a uma instabilidade hemodinâmica e evitar redução na perfusão tecidual sistêmica ou a perda de sódio. Assim, atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial ou a perda de sódio através de indução de vasoconstrição arteriolar periférica e aumento na volemia por meio de retenção renal de sódio (através da aldosterona) e água (através da liberação de ADH-vasopressina).

III.3 - SRA: Hipertensão Arterial e Sistema Cardiovascular e Renal

A hiperatividade do SRA culmina com a produção exacerbada de AII, que está intimamente relacionada ao desenvolvimento de hipertensão arterial e conseqüentemente de outras patologias cardiovasculares, como: hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença coronariana incluindo o infarto agudo do miocárdio, doença arterial arteroesclerótica, síndrome metabólica, glomeruloesclerose e insuficiência renal crônica e também de forma importante a nefropatia diabética (Schiffrin, 2002; Remuzzi *et al.*, 2002; Hsueh, 2002; Critchley *et al.*, 2002; Ferrario *et al.*, 2002).

Por este motivo, um considerável número de pesquisas, seja em animais ou ensaios clínicos, tem demonstrado que o bloqueio do SRA diminui o risco, a morbidade e a mortalidade implicada nas doenças cardiovasculares. Assim, a cada dia, crescem as indicações para o uso de inibidores da ECA (por ex. captopril), dos antagonistas dos receptores AT1 de AII (por ex. losartan) ou mesmo dos antagonistas dos receptores de aldosterona (por ex. espirinolactona e eplerenona).

III.4 - Importância

Há longa data vários grupos têm buscado o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores do SRA, mais particularmente de inibidores de renina (iREN).

Estudos em animais e seres humanos demonstraram que a administração de iREN, peptídicos ou não como o aliskiren, reduz a atividade plasmática de renina, portanto reduz os níveis plasmáticos de AI, AII e da aldosterona diminuindo a pressão sangüínea arterial nos pacientes hipertensos e nos indivíduos normotensos com depleção de sal (Ferrario, 2006).

Uma das grandes limitações para o desenvolvimento de iREN é a pouca disponibilidade desta proteína no plasma e mesmo no rim. Por este motivo, a caracterização bioquímica da renina foi feita inicialmente principalmente com a renina expressa na glândula submaxilar de camundongos (Sielecki *et al.*, 1989) e apenas posteriormente dados estruturais de renina recombinante humana foram descritos (Mathews *et al.*, 1996).

Desta forma, o estudo bioquímico e estrutural da renina é de grande importância para o desenvolvimento de uma nova classe de medicamentos. Para isso, antes de tudo é necessário possuímos um bom sistema de expressão. Assim, a expressão da renina através de baculovírus poderá contribuir para solucionar o problema da disponibilidade de renina humana tanto para estudos bioquímicos e funcionais quanto para estudos estruturais que possam orientar o desenvolvimento de medicamentos anti-hipertensivos que utilizem a renina como alvo farmacológico.

Objetivos

Devido à importância da renina humana como reguladora do aumento da pressão sanguínea e da produção da AII e da necessidade do entendimento de suas funções, ações e inibidores, e da praticidade da expressão de proteínas em baculovírus, esse trabalho objetiva principalmente expressar a renina humana em sistema baculovírus. A utilização desse sistema em células de inseto foi escolhida por se tratar de um ambiente eucariótico que permite que ocorram modificações pós-traducionais de forma eficiente, incluindo glicosilação de proteínas heterólogas.

A construção de baculovírus recombinantes contendo a seqüência genômica da pré-pró-renina foi feita utilizando dois sistemas de expressão. Para tanto, foi utilizado o plasmídeo de transferência pSynXIV VI⁺X3 que permite a expressão de um gene heterólogo, após recombinação homóloga com o DNA viral, sob controle do promotor híbrido P_{synXIV}. Também foi empregado um segundo sistema comercialmente disponível, denominado Bac-to-Bac (Invitrogen) que permite a expressão da proteína após recombinação sítio-específica (transposição) com DNA do bacmídeo produzido em células específicas (DH10Bac).

Justificativa

A renina é uma chave de fundamental importância na regulação da pressão sanguínea, já que ela dá início ao desencadeamento de uma cascata de reações que culminam no aumento da pressão. A hiperatividade desta cascata leva à produção exacerbada de AII que está intimamente relacionada ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Assim, o uso de inibidores da renina pode gerar inúmeros benefícios. Já existem quatro tipos de inibidores desenvolvidos (anticorpos contra renina, análogos do pró-segundo da pró-renina, análogos da pepstatina e análogos do angiotensinogênio), mas sua aplicação se tornou impossível devido à baixa biodisponibilidade. A produção da renina humana em sistema *in vitro* poderá solucionar esse problema, pois a grande quantidade da renina humana disponível fará com que muitos estudos possam ser feitos para o melhor conhecimento desta substância, sua geração e ação, e ainda de seus inibidores para a aplicação clínica. O bloqueio da renina seria uma alternativa interessante, impedindo que a AII fosse produzida por meio de uma etapa anterior ao bloqueio da ECA, já que nem ao menos a AI seria formada, e assim, impedindo também que várias patologias fossem desenvolvidas.

O uso de vetores de baculovírus é extremamente importante como estratégia para produção de proteínas em ambiente eucarioto que dificilmente seriam sintetizadas adequadamente em sistemas procarióticos. Um grande número de genes isolados de bactérias, fungos, vírus e vertebrados, incluindo humanos já foram expressos por este sistema. Eles têm cada vez mais aumentado sua importância devido à demanda da indústria farmacêutica.

O vetor de baculovírus mais empregado utiliza o promotor do gene da poliedrina, que é altamente expressa e regulada no vírus AcMNPV. Uma das grandes vantagens deste sistema sobre os outros é que ele permite modificações pós-traducionais complexas e as proteínas recombinantes retêm, na maioria das vezes, as características originais no que se refere a antigenicidade e funcionalidade.

Estratégias

As estratégias para se alcançar os objetivos citados consistiram em:

Sistema de expressão com vSyn VI gal (recombinação homóloga)

- 1) Remoção da pré-pró-renina do plasmídeo pRHR1100 por digestão enzimática.
- 2) Purificação da banda referente ao gene da pré-pró-renina.
- 3) Inserção do fragmento da pré-pró-renina no plasmídeo (vetor) pBluescript por ligação com T4 ligase.
- 4) Transformação em células XL-1 blue.
- 5) Purificação e seqüenciamento do plasmídeo denominado pBSRen.
- 6) Retirada do gene da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen por digestão enzimática.
- 7) Purificação da banda referente ao gene da pré-pró-renina.
- 8) Inserção do gene da pré-pró-renina no plasmídeo (vetor) pSynXIV VI⁺X3 por ligação com T4 ligase.
- 9) Transformação da ligação em células XL-1 blue.
- 10) Purificação do plasmídeo denominado pSynRen.
- 11) Recombinação homóloga do plasmídeo pSynRen com o DNA do vírus parental vSyn VI gal em células de inseto (co-transfecção com lipofectina).
- 12) Seleção do clone recombinante pelo fenótipo ocluso positivo, vRen.
- 13) Purificação do vírus recombinante denominado vRen pela técnica de *plaque assay*.
- 14) Purificação do DNA do vírus recombinante e confirmação da presença do gene no vírus por PCR com *primers* específicos.
- 15) Microscopia eletrônica das amostras de células infectadas com vRen.
- 16) Análise de proteínas por eletroforese em SDS-PAGE.
- 17) Cinética da síntese de proteínas por marcação radioativa (³⁵S-metionina) para verificar expressão de proteínas em diferentes tempos pós-infecção com vírus recombinante vRen.
- 18) Detecção do produto de expressão do gene heterólogo presente (renina) pela técnica de *western blotting* e *dot blot* utilizando anticorpos anti-renina.
- 19) Infecção de larvas, com vírus vRen, por injeção intrahemocélica e por via oral.

Sistema Bac-to-Bac de expressão (recombinação sítio-específica)

- 1) Retirada da pré-pró-renina do plasmídeo pRHR1100 por digestão enzimática.
- 2) Purificação da banda referente ao gene da pré-pró-renina.
- 3) Inserção do fragmento da pré-pró-renina no plasmídeo (vetor) pBluescript por ligação com T4 ligase.
- 4) Transformação em células XL-1 blue.
- 5) Purificação e seqüenciamento do plasmídeo denominado pBSRen.
- 6) Retirada do gene da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen por digestão enzimática.
- 7) Purificação da banda referente ao gene da pré-pró-renina.
- 8) Inserção do gene no plasmídeo (vetor) pFastBac HTc por ligação com T4 ligase.
- 9) Transformação em células DH10Bac, ou seja, transposição do gene da pré-pró-renina com DNA do vírus (bacmídeo).
- 10) Purificação do DNA do bacmídeo denominado BacRen.
- 11) Transfecção do bacmídeo recombinante (BacRen) em cultura de células.
- 12) Seleção do clone recombinante com fenótipo ocluso negativo, vRenbac.
- 13) Purificação do DNA do vírus recombinante vRenbac e confirmação da presença do gene da pré-pró-renina no vírus por PCR com *primers* específicos e com *primers* M13.
- 14) Microscopia eletrônica das amostras de células infectadas com vRenbac.
- 15) Análise de proteínas por eletroforese em SDS-PAGE.
- 16) Cinética da síntese de proteínas por marcação radioativa (³⁵S-metionina) para verificar expressão de proteínas em diferentes tempos pós-infecção com vírus recombinante vRenbac.
- 17) Detecção do produto de expressão do gene heterólogo presente (renina) pela técnica de *western blotting* e *dot blot* utilizando anticorpos anti-renina.
- 18) Infecção de larvas, com vírus vRenbac, por injeção intrahemocélica.

Materiais

1) Vírus:

Foram utilizados o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* - isolado L-1 (AcMNPV-L1) e o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* - isolado 2D (AgMNPV-2D) como controles positivo em infecções, pois os mesmos apresentam poliedros quando infectam as linhagens celulares utilizadas. O vírus AcMNPV-L1 foi cedido pela Dra. Lois K. Miller (Universidade da Georgia - EUA) e o vírus AgMNPV-2D foi cedido pelo Dr. James Maruniak (Universidade da Flórida - EUA).

Foi utilizado o vírus recombinante vRola, que contém o gene rolA de *Agrobacterium rhizogenes*, como controle em infecções com vírus ocluso negativo. Este vírus foi cedido pela Dra. Marlinda L. Souza (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Foi utilizado o vírus modificado de AcMNPV contendo o gene *lacZ* em substituição ao da poliedrina (vSyn VIgal), apresentando fenótipo de placas azuis e ocluso negativo, em cultura de células de inseto infectadas, na presença do cromóforo x-gal. O vírus foi cedido pela Dra. Lois K. Miller (Universidade da Georgia - EUA). Como qualquer vírus parental que tenha o gene *lacZ* no sítio de inserção, o vSyn VIgal pode ser linearizado com *Bsu* 36I, pois um único sítio desta enzima ocorre no *lacZ*.

2) Linhagens celulares de insetos:

Foram utilizadas as linhagens celulares IPLB-SF 21-AE de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) e BTI-Tn-5B1-4 (ou High five) de *Trichoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994) para os experimentos de transfecção, co-transfecção, *plaque assay* e amplificação dos vírus parental (vSyn VIgal) e recombinantes (vRen e vRenbac).

3) Insetos:

Foram utilizadas as lagartas na transição do terceiro para o quarto *instar* de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho) e de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) para os experimentos de infecção com os vírus recombinantes (vRen e vRenbac) e com o vírus AcMNPV-L1 por injeção intrahemocélica e por ingestão oral. Esses insetos foram fornecidos pelo Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4) Bactérias:

Foi utilizada a linhagem mutante de *E. coli* XL-1 blue (Stratagene) para transformação e posterior amplificação dos plasmídeos contendo as inserções a serem clonadas.

Foi utilizada também a linhagem *E. coli* mutante DH10Bac do sistema Bac-to-Bac[®] (Invitrogen) que contém um bacmídeo que recombina com o plasmídeo doador, pFastBac (HTc), para criar um bacmídeo de expressão contendo o gene de interesse, no caso, a pré-pró-renina.

5) Plasmídeos:

5.1) Plasmídeo pRHR1100:

O cDNA da pré-pró-renina humana foi inserido no vetor de expressão bacteriano pRHR1100 sob controle transcricional do promotor do Rous Sarcoma Vírus (RSV). O plasmídeo possui 5,2 Kb, sendo que o gene da pré-pró-renina representa 1.400 pb e a única forma de ser liberado é a digestão do plasmídeo com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III. Este plasmídeo foi cedido pelo professor Francisco de Assis R. Neves do Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília.

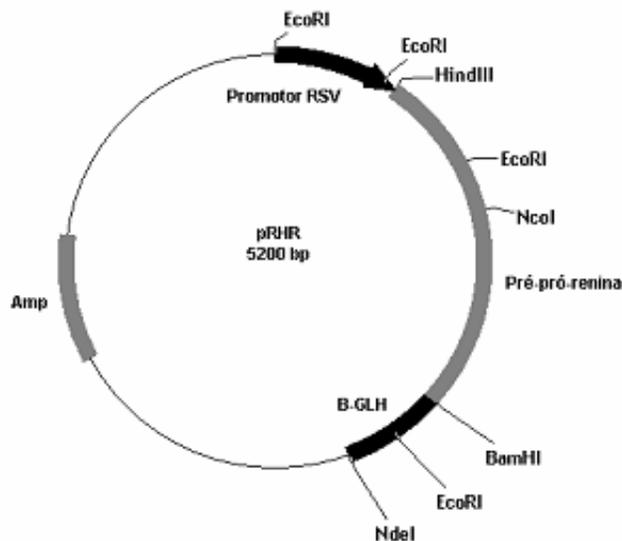
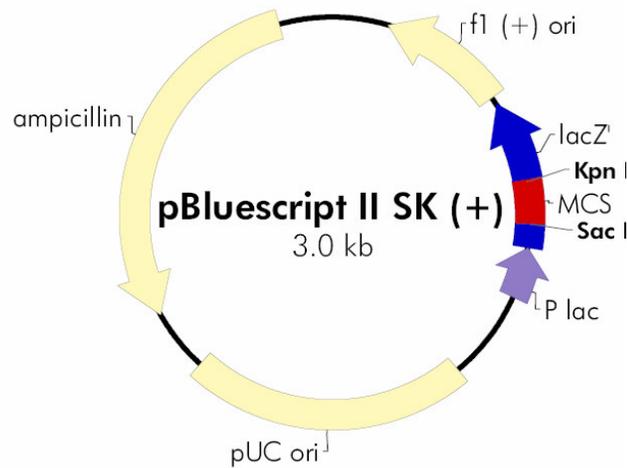


Figura 12 - Plasmídeo pRHR1100.

5.2) Plasmídeo pBluescript (pBS):

Este plasmídeo foi obtido diretamente do fornecedor (Stratagene).



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

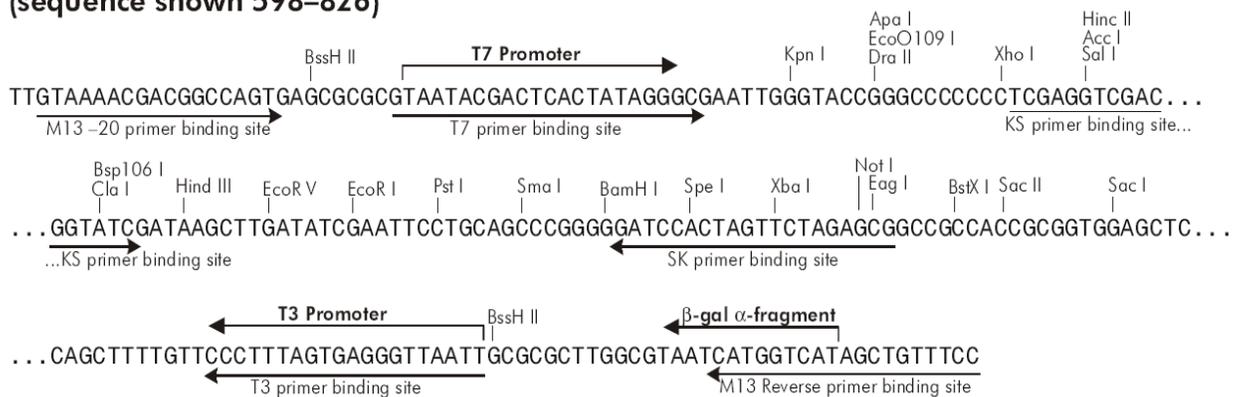
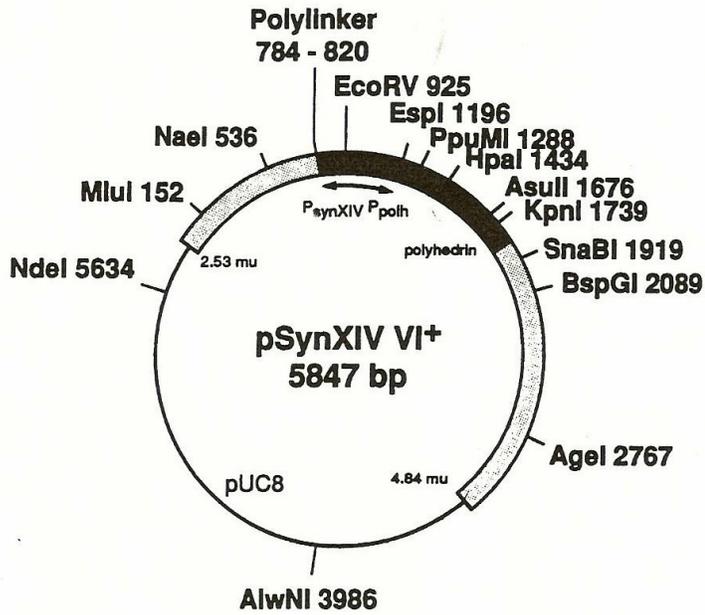


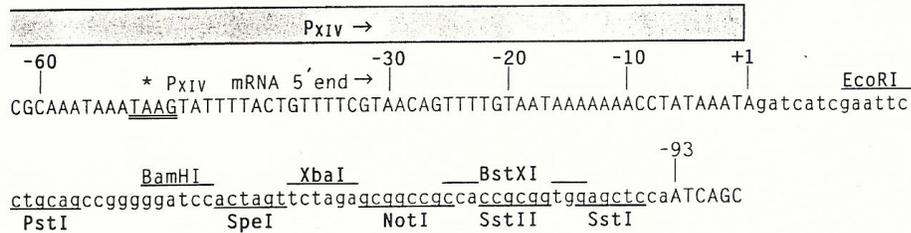
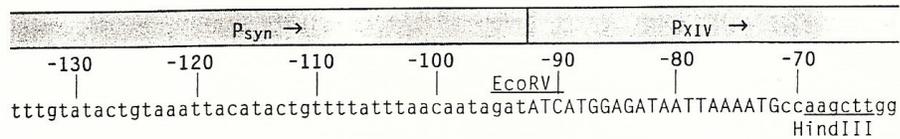
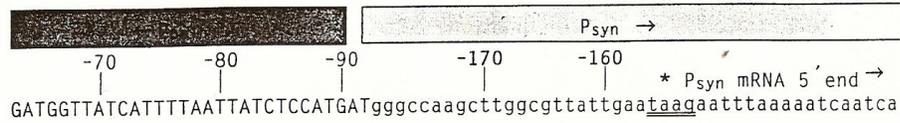
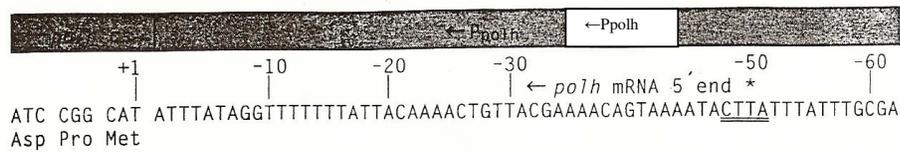
Figura 13 - Plasmídeo pBS e seu Múltiplo Sítio de Clonagem (MCS) (Stratagene).

5.3) Plasmídeo de transferência pSynXIV VI⁺X3 (pSyn):

O plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 oferece condições para a co-expressão do gene heterólogo e da poliedrina. O promotor híbrido é composto por uma seqüência artificial P_{syn} e o promotor modificado da poliedrina P_{XIV}. O plasmídeo é co-transfectado com o vírus vSyn VI⁺gal (vírus ocluso negativo com *lacZ* no lugar do *polh*), resultando num recombinante, com fenótipo de placa branca e ocluso positivo. Na nomenclatura deste plasmídeo, XIV refere-se ao promotor P_{XIV}; VI⁺ refere-se à presença da seqüência da poliedrina na região *Hind* III-*V*/*Eco* RI-I; e X3 refere-se aos sítios de clonagem utilizados (O'Reilly *et al.*, 1992). O pSynXIV VI⁺X3 difere do pSynXIV VI⁺ apenas na seqüência do *polylinker* (Wang *et al.*, 1991). Este plasmídeo foi cedido pela Dra. Lois K. Miller (Universidade da Georgia - EUA).



pSynXIV VI⁺



pSynXIV VI⁺X3

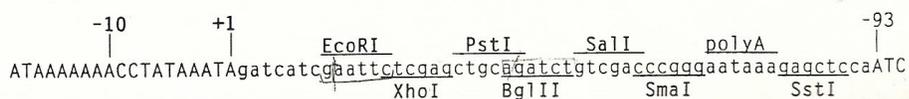


Figura 14 - Plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 e em detalhe os sítios de clonagem (O'Reilly *et al.*, 1992).

5.4) Plasmídeo pFastBac HTc (HTc):

Este plasmídeo foi obtido diretamente do fornecedor (Invitrogen) e possui: o promotor da poliedrina que permite eficiente nível de expressão da proteína heteróloga, cauda de histidina (6xHis tag) que permite a purificação da proteína heteróloga utilizando resina, sítio de reconhecimento TEV que permite a remoção da cauda N-terminal da proteína recombinante utilizando protease TEV, sítio múltiplo de clonagem, sinal de poliadenilação SV 40 que permite a eficiente transcrição e poliadenilação do mRNA, Tn7L e Tn7R que são elementos mini Tn7 que permitem a transposição sítio-específica do gene de interesse no genoma do baculovírus, origem f1 que permite o resgate do DNA fita simples, gene de resistência a ampicilina que permite a seleção do plasmídeo em *E. coli*, origem pUC que permite replicação de muitas cópias e manutenção em *E. coli* e gene de resistência à gentamicina que permite a seleção do bacmídeo recombinante em *E. coli* DH10Bac.

Foi escolhido o plasmídeo pFastBac HTc com base na seqüência do gene da pré-pró-renina.

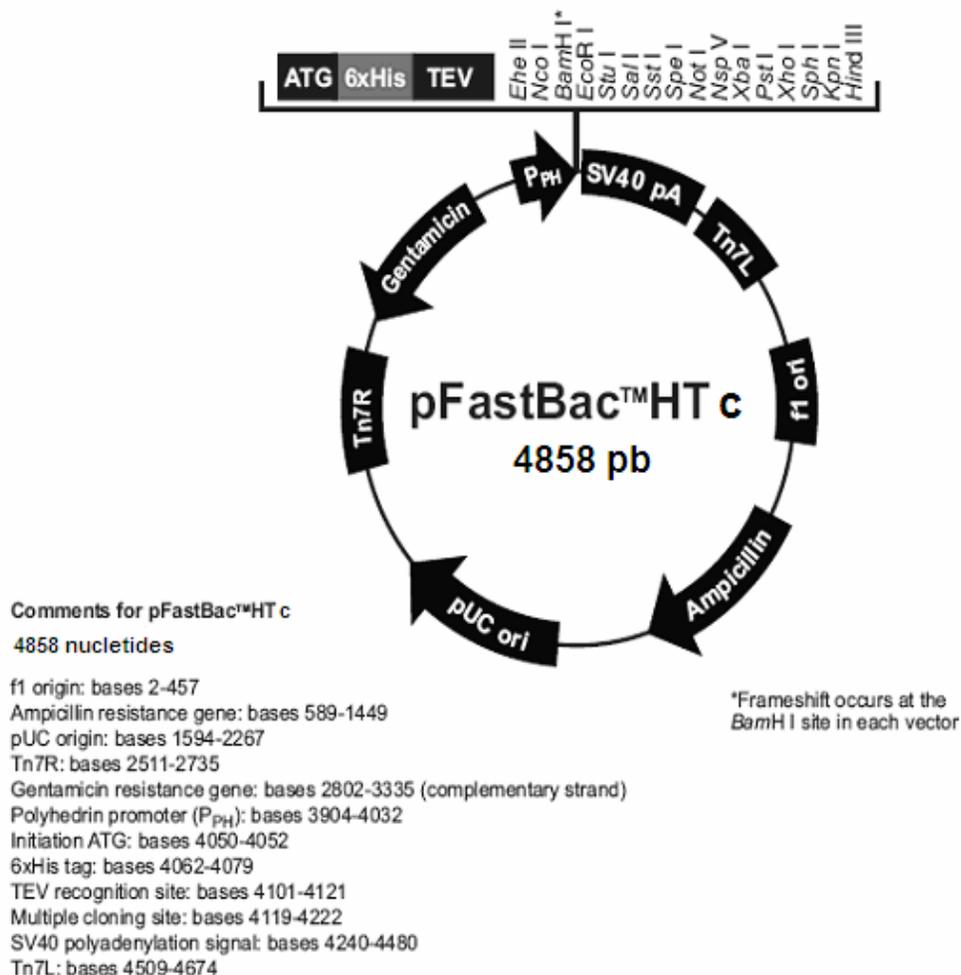


Figura 15 - Plasmídeo pFastBac HTc (Invitrogen- www.invitrogen.com).

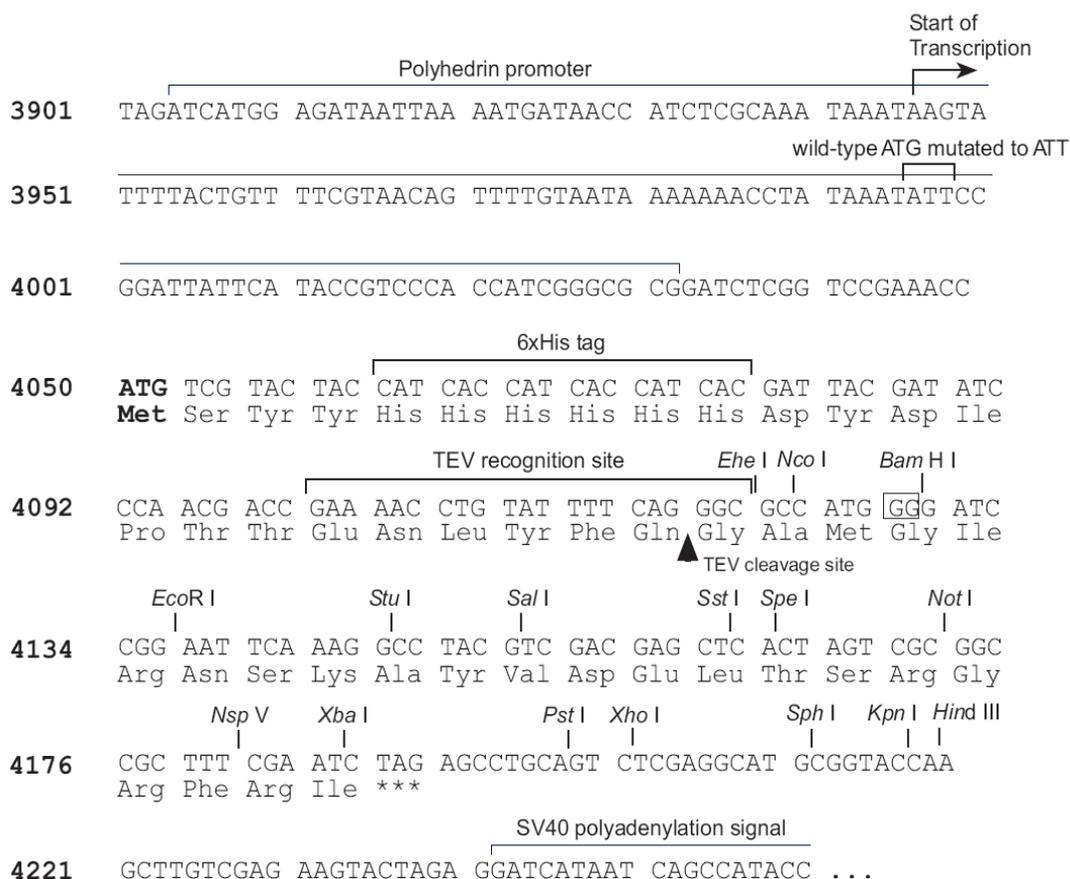


Figura 16 - Múltiplo sítio de clonagem do pFastBac HTc. O ATG inicial está em negrito. Sítios de restrição estão marcados para indicar o sítio de clivagem atual. O nucleotídeo no quadrado indica a região variável. Obs: No HTc, há um stop códon no sítio *Xba I* que está em frame com a cauda N-terminal (Invitrogen - www.invitrogen.com).

6) Oligonucleotídeos sintéticos (*primers*):

Nome	sequência (5'→3')
Ren forward	GGGAAGCATGGATGGATGG
Ren reverse	TCGCCTTGCCCGCTGA
M13 forward	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA

7) Anticorpos:

Foram utilizados o anticorpo policlonal de coelho anti-renina humana (anticorpo primário) e o anticorpo de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (anticorpo secundário) da Santa Cruz Biotechnology.

8) Reagentes:

Todos os reagentes, incluindo enzimas de restrição, utilizados foram dos seguintes fabricantes: Sigma Chemical Co., Merck, Amersham, GIBCO-BRL, Promega, Invitrogen, SeaKem, Bio-Rad e New England BioLabs.

9) Soluções:

Solução de agarose para plaque assay

- 0,25 g (0,5%) de agarose Seaplaque ME (Seakem - FMC BioProducts) em 10 mL de dH₂O foi autoclavado e ao resfriar atingindo 60°C foi diluído com 40 mL de meio TNMFH completo.

Proteinase K

- Proteinase K 20 mg/mL; Tris 50 mM, pH 8,0; acetato de cálcio 5 mM. A solução foi estocada a -20°C.

Fenol saturado

- Fenol 1 volume; 8-hidroxiquinolina 0,1%; β-mercaptoetanol 0,2%. A solução foi equilibrada com solução Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0.

Fenol saturado para extração de bandas (v/v)

- Fenol : tampão Tris 0,1 M : NaCl 5 M (5 : 5 : 1).

Clorofil (v/v)

- Clorofórmio : álcool isoamílico (24 : 1).

Clorofane (v/v)

- Fenol saturado : clorofil (25 : 1).

Éter hidratado (v/v)

- Éter : água (1 : 1).

Sal : etanol (v/v)

- Acetato de sódio 3 M pH 5,2 : etanol absoluto (1 : 9).

Solução I (“maxi-prep”)

- Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM.

Solução II (“maxi-prep”)

- NaOH 0,2 M; SDS 1%. Essa solução foi preparada no momento do uso.

Solução III (“maxi-prep”)

- Acetato de potássio 5 M 60 mL; ácido acético glacial 11,5 mL; dH₂O q.s.p. 100 mL.

Solução I (“mini-prep Bac-to-Bac”)

- Tris-HCl 15 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase 100 µg/mL. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução II (“mini-prep Bac-to-Bac”)

- NaOH 0,2 M; SDS 1%. A solução foi esterilizada por filtração.

Solução STET

- Sucrose 8%; Triton X-100 5%; EDTA 50 mM; Tris base 50 mM; pH 8,0 (HCl).

Fixador para microscopia eletrônica

- Cacodilato sódico 0,1 M; glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 10%; pH 7,0.

Soluções para gel (SDS-PAGE):

1) Solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida 30% para SDS-PAGE

- Acrilamida 73 g; N’N’-bis-metileno-acrilamida 2 g. A solução foi completada para 250 mL com dH₂O e estocada em frasco escuro a 4°C.

2) Gel separador 15%

- Água 7,5 mL; Tris-HCl 1,5 M 7,5 mL, pH 8,8; SDS 10% 300 µL; estoque de acrilamida/bisacrilamida 30% 15,0 mL; persulfato de amônia 10% 150 µL e tetrametil etilenodiamina (TEMED) 15 µL. Este volume foi suficiente para montagem de dois mini-géis (sistema mini-protean II da Bio-Rad) ou para um gel grande.

3) Gel concentrador 4%

- Água 12,2 mL; Tris-HCl 0,5 M 5 mL, pH 6,8; SDS 10% 200 µL; estoque de acrilamida/bisacrilamida 30% 2,6 mL; persulfato de amônia 10% 100 µL e TEMED 20 µL. Este volume foi suficiente para dois mini-géis ou um gel grande.

4) Solução de Azul de Coomassie

- Ácido acético 7,5%; metanol 40%; azul de coomassie (R-250) 0,1%; dH₂O q.s.p.

5) Solução fixadora ou descorante para SDS-PAGE

- Ácido acético 7,5%; metanol 40%; dH₂O q.s.p.

6) Solução fixadora para SDS-PAGE com proteínas radiomarcadas (v/v)

- Isopropanol : água : ácido acético (25 : 65 : 10)

Soluções para Western blotting:

1) Solução bloqueadora (método 1)

- Gelatina 5% (5 g) em PBS (100 mL) ou BSA 3% (3 g) em PBS (100 mL).

Solução bloqueadora (método 2)

- Leite em pó desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) 5% (5 g) em TBS T 1X (100 mL).

2) Solução reveladora (método 1)

- Solução A: 30 mg de HRP *color reagent* e 10 mL de metanol gelado.

- Solução B: 30 µL de água oxigenada 30% e 50 mL de PBS 1X.

- As duas soluções foram misturadas apenas no momento do uso.

10) Tampões:

Tampão Tris-EDTA, pH 8,0 (TE)

- Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM.

Tampão salina-fosfato 1X (PBS 1X)

- Na₂HPO₄.7H₂O 1 mM; KH₂PO₄ 10,5 mM; NaCl 140 mM; KCl 40 mM; pH 6,2.

Tampão salina-fosfato Tween 1X (PBS T 1X)

- Tween-20 0,05% em PBS 1X.

Tampão salino de Tris com Tween-20 10X (TBS T 10X)

- Tris base 20 mM (12,1 g); cloreto de sódio 137 mM (40,0 g); ácido clorídrico (8,8 mL); Tween-20 0,1% (5,0 mL); dH₂O q.s.p. 500 mL; pH 7,5.

Tampão de amostra para DNA 5X (loading buffer)

- Azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficoll 15%.

Tampão de lise para tecido RIPA

- Tris HCl 50 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; desoxicolato de sódio 0,5%; SDS 0,1%.

Tampão Tris-Acetato 50X (TAE 50X)

- Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA 0,5 M 100 mL, pH 8,0; dH₂O q.s.p. 1.000 mL.

Tampão de amostra para proteínas 5X

- SDS 2%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,025%; β-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8. A solução foi completada com água bidestilada.

Tampão de corrida estoque para SDS-PAGE 5X

- Tris base 15 g; glicina 72 g; SDS 5 g; dH₂O q.s.p. 1.000 mL. Foi utilizada concentração final de tampão de corrida para SDS-PAGE 1X (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%).

Tampão de transferência 5X (western blotting)

- Trisma base 48 mM; glicina 39 mM; SDS 0,037%; metanol 20%.

11) Meios de cultura:

11.1) Meio de cultura de células de inseto:

Para manutenção das linhagens celulares, foi utilizado o meio de cultura para células de inseto TNMFH segundo Hink (1970). Além da adição do antibiótico/antimicótico (GIBCO BRL), o meio foi complementado com Soro Bovino Fetal estéril (GIBCO BRL) e livre de micoplasma, inativado a 60°C/30 min., em concentração final de 10% (meio completo). Nos experimentos de infecção, transfecção e em diluições virais para *plaque assay* foi utilizado o

meio TNMFH sem soro durante o período de adsorção para evitar a inibição da adsorção de partículas virais nas células, propiciando assim uma melhor infecção.

11.2) Meio de cultura para bactérias - LB:

O meio LB (Luria-Bertani) foi utilizado para crescimento de bactérias transformadas e preparado utilizando os seguintes reagentes: bactotripton 10 g; extrato de levedura 5 g; cloreto de sódio 0,2 M (10 g) e completado o volume para 1.000 mL com dH₂O. O meio foi autoclavado. No caso de preparo de meio sólido para placas, foi adicionado ágar 1,4% (14 g).

Para seleção de transformantes resistentes à ampicilina, foram adicionados 100 µg/mL do antibiótico ao meio. Os ensaios de atividade de β-galactosidase (fenótipo de cor azul ou branco) foram feitos em meio sólido, adicionando-se 25 µg/mL de x-gal e 20 mg/mL de IPTG (indutor da enzima) ao meio.

Para seleção dos transformantes oriundos de DH10Bac (bacmídeo recombinante, BacRen) resistentes a gentamicina, kanamicina e tetraciclina, foram adicionados 7 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL dos respectivos antibióticos. Os ensaios de atividade de β-galactosidase (fenótipo de cor azul ou branco) foram feitos em meio sólido, adicionando-se 100 µg/mL de x-gal e 40 µg/mL de IPTG.

Metodologia

Métodos gerais

1) Digestão de DNA com enzimas de restrição:

Diversas enzimas de restrição, como *Bam* HI, *Sal* I, *Hind* III, *Xho* I, *Xba* I e *Bgl* II, foram utilizadas para a clivagem de DNA com seus respectivos tampões 10X ou, em caso de digestão em que duas enzimas tivessem que ser usadas simultaneamente e possuíssem tampões diferentes, foi utilizado o tampão 10X One-Phor-All (Pharmacia), observando as condições recomendadas para cada enzima. Para cada digestão foram utilizados aproximadamente de 100 a 800 ng de DNA e de 5 a 20 U de enzima. Em digestões para isolar fragmentos de DNA de interesse foram utilizados de 1,5 µg a 4,0 µg de DNA e de 10 a 40 U de enzima.

2) Eletroforese em gel de agarose:

Para análise de DNA, os géis de agarose foram preparados numa concentração de 0,8% em TAE 1X contendo 200 µg/L de brometo de etídeo. A agarose foi derretida em forno de microondas até que a solução ficasse homogênea, resfriada a 65°C e derramada na bandeja (cama), com o pente apropriado, da cuba de eletroforese para solidificação. Uma vez solidificado, o gel foi submergido na cuba contendo TAE 1X e 200 µg/L de brometo de etídeo.

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para DNA (concentração final 1X) e aplicadas nos poços do gel. A corrida foi feita utilizando uma corrente elétrica constante de 80 V.

3) Recuperação de bandas isoladas em gel de agarose:

Para recuperação da banda de pré-pró-renina resultante de digestão, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (*low melting point* - SeaKem) sem brometo de etídeo. A agarose de baixo ponto de fusão possui a propriedade de derreter a 68°C, temperatura inferior a que ocorre a desnaturação de DNAs, permitindo portanto a purificação de bandas.

Como os fragmentos extraídos do gel tinham como objetivo a purificação e clonagem, não foi, portanto, utilizado o corante brometo de etídeo no sistema de eletroforese. Como controle, uma pequena alíquota do material a ser purificado foi submetido à eletroforese no

mesmo gel, bem como o marcador de peso molecular, distante do poço da amostra principal. Após a corrida, o lado do gel contendo o marcador e a alíquota foi cortado, corado em tampão TAE 1X contendo brometo de etídeo, visualizado sob luz UV sobre filme plástico ao lado da parte não corada do gel. Por comparação, foi cortada a região correspondente à banda desejada da parte não corada.

A agarose com a banda de interesse foi submetida ao banho maria a 68°C por cerca de 5 min. Imediatamente após derretimento da agarose, foi feita a extração do DNA com fenol saturado contendo NaCl 1 M e a extração da fase aquosa com clorofane e clorofil. Em seguida, a precipitação com sal : etanol e lavagem com etanol 70% foram feitas. O precipitado (DNA) foi secado e ressuscitado em TE e uma alíquota usada em nova eletroforese para checagem da pureza, integridade e quantificação do fragmento. O DNA foi mantido a 4°C.

4) Preparação de células competentes XL-1 blue:

Células competentes foram preparadas de acordo com Mandel & Higa (1970), com modificações. Um inóculo de 500 µL de células XL-1 blue crescidas em 5 mL de meio LB a 37°C por 12 h foi utilizado para inocular 500 mL de meio LB. O meio inoculado foi incubado a 37°C sob agitação (200 rpm). As células foram deixadas crescendo até o início da fase exponencial quando sua absorbância A_{660} atingia o valor 1,0. O frasco foi colocado no gelo e em seguida o material centrifugado a 12.000 x g/5 min. a 20°C. O precipitado foi lavado em CaCl_2 0,1 M gelado. O precipitado foi novamente ressuscitado no mesmo volume da solução acima e deixado no gelo por 1 h. As células foram então coletadas por centrifugação (10.000 x g/10 min.) e ressuscitadas cuidadosamente em 10 mL de CaCl_2 0,1 M gelado em glicerol 20%. O material foi aliqotado, em tubos de microcentrífuga, no volume de 300 µL e estocados a -80°C por no máximo dois meses.

5) Transformação de células competentes XL-1 blue:

A transformação de células competentes seguiu o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Foi utilizada a técnica de transformação por cloreto de cálcio, que aumenta a permeabilidade da membrana celular e facilita a entrada do plasmídeo.

Foi adicionado ao DNA plasmídeo 100 µL de células competentes, os quais foram incubados no gelo por 30 min., seguido por choque térmico a 42°C por 90 segundos (s.) e novamente incubados no gelo por 5 min. Posteriormente foi adicionado 1 mL de meio de cultura (LB), seguido de incubação a 37°C por 1 h para restabelecimento e crescimento das células transformadas. As células foram precipitadas à baixa centrifugação (1.000 x g/2 min. a

temperatura ambiente em Centrifuge 5415C *eppendorf*[®]), o precipitado ressuspendido em 200 µL de LB e plaqueado em meio LB sólido. Após incubação a 37°C por 18 h, foi observado o aparecimento de colônias na placa.

6) Transformação de células competentes DH10Bac:

A transformação de células competentes seguiu o protocolo descrito no manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen).

Em *eppendorf*, foram adicionados ao DNA plasmideal (pFastBac HTc e HTcRen) 100 µL de células competentes, misturando gentilmente, os quais foram incubados no gelo por 30 min. Em seguida, foi dado um choque térmico de 42°C por 45 s. e novamente incubados no gelo por 2 min. Foram adicionados 900 µL de meio LB, e incubados a 37°C por 4 h a 225 rpm para restabelecimento e crescimento das células transformadas. As células foram precipitadas a baixa centrifugação (1.000 x g/2 min. a temperatura ambiente em Centrifuge 5415C *eppendorf*[®]), o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de LB e plaqueado em meio sólido LB contendo kanamicina, tetraciclina, gentamicina, IPTG e x-gal. Após incubação a 37°C por 48 h, foi observado o aparecimento de colônias.

O plasmídeo pUC19 utilizado como controle, foi deixado na incubadora a 37° C a 225 rpm por 1 h e plaqueado em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina.

7) Isolamento de plasmídeos por fervura (“mini-prep”):

Conforme descrito por Holmes and Quigley (1981) uma única colônia bacteriana, que cresceu em placa de meio LB, foi inoculada em 2 mL de meio LB (com 150 µg/mL de ampicilina) em um tubo e incubada sob agitação a 37°C por 14 h. Foi transferido 1,5 mL do inóculo crescido para um tubo de microcentrífuga e o volume de 500 µL restante foi guardado a 4°C para, se necessário, servir de inóculo posterior. O tubo foi centrifugado em microcentrífuga (Centrifuge 5415C *eppendorf*[®]) na velocidade máxima (12.000 x g) por 20 s. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 300 µL da solução STET com lisozima (0,67 mg/mL, suficiente para lisar as paredes celulares das bactérias) sob agitação no vórtex. O material foi colocado no gelo de 30 s. a 10 min. e em seguida no banho fervente por 90 s. O tubo foi novamente centrifugado por 20 min. na velocidade máxima. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de isopropanol gelado para precipitar o plasmídeo. O tubo foi colocado a -20°C por aproximadamente 20 min. e centrifugado por 5 min. na velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi secado na centrífuga à vácuo por 15 min. e ressuspenso em 40 µL de TE.

8) Isolamento de DNA de bacmídeo recombinante:

Para o isolamento do bacmídeo recombinante (BacRen) foi seguido o protocolo descrito no manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen).

Foi utilizada uma ponteira estéril para inocular uma única colônia bacteriana branca, isolada em placa seletiva de meio LB sólido (IPTG, x-gal, kan, tetra, genta), em 2 mL de meio LB contendo kanamicina, tetraciclina e gentamicina. A cultura foi crescida em incubadora a 37°C agitando (225 rpm) até que as células atingissem a fase estacionária. Foram transferidos 1,5 mL da cultura bacteriana para um tubo *ependorf* e centrifugados a 14.000 x g em microcentrífuga (Centrifuge 5415C *ependorf*®) por 1 min. para precipitar as células. O sobrenadante foi removido por aspiração e o *pellet* ressuspenso em 0,3 mL de solução I por vórtex, seguida da adição de 0,3 mL de solução II e incubação a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de acetato de potássio 3 M (pH 5,5) ao material, colocado no gelo por 5-10 min. e centrifugado a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi gentilmente transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 0,8 mL de isopropanol. O tubo foi invertido algumas vezes para misturar o material e colocado no gelo por 5-10 min. A amostra foi centrifugada por 15 min. a 14.000 x g a temperatura ambiente e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. Foi adicionado 0,5 mL de etanol 70% ao *pellet* e o tubo foi invertido algumas vezes para lavagem do *pellet*. O tubo foi centrifugado por 5 min. a 14.000 x g a temperatura ambiente. O máximo possível do sobrenadante foi removido e o *pellet* secado por 5-10 min. a temperatura ambiente. O DNA do bacmídeo recombinante foi dissolvido em 30 µL de TE (pH 8,0) e armazenado a 4°C.

9) Amplificação de plasmídeos:

Após a seleção das colônias contendo os plasmídeos de interesse, escolhia-se uma para amplificação. A colônia escolhida foi inoculada em 500 mL de meio LB seletivo (100 µg/mL de ampicilina) e incubada a 37°C sob agitação (200 rpm - Orbit Environ Shaker; Lab-Line Instruments) por 18 h. Os plasmídeos foram purificados através de maxiprep.

10) Purificação do DNA plasmideal por lise alcalina (maxiprep):

Conforme adaptação do método descrito por Sambrook *et al.* (1989), a colônia bacteriana transformada de interesse foi escolhida e crescida em 500 mL de meio LB a 37°C por 18 h. A coleta das células foi feita por centrifugação do material crescido em centrífuga (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor GS-3) a 5.000 x g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 33,3 mL de solução I

gelada com o auxílio de pipeta e ao final misturado vigorosamente (vórtex). Foram adicionados 66,7 mL de solução II, misturados por inversão do tubo, e incubado no gelo por 10 min. Foram acrescentados 50 mL de solução III gelada e o tubo foi agitado vagarosamente por inversão. O material foi transferido para tubos Corex de 30 mL e incubado em gelo por 5 min. Nova centrifugação foi feita a 12.000 x g por 10 min. a 4°C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor SS-34) e os sobrenadantes foram transferidos à novos tubos. Aos sobrenadantes foram adicionados 150 mL de isopropanol, mantendo-se no gelo por 5 min. e centrifugados a 12.000 x g por 15 min. a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* secados a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h. Os *pellets* foram ressuspensos em 50 mL de tampão TE usando o vórtex. Para a desagregação e remoção de proteínas do DNA, foram adicionados e misturados 27,5 mL de acetato de amônio 7,5 M ao material ressuspensado. O material foi centrifugado a 4°C por 10 min. a 12.000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e precipitados com 175 mL de etanol absoluto a -20°C *overnight*. O material foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 20 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com 170 mL de etanol 70% (centrifugar a 10.000 x g por 5 min. a 4°C), secados a temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de tampão TE com RNase (10 µg/mL) para incubação a 37°C por 30 min. a *overnight*. Para maior pureza do DNA, foi realizada uma segunda extração do DNA utilizando, desta vez, fenol e precipitação com etanol conforme já descrito. O *pellet* foi secado a temperatura ambiente, ressuspensado em 1 mL de TE e conservado a 4°C. A concentração do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

11) Rotina de manutenção de células de inseto:

Observada a confluência das células (Sf21 e High Five), foi feito o subcultivo na concentração de 1×10^6 células por frasco T-25 (Corning), com meio TNMFH completo (com soro bovino fetal 10%). As células foram mantidas em incubadora a 27°C.

12) Co-transfecção:

Para recombinação homóloga do DNA do vírus e do plasmídeo foi utilizada uma adaptação do processo descrito por O'Reilly *et al.* (1992) de transfecção mediada por lipossomos. Os controles com DNA viral de AcMNPV-L1, AgMNPV-2D e vSyn VIgal, foram feitos para confirmação da validade da metodologia.

Placas de Petri descartáveis de 60 mm foram semeadas, em meio TNMFH com soro, com 8×10^5 células e incubadas a 27°C por 2 h para permitir a aderência das células.

Alternativamente, foram sedimentadas $6,6 \times 10^5$ células em cada poço, de uma placa de 6 poços, e incubadas a 27°C por cerca de 1 h para as células aderirem à placa. Foram misturados 30 µL de lipofectina (GIBCO) com 1,5 mL de meio TNMFH sem soro em um tubo de poliestireno. Em outro tubo, foi misturado 1 µg do DNA do vírus vSyn VIgal linearizado com *Bsu* 36I e de 2-4 µg do DNA do plasmídeo pSynRen em 1,5 mL de meio TNMFH sem soro.

As soluções diluídas de DNA e lipofectina foram misturadas gentilmente e deixadas para descansar por 5 min. Em seguida, o meio das células foi removido por aspiração e a mistura DNA/lipofectina foi adicionada às células. Foi feita incubação de 4 a 5 h a 27°C. Após este período, a mistura de transfecção foi aspirada das células. As células foram lavadas uma vez com meio TNMFH sem soro e em seguida foram adicionados 3 mL de meio TNMFH com soro. Foram incubadas por 5 ou 6 dias a 27°C, com observação diária para visualização de células infectadas. As células devem apresentar sinais de infecção no quarto ou quinto dia pós-infecção.

As células transfectadas e/ou infectadas e os controles foram observados por microscopia ótica (Olympus CK-2) e fotografadas em aumento final de 320x (microscópio Axiovert e câmera fotográfica Contax).

13) Microextração rápida de DNA viral a partir de células:

Conforme adaptação do método descrito por J. F. Maruniak, células infectadas, em frasco T-25, foram descamadas e sedimentadas a 3.000 rpm por 5 min. em centrífuga clínica de bancada (Centra MP4R da International Equipment Company). Em seguida o sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspenso em 400 µL de EDTA 10 mM, pH 7,6 e transferido para tubo de microcentrífuga. Foram então adicionados 12,4 µL de SDS 20% misturando gentilmente e feita a incubação a temperatura ambiente por 30 min. Foram adicionados 103,2 µL de NaCl 5 M misturando gentilmente e incubados no gelo por 10 min. (ou mais que 3 h a 4°C). O material foi centrifugado por 5 min. a 14.000 rpm em microcentrífuga (Centrifuge 5415C *ependorf*®) para sedimentar o DNA cromossomal e o sobrenadante foi transferido para tubos novos de 1,5 mL. Foram adicionados 20 µL de proteinase K (5 mg/mL) e feita a incubação a 37°C *overnight*.

Para dar início ao processo de extração do DNA, foram adicionados 400 µL de fenol, homogeneizando o material invertendo o tubo por 5 min., e o tubo foi centrifugado por 5 min. a 14.000 rpm em microcentrífuga. A fase de cima (aquosa) foi transferida para novo tubo e adicionada de 400 µL de clorofane homogeneizando por inversão durante 5 min. Foi feita novamente centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. e a fase de cima foi transferida para novo

tubo. Foi então adicionado 1 mL de éter hidratado homogeneizando por 5 min. e centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. A fase de cima foi descartada e os tubos abertos foram aquecidos a 56°C por 10 min. para evaporar o excesso de éter. Foram adicionados 400 µL de LiCl 4 M e o material armazenado a 4°C por 3 h a *overnight*. Foi feita centrifugação por 5 min. a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. O volume de cada amostra foi completado para 360 µL com TE ou as amostras foram divididas em 360 µL por tubo de 1,5 mL. Cada amostra foi precipitada com 900 µL de sal : etanol. As amostras foram bem misturadas invertendo os tubos. As amostras foram centrifugadas por 30 min. a 14.000 rpm e os sobrenadantes descartados. Após secagem, os *pellets* foram ressuspensos em 49 µL de TE + 1 µL de RNase (10 mg/mL) e incubados a 37°C por 15 min. Foram adicionados 50 µL de TE e o DNA precipitado com 50 µL de NH₄Ac 7,5 M e 300 µL de etanol 100% gelado. Após nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 min., foi feita a lavagem do material com etanol 70%, onde foram adicionados 500 µL de etanol 70% e as amostras centrifugadas por 2 min. a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* secados. O DNA foi ressuspensado em 20 µL de TE e incubado a 60°C por 30 min. para garantir que o DNA fosse solubilizado.

14) PCR:

A reação em cadeia da polimerase (PCR), é um método comum para se obter grande quantidade de um fragmento específico de DNA. As reações foram realizadas em termociclador MiniCycler PT-150 da MJ Research. Os sistemas foram feitos com água milli-Q, contendo as concentrações finais de: 10 ng de DNA molde; 400 ng ou 0,5 µM de cada *primer*; 0,4 mM de cada dNTP; 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (polimerase termoestável); tampão de PCR 1X (*PCR buffer*) e MgCl 1,5 mM. A mistura foi coberta com 60 µL de óleo mineral.

Para a cópia da região codificadora da pré-pró-renina em plasmídeos, foram utilizados os *primers* específicos internos à pré-pró-renina *Ren forward* e *Ren reverse* para amplificação do gene.

A amplificação da renina foi realizada de acordo com as condições a seguir:

- passo I (desnaturação inicial): 94°C / 2 min.;
- passo II (desnaturação): 94°C / 1 min.;
- passo III (anelamento): 56°C / 1 min.;
- passo IV (elongação): 72°C / 2 min.;
- passo V: repetição dos passos de II-IV por 32 ciclos;

- passo VI: alongação final 72°C / 10 min.;
- manutenção a 4°C até análise.

Para a multiplicação da região codificadora da pré-pró-renina após sua inserção no bacmídeo, foi utilizada PCR utilizando os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* para amplificação do gene, além da sua amplificação com os *primers* específicos internos da pré-pró-renina.

A amplificação da parte do bacmídeo recombinante BacRen em que se encontrava a pré-pró-renina foi realizada de acordo com as condições a seguir:

- passo I (desnaturação inicial): 93°C / 3 min.;
- passo II (desnaturação): 94°C / 45 s.;
- passo III (anelamento): 55°C / 45 s.;
- passo IV (elongação): 72°C / 5 min.;
- passo V: repetição dos passos de II-IV por 30 ciclos;
- passo VI: alongação final 72°C / 7 min.;
- manutenção a 4°C até análise.

15) Gel desnaturante de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE):

Para análise de proteínas, o sistema de separação eletroforética foi feito como descrito por Laemmli (1970). Os géis de poliacrilamida foram preparados numa concentração de 15% para o gel separador e 4% para o gel concentrador. Após a preparação do gel separador ele foi vertido entre as placas de vidro apropriadas. Após um período de 45 min., necessários para a solidificação do gel separador, foi preparado o gel concentrador, vertido entre as placas sobre o gel separador e o pente foi encaixado entre as placas. Uma vez solidificado o gel concentrador, as placas com o gel foram encaixadas na cuba e submergidas em tampão de corrida SDS-PAGE 1X. O equipamento Mini-protean II, Electrophoresis Cell da Bio-Rad foi utilizado para análise do perfil de proteínas.

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para proteínas (concentração final 1X), aplicadas nos poços do gel e uma corrente elétrica com voltagem constante de 60 V foi aplicada até que as amostras atingissem o gel separador, onde a voltagem foi aumentada para 80-120 V. O peso molecular das proteínas foi determinado por co-migração de proteínas de peso molecular conhecido (marcadores).

Para visualização dos perfis, o gel foi imerso em solução de azul de Coomassie por 3 h, sob agitação, seguida por descoloração, feita através de várias trocas da solução fixadora para SDS-PAGE.

Para a preparação das amostras oriundas de cultura de células a serem aplicadas no gel, inicialmente, as células foram ressuspensas do frasco T-25, sedimentadas (2.000 x g/2 min.) e 1 mL de cada sobrenadante foi secado à vácuo para o volume final de aproximadamente 500 µL e ressuspensos em tampão de amostra, sendo o restante do sobrenadante armazenado a 4°C para posteriormente ser utilizado como inóculo para infecções. As células (*pellet*) oriundas de cada cultura em frasco T-25 foram lavadas com PBS 1X e ressuspensas em TE e tampão de amostra. As amostras ressuspensas no tampão de amostra foram desnaturadas por fervura em banho maria (100°C) durante 5 min. e então aplicadas no SDS-PAGE.

Para a preparação das amostras oriundas de lagartas a serem aplicadas no gel, inicialmente, 1-4 lagartas foram maceradas com um bastão de vidro em *ependorfs* e suspensas em 200 µL de água destilada e em tampão de amostra. As amostras ressuspensas no tampão de amostra foram então desnaturadas por fervura (100°C) durante 5 min. e então aplicadas no gel.

Para a preparação de amostra oriunda de tecido de rim humano a ser aplicada no gel (controle positivo para o *western blotting*) foi seguido protocolo descrito pela abcam (*western blotting – A beginner's guide* em www.abcam.com/technical). Inicialmente, o tecido foi dissecado, colocado em tubos de microcentrífuga, imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para uso posterior ou a 4°C para a homogeneização imediata. Para ~5 mg de tecido, foi adicionado rapidamente 300 µL de tampão de lise RIPA e a amostra foi homogeneizada com um homogeneizador elétrico. A lâmina foi lavada duas vezes com 300 µL de tampão de lise RIPA e depois a amostra foi mantida em constante agitação por 2 h a 4°C. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 min. a 4°C em microcentrífuga (Centrifuge 5415C *ependorf*®). O tubo com a amostra foi removido gentilmente da centrífuga e colocado no gelo. O sobrenadante foi aspirado e colocado em novo tubo mantido no gelo. O *pellet* foi descartado. A amostra foi ressuspensa no tampão de amostra para proteínas 1X, desnaturada por fervura (100°C) durante 5 min. e então aplicada no gel.

16) Cinética da síntese de proteínas:

As células foram sedimentadas em placas 6-well (1,5 x 10⁶ células/poço). Após período de aderência das células (4 h a *overnight*), foi feita a infecção com o vírus recombinante. O meio de cultura foi removido das células, acrescentado o vírus e a placa foi incubada a 27°C

por 1 h. Após o período de adsorção, foram iniciados os pulsos com ^{35}S -metionina (Amersham Bioscience), o momento de remoção do vírus não adsorvido foi considerado como tempo zero. A cinética foi feita no período de 0, 24, 48 e 72 hp.i. Em cada uma dessas horas as células foram removidas do poço correspondente àquela hora e transferidas para tubos *eppendorfs* de 1,5 mL. Foram sedimentadas a 3.000 rpm em microcentrífuga (Centrifuge 5415C *eppendorf*[®]) por 3 min. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 1 mL de PBS (pH 6,2 e estéril) ao *pellet* celular e as células foram deixadas em *starvation* por 30 min. a 27°C. As células foram então sedimentadas a 3.000 rpm por 3 min. em microcentrífuga, sendo o sobrenadante descartado. Novamente foi acrescentado PBS (pH 6,2 e estéril) e as células sedimentadas a 3.000 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas em 500 μL de PBS, receberam ^{35}S -metionina (100 μCi /poço) e foram mantidas a 27°C por 1 h. As células foram sedimentadas por 2 min. a 3.000 rpm e o sobrenadante radioativo descartado. Ao *pellet* celular foi adicionado 1 mL de PBS e em seguida as células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 2 min. sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi ressuspensado em 100 μL do tampão de amostra para proteínas 1X e as amostras armazenadas a -20°C até que todas as amostras estivessem prontas para aplicar no gel. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

17) Autoradiograma da cinética da síntese de proteínas:

Para a detecção das proteínas, sintetizadas à 0, 24, 48 e 72 hp.i., radiomarcadas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, inicialmente as proteínas foram fixadas deixando o gel submerso em solução fixadora para SDS-PAGE com proteínas radiomarcadas por aproximadamente 30 min. A solução fixadora foi descartada em um *container* de rejeito radioativo e o gel mantido em reagente fluorográfico Amplify NAMP 100 (Amersham Bioscience) com agitação por 25 min. O gel foi removido da solução e secado à vácuo a 70°C. O gel seco foi colocado em contato com filme radiográfico (Filme X-OMAT Kodak) no cassete (cassete com tela amplificadora) a -80°C . Após a exposição de 3 a 10 dias, o filme foi revelado (Revelador Dektol Kodak), fixado (Fixador Kodak) e analisado.

18) Transferência do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose (Western):

A realização da transferência das proteínas do gel para a membrana foi feita conforme protocolo descrito por Harlow & Lane (1988). Foi utilizado o equipamento *Trans-blot Semi-Dry Eletroforetic Transfer Cell* (Bio-Rad).