

**SINTESE DA RENINA HUMANA  
UTILIZANDO O SISTEMA DE  
EXPRESSÃO BACULOVIRUS Bac-to-Bac**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 0102 0110  
Dezembro, 2007

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 207**

## **SINTESE DA RENINA HUMANA UTILIZANDO O SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVIRUS Bac-to- Bac**

Dulcyane Neiva Mendes

William Sihler

Francisco de Assis Rocha neves

Luiz Alberto Simeoni

Marlinda Lobo de Souza

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF  
2007*

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica: *Daniele Alves de Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

S 618 Síntese da renina humana utilizando o sistema de expressão baculovirus Bac-to-Bac / Dulcyane Neiva Mendes ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
25 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 207).

1. Baculovirus recombinante - construção - recombinação homóloga 2. Inseto - co-transfecção de células. 3. Vírus - vSyn VI gal. 4. Pré-pró-renina humana - gene.  
I. Mendes, Dulcyane Neiva. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

# SINTESE DA RENINA HUMANA UTILIZANDO O SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVIRUS Bac-to- Bac

---

Dulcyane Neiva Mendes<sup>1</sup>

William Sihler<sup>2</sup>

Francisco de Assis Rocha Neves<sup>3</sup>

Luiz Alberto Simeoni<sup>4</sup>

Marlinda Lobo de Souza<sup>5</sup>

## Resumo

A renina humana, uma glicoproteína, é uma enzima circulante produzida principalmente pelos rins em resposta ao baixo volume da pressão sanguínea ou baixo conteúdo de NaCl corpóreo, mediado através da rápida liberação de [prostaglandinas](#). No presente trabalho, o sistema comercialmente disponível Bac-to-bac (Invitrogen) foi utilizado para expressar a renina humana baseado na capacidade de produzir altas quantidades da proteína heteróloga e promover glicosilação semelhante a eucariotos superiores. Este método é baseado em transposição sítio-específica da expressão de um cassette no vetor binário de baculovírus (bacmídio) propagado em *E. coli*. Um fragmento de 1,4 kb, contendo o gene da pré-pró-renina foi inicialmente inserido no plasmídeo doador pFastBac HT C e transformado em células competentes DH10Bac. O DNA do bacmídio recombinante foi então extraído e transfectado em células de insetos para gerar um vírus recombinante ocluso negativo. A presença do gene foi confirmada em todas as etapas por PCR. Análise das proteínas virais foi feita por eletroforese SDS-acrilamida e revelou a expressão de duas proteínas de aproximadamente 35 e 50 kDa. Já que a renina é uma glicoproteína o seu tamanho pode ser modificado pela adição de cadeias laterais de carboidratos. Estudos correntes, utilizando análise imunológica, estão sendo feitos a fim de confirmar sua natureza. Os vírus recombinantes, vRenbac, também foram usados para infectar larvas de *Anticarsia gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda* através de dieta ou através de injeção. Bioensaios com larvas de *Spodoptera frugiperda* mostraram 100% de mortalidade utilizando o vírus recombinante. No caso de larvas de *Anticarsia gemmatilis* o vírus não-ocluso (vRenbac) causou uma mortalidade de 67% , além da cutícula do inseto ter se tornado rosácea.

---

<sup>1</sup> Farmacêutica, MsC, Universidade de Brasília

<sup>2</sup> **Biólogo, MsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

<sup>3</sup> **Médico, PhD, Universidade de Brasília**

<sup>4</sup> **Químico, PhD, Universidade de Brasília**

<sup>5</sup> **Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

## Abstract

### SYNTHESIS OF HUMAN RENIN USING THE Bac-to-Bac BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM

The human renin, a glycoprotein, is a circulating [enzyme](#) produced mainly by the kidneys in response to [low blood volume](#) or low body NaCl content, mediated through the rapid release of [prostaglandins](#). In the present work, the commercially available Bac-to-bac system (Invitrogen) was used to express the human renin based in its capacity to produce high amounts of heterologous proteins and to promote glycosylation similar to higher eukaryotes. This method is based on site-specific transposition of an expression cassette into a baculovirus shuttle vector (bacmid) propagated in *E. coli*. A fragment of 1.4 kb, containing the preprorenin gene, was first inserted in the pFastBac HT C donor plasmid and transformed in DH10Bac competent cells. The recombinant bacmid DNA was then extracted and transfected into insect cells to generate an occluded negative recombinant virus. The presence of the gene was confirmed in all steps by PCR. Analysis of the viral proteins was done by acrylamide-SDS electrophoresis and revealed the expression of two proteins of approx. 35 and 50 kDa.. Since renin is a glycoprotein its size can be modified by addition of carbohydrate side chains. Current studies, using immunological analysis, are being done in order to confirm its nature. The recombinant viruses, vRenbac, were also used to infect *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* larvae via diet or via injection. Bioassays with *Spodoptera frugiperda* larvae showed 100% mortality using the recombinant virus. In case of *Anticarsia gemmatalis* larvae the non-occluded virus (vRenbac) caused a mortality of 67% , besides the cuticle of the insect changed color to pink.

## Introdução

A síntese de renina é um fator limitante de todo o sistema renina-angiotensina (SRA). A renina atua sobre o angiotensinogênio ( $\alpha$ -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. 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).

Atualmente, diferentes sistemas de expressão gênica podem ser empregados visando uma maior produção de proteínas facilitando o processo de purificação. Dentre os objetivos dos diferentes sistemas de expressão estão a produção de proteínas em grandes quantidades, a custos baixos. Entretanto, o maior desafio está na obtenção de produtos ativos. Desta maneira, em geral, sistemas de expressão eucarióticos destacam-se por diversas vantagens sobre os sistemas procarióticos.

O sistema de expressão baculovirus se tornou uma importante ferramenta em biotecnologia. Dentre as vantagens para sua utilização estão: potencial para expressão de proteínas em altos níveis; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; capacidade para clonagem de grandes inserções; eficiência na expressão de genes contínuos (sem íntrons) e cDNAs; e simplicidade de manipulação.

Assim, a expressão da renina em sistema baculovirus poderá contribuir disponibilizando a 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.

Nesse trabalho é apresentada a construção de um baculovirus recombinante, por recombinação homóloga, após co-transfecção de células de inseto com o vírus vSyn VI gal e plasmídeo contendo o gene da pré-pró-renina humana.

## Material e Métodos

**1) Vírus:** Foi utilizado o vírus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) como controle positivo e como parte do kit Bac-to-Bac da Life Technologies.

**2) Células de inseto:** Foram utilizadas as linhagens de *Spodoptera frugiperda* (SF 21) e de *Trichoplusia ni* (*High five*) para os experimentos de transfecção e amplificação do vírus selvagem (AcMNPV-L1) e recombinante (vRenbac), bem como para análise por microscopia eletrônica. Para manutenção das linhagens celulares utilizou-se o meio de cultura para células de inseto TNMFH (GIBCO Laboratories), seguindo-se as instruções do fabricante para o seu preparo. Além da adição do antibiótico (sulfato de gentamicina, 100 µg/ml), o meio era complementado com 10% de Soro Bovino Fetal estéril e livre de micoplasma, inativado à 56°C/30 min (meio completo).

**3) 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. A linhagem DH10Bac contendo o DNA de AcMNPV, proveniente do kit Bac-to-Bac, também foi utilizada, segundo instruções do fabricante.

O meio LB (Luria-Bertani) foi utilizado para crescimento de bactérias transformadas:

Bactotripton 10 g; Extrato de levedura 5 g; Cloreto de sódio 0,2 M e completado o volume para 1.000 ml com dH<sub>2</sub>O. No caso de preparo de meio sólido para placas, adicionava-se ágar 1,4%.

Para seleção de transformantes resistentes à ampicilina, adicionava-se 100 µg/ml da mesma ao meio. Os ensaios de atividade de β-galactosidase (fenótipo de cor azul ou branco) eram feitos em meio sólido, adicionando-se 25 µg/ml de X-Gal e 20 µg/ml de IPTG.

**4) Plasmídeo pRHR1100:** O plasmídeo pRHR1100 contém a seqüência do gene da pré-pró-renina. O cassete de clonagem foi retirado pela digestão com *Bam* HI e *Hind* III.

**5) Plasmídeo pBluescript:** O plasmídeo pBluescript foi utilizado para adequar os sítios de clonagem do inserto da pré-pró-renina com os do plasmídeo de transferência.

**6) Plasmídeo de transferência (HTc):** O plasmídeo HTc é componente do kit Bac-to-Bac, contendo uma seqüência de seis histidinas a serem utilizadas para facilitar a purificação da

proteína e foi escolhido por oferecer o quadro de leitura (*open reading frame*) ideal para a clonagem do gene da pré-pró-renina.

#### 7) Oligonucleotídeos sintéticos (*primers*):

Nome	sequência (5'→3')
Ren <i>forward</i>	GGGAAGCATGGATGGATGG
Ren <i>reverse</i>	TCGCCTTGGCCCGCTGA
M13 <i>forward</i>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 <i>reverse</i>	CAG GAA ACA GCT ATG ACC

**8) Anticorpo anti-*renina*:** O anticorpo policlonal anti-*renina* foi cedido pelo Prof. Francisco Neves (Universidade de Brasília). Sua obtenção foi realizada pela inoculação de *renina* em coelhos de acordo com procedimento descrito por Harlow & Lane (1988). 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.

**9) Insetos:** Foram utilizadas as lagartas na transição do terceiro para o quarto *instar* de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho) e de *Anticarsa gemmatalis* (lagarta da soja) para os experimentos de infecção com o vírus recombinante vRenbac e com o vírus AcMNPV-L1 por injeção intrahemocélica.

## Métodos

**1) Amplificação viral** (segundo O'Reilly *et al.*, 1992): O vírus selvagem AcMNPV-L1, bem como o recombinante vRenbac, foram amplificados em cultura de células de inseto SF 21 e *High five*. As células eram então semeadas em placas de petri de 35 mm, numa concentração de  $1 \times 10^6$  células, e incubadas por uma hora com o inóculo viral. Adicionava-se em seguida, 1 ml de TNMFH por placa e as células eram mantidas em estufa à 27°C por 4 dias. O sobrenadante era coletado, centrifugado e mantido à 4°C (primeira passagem). Outro método de amplificação utilizado era inoculação de células em frascos T-25 na concentração de  $3 \times 10^6$  células.

**2) Isolamento de DNA de vírus não ocluso** (segundo O'Reilly *et al.*, 1992): A partir do sobrenadante de células infectadas, os vírus extra-celulares eram passados através de colchão de sacarose 25% e tratados com proteinase K (500 µg/ml) à 37°C, por um período mínimo de 4 horas. O DNA viral era extraído com fenol, clorofane e clorofil. O DNA era então precipitado com sal:etanol, centrifugado à 12.000 g/30 min e lavado com etanol 70%. A ressuspensão era feita à 37°C por 12h, e então mantido à 4°C, para uso.

**3) Isolamento de DNA de vírus:** Células infectadas eram sedimentadas a 3.000 rpm/5 min. e o *pellet* ressuspensionado em 400 µL de EDTA 10 mM, adicionado de 12,4 µL de SDS 20% e a mistura incubada a temperatura ambiente por 30 min. Eram adicionados 103,2 µL de NaCl 5 M e incubados no gelo por 10 min. O material era centrifugado por 5 min. a 14.000 rpm para sedimentar o DNA cromossomal, o sobrenadante era transferido para tubos novos e tratados com proteinase K (500 µg/ml) *overnight* a 37°C. O DNA viral era extraído com fenol, clorofane e éter hidratado. Eram adicionados 400 µL de LiCl 4 M e o material armazenado a 4°C por 3 h. Era feita centrifugação por 5 min. a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos. O DNA era então precipitado com sal:etanol, centrifugado à 14.000 rpm/30 min e lavado com etanol 70%. Após secagem, os *pellets* foram ressuspensionados em 49 µL de TE + 1 µL de RNase (10 mg/mL) e incubados a 37°C por 15 min. O DNA era precipitado com 50 µL de NH<sub>4</sub>Ac 7,5 M e 300 µL de etanol 100% gelado. Após nova centrifugação a 14.000 rpm/10 min., era feita a lavagem do material com etanol 70%. A ressuspensão era feita à 37°C por 12h, e então mantido à 4°C, para uso.

**4) Preparação de células competentes:** Células competentes eram preparadas de acordo com Mandel & Higa (1970), com modificações. Um inóculo de células XL-1 blue eram crescidas em 5 ml de meio LB à 37°C por 12 horas. Então utilizava-se 500 µl deste material para inocular 500 ml de meio LB em um frasco de 2 L. A incubação era feita à 37°C sob agitação (200 rpm). As células cresciam até o início da fase exponencial quando sua absorbância A<sub>660</sub> atingia 1,0. O frasco era colocado no gelo e em seguida o material centrifugado à 12.000 g/5 min à 20°C. O precipitado era lavado em CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado e novamente centrifugado. O precipitado era mais uma vez ressuspensionado no mesmo volume da solução acima e deixado no gelo por 1 hora. As células eram então coletadas por centrifugação (10.000 g/10 min) e ressuspensas cuidadosamente em 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado em glicerol 20%. O material era aliqotado em tubos de microcentrífuga com o volume de 300 µl e estocados a -80°C por no máximo dois meses.

As células competentes DH10Bac foram preparadas segundo instruções do fabricante.

#### **5) Transformação de células competentes:**

- **XL-1 Blue:** A transformação de células competentes seguiu o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). À 100 µl de células competentes adicionava-se o DNA plasmideal e incubava-se no gelo por 30 min. Dava-se um choque térmico de 42°C por 2 min e novamente incubava-se no gelo por 5 min. Adicionava-se então, 1 ml de meio de cultura (LB), e incubava-se à 37°C por 1 hora para restabelecimento e crescimento das células transformadas. Precipitava-se as células a baixa centrifugação (1000 g/2 min à temp. ambiente), ressuspensionava-se o precipitado em 100 µl de LB e plaqueava-se em meio sólido. Após incubação à 37°C por 18 h, observava-se o aparecimento de colônias.

Plasmídeos obtidos em sistemas de ligação eram diluídos 1:5 água Milli-Q e uma alíquota de 5 µl era usada para transformação de 100 µl de células competentes.

- **DH10Bac**: A transformação e seleção foram feitas segundo as instruções do fabricante.

**6) Isolamento de plasmídeos por fervura (“mini-prep”)**: Conforme descrito por Holmes and Quigley (1981) uma única colônia bacteriana de interesse era inoculada em 2 mL de meio LB (com 150 µg/mL de ampicilina) a 37°C por 14 h. Era transferido 1,5 mL do inóculo crescido para um tubo de microcentrífuga e o volume de 500 µL restante guardado a 4°C para, se necessário, servir de inóculo posterior. O tubo era centrifugado em microcentrífuga na velocidade máxima (12.000 x g/20 s). O sobrenadante era descartado e o *pellet* ressuspensionado em 300 µL da solução STET com lisozima (0,67 mg/mL) sob agitação no vórtex. O material era colocado no gelo de 30 s. a 10 min. e em seguida no banho fervente por 90 s. O tubo era novamente centrifugado por 20 min. na velocidade máxima. Ao sobrenadante eram adicionados 300 µL de isopropanol gelado para precipitar o plasmídeo. O tubo era colocado a –20°C por aproximadamente 20 min. e centrifugado por 5 min. na velocidade máxima. O *pellet* era secado na centrífuga à vácuo por 15 min. e ressuspensionado em 40 µL de TE.

**7) Amplificação de plasmídeos**: Uma vez que colônias isoladas contendo os plasmídeos de interesse eram obtidas, escolhia-se uma para amplificação. O inóculo era feito em meio seletivo (LB com ampicilina 100 µg/ml), incubado à 37°C sob agitação (150 rpm) por 18 h.

**8) Eletroforese em gel de agarose**: Para análise de DNA, os géis de agarose eram preparados numa concentração de 0,8% em TAE 1X, contendo 200 µg/L de brometo de etídeo, de acordo com Sambrook *et al*, 1989. A agarose era derretida em forno de microondas até que a solução ficasse homogênea. Resfriava-se à 65°C e derramava-se na bandeja, com o pente apropriado, da cuba de eletroforese para solidificação. Uma vez solidificado, o gel era submerso na cuba contendo TAE 1X e 200 µg/L de brometo de etídeo.

As amostras, ressuspensionadas em tampão de aplicação, eram aplicadas nos poços e uma corrente elétrica constante de 80 V era aplicada ao gel.

**9) Recuperação de bandas isoladas de gel de agarose**: Para recuperação da banda de pré-pro-renina resultante de digestão, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (*low melting point* - SeaKem). Esta agarose possui a propriedade de derreter à 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, nunca utilizava-se o corante brometo de etídeo no sistema de eletroforese. Sempre que possível, corria-se uma pequena alíquota do material a ser purificado, 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 era cortado, corado em TAE com brometo de etídeo, visualizado sob UV sobre filme plástico, ao lado da parte não corada do gel. Por comparação, cortava-se a região correspondente à banda desejada da parte não corada.

A agarose com a banda de interesse era submetida ao banho maria à 68°C/5 min. Imediatamente após derretimento da agarose, era feita a extração com fenol saturado (Tris 0,1 M) contendo NaCl 1 M. Prosseguia-se extração da fase aquosa com clorofane e clorofil. Seguia-se a precipitação com sal:etanol e lavagem com etanol 70%. O precipitado era ressuspendido em água e uma alíquota usada em nova eletroforese para checagem da pureza, integridade e quantificação do fragmento. O DNA era mantido a 4°C.

**10) Amplificação da pré-pró-renina por PCR:** Para a multiplicação da região codificadora da pré-pró-renina, utilizou-se o sistema de síntese *in vitro*, PCR. Utilizou-se os *primers* externos à renina para amplificação do gene ou o *primer* M13 localizado no bacmídeo próximo à região da inserção da pré-pró-renina. Os sistemas eram 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; tampão de PCR 1X (*PCR buffer*) e MgCl 1,5 mM, cobertos com óleo mineral.

Para a cópia da região codificadora da pré-pró-renina em plasmídeos e no bacmídeo, 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: elongação final 72°C / 10 min.;
- manutenção a 4°C até análise.

Para a cópia da região codificadora da pré-pró-renina no bacmídeo também foram utilizados os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* para amplificação do gene.

A amplificação da 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: elongação final 72°C / 7 min.;
- manutenção a 4°C até análise.

**11) Clonagem da pré-pró-renina no plasmídeo HTc:** O gene da pré-pró-renina foi obtido através da digestão do plasmídeo pRHR 1100 com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, liberando um fragmento de aproximadamente 1400 pares de base. Esse fragmento foi então purificado em

gel de baixo ponto de fusão e clonado no plasmídeo pBluescript previamente digerido com as mesmas enzimas, de onde era retirado através da digestão do plasmídeo pBSRen com as enzimas *Sal I* e *Xba I*. Esse fragmento foi então purificado em gel de baixo ponto de fusão e clonado no plasmídeo HTc previamente digerido com as mesmas enzimas. As ligações eram feitas utilizando-se uma proporção 3:1 de fragmento amplificado para o vetor, com a concentração de DNA abaixo de 300 ng, em um volume de 20 µL. A incubação era feita com 1 U de enzima T4 ligase (BRL), a temperatura ambiente por 2 horas.

O produto da ligação (HTcRen) era utilizado na transformação de células competentes DH10Bac e feito o plaqueamento em meio LB seletivo (na presença de gentamicina, kanamicina, tetraciclina, x-gal e IPTG), onde várias colônias brancas eram obtidas. Através de purificação do DNA do bacmídeo (segundo o fabricante), o perfil do DNA foi analisado por PCR com os *primers Ren forward* e *Ren reverse* e dos *primers M13 forward* e *M13 reverse*.

**12) Transfecção de células SF 21 e High five:** Para infecção do vírus vRenBac em células SF 21 e High five utilizou-se o processo de transfecção mediada por lipossomos (cellfectina) de acordo com instruções do kit Bac-to-Bac (Life Technologies). Para confirmação da validade da metodologia foi feito controle com DNA viral de AcMNPV-L1.

Placas de Petri descartáveis de 60 mm eram semeadas, em meio TNMFH sem soro, com  $8 \times 10^5$  células e incubadas à 27°C/1 h para permitir a aderência das células. Eram misturados 30 µl de cellfectina (GIBCO-BRL) com 1,5 mL de meio TNMFH sem soro. Em outro tubo, eram misturados 1 µg de DNA viral em 1,5 ml de TNMFH sem soro. Misturavase, então, as soluções de cellfectina e de DNA, deixava-se descansar por 5 min. Substituíam-se o meio das células pela mistura cellfectina/DNA e incubava-se de 4 à 5 horas à 27°C. Após este período, a mistura de transfecção era retirada, as células lavadas uma vez com meio TNMFH sem soro e em seguida, 4 ml de TNMFH completo eram colocados em cada placa. Incubava-se as placas à 27°C por 5 dias, com observação diária para visualização de células infectadas.

**13) Microscopia eletrônica:** Para a visualização de alterações estruturais após a infecção com o vírus recombinante, as células foram tratadas para microscopia eletrônica. Utilizou-se as linhagens SF 21 e *High five* para o experimento. Para isso, as células em frascos T-25 ( $1 \times 10^6$  células) foram infectadas com 100 µL do vírus recombinante e 3 dias após a infecção elas foram removidas e centrifugadas a 2.000 rpm/3 min. em centrífuga clínica de bancada. O *pellet* celular foi ressuscitado em 1 mL de PBS (pH 6,8), foi feita a centrifugação a 3.000 rpm/1 min. e o *pellet* então ressuscitado em 1 mL de fixador para microscopia eletrônica (paraformaldeído/glutaraldeído).

As amostras foram processadas conforme Haddad *et al*, 1998. As amostras foram fixadas em fixador para microscopia eletrônica por 2 h, ou mantidas no fixador a 4°C, e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) e 5 mM de cloreto de cálcio durante 1 h. Em seguida, foi realizada a contrastação *in block* com acetato de uranila 0,5% *overnight*. A desidratação foi realizada em gradiente

crencente de acetona (30 a 100%) e a inclusão em resina *Spurr*. Após a ultramicrotomia (micrótomo com navalha de diamante), as seções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. A visualização foi feita em Microscópio JEOL - 100C.

**14) Cinética da síntese de proteínas:** As células foram sedimentadas em placas 6-*well* (1,5 x 10<sup>6</sup> células/poço). Após período de aderência das células (*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 <sup>35</sup>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 *ependorfs* de 1,5 mL. Foram sedimentadas a 3.000 rpm/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/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/5 min. As células foram ressuspensas em 500 µL de PBS, receberam <sup>35</sup>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 ressuspendido 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) como descrito por Laemmli (1970).

Após corrida o gel foi fixado (solução de metanol 40%:Ácido acético 7.5 %) e imerso em reagente fluorográfico Amplify NAMP 100 (*Amersham Bioscience*) com agitação por 25 min. Após secagem à vácuo a 70°C o gel foi colocado em contato com filme radiográfico no cassete a -80°C. Após a exposição de 3 a 10 dias, o filme foi revelado (Revelador Dektol Kodak) e fixado (Fixador Kodak).

**16) Ensaio imunogênico *Dot blot*:** Foi feita a aplicação direta de 2 µL de cada amostra a ser analisada por esta técnica em membrana de nitrocelulose. Após a secagem das amostras na membrana, ela foi incubada com solução bloqueadora a temperatura ambiente *overnight* sob agitação lenta para bloquear sítios de ligação não específicos. Foram feitas duas lavagens na membrana de 20 min. com PBS T 1X e uma lavagem por 20 min. com PBS 1X. A seguir, a membrana foi imersa em solução de PBS 1X contendo uma diluição de 1:200 do anticorpo primário anti-renina. A incubação foi feita a temperatura ambiente por 2 h, sob agitação. Após esta etapa, a membrana foi novamente lavada duas vezes em PBS T 1X por 20 min. e uma vez por 20 min. com PBS 1X. A membrana foi imersa em solução PBS 1X contendo uma diluição 1:2.000 do anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase, sendo

mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Uma última lavagem da membrana foi feita com PBS T 1X para retirar anticorpos não ligados e a reação do complexo foi detectada através da imersão da membrana em solução reveladora para *western blotting*. A membrana foi incubada na solução reveladora preparada até que as bandas desejadas obtivessem a coloração necessária. A reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

### **17) Infecção de lagartas com os vírus recombinantes através de injeção intrahemocélica:**

Para infecção de lagartas através de injeção do vírus com microseringa foram utilizadas lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de *Anticarsia gemmatilis*.

Foram utilizados 5 copinhos com lagartas controles que receberam a injeção de água destilada (controle negativo), 10 copinhos com lagartas infectadas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 (controle positivo), 30 copinhos com lagartas infectadas com o vRenbac para cada linhagem. Primeiramente, copinhos plásticos de 50 mL a serem utilizados no ensaio para separar as lagartas foram esterilizados no fluxo laminar sob luz UV. Em cada copo foi colocado um pedaço de dieta artificial (Greene *et al.*, 1976 modificada por Hoffmann *et al.*, 1985), cerca de 1 cm<sup>3</sup>, para alimentação das larvas. As lagartas a serem infectadas foram então colocados sobre gelo até ficarem imóveis. As lagartas foram infectadas com aproximadamente 10 µL do vírus por meio de injeção direta com agulha de insulina (microseringa) na hemocele. As lagartas após a injeção foram alojadas nos copinhos contendo dieta artificial (duas ou três lagartas/copo). As lagartas foram mantidas em estufa incubadora B.O.D., com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 14 h até sua morte. Após a morte das lagartas elas foram armazenadas a -20°C.

## **Resultados e Discussão**

Inicialmente foi feita a digestão do plasmídeo pRHR1100 (contendo o fragmento da região codificadora do gene da pré-pró-renina) com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III. A banda com cerca de 1.400 pb foi eluída do gel de agarose de baixo ponto de fusão e submetido à extrações com fenol saturado com NaCl 1M, fenol:clorofórmio e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. A quantificação do fragmento foi feita em gel de agarose 0,8%.

A banda da pré-pró-renina foi inserida por ligação com T4 ligase no plasmídeo pBluescript clivado com as mesmas enzimas, gerando o pBSRen após a transformação em células XL-1Blue. O isolamento do plasmídeo foi feito por fervura. O vetor pBSRen funcionou como um gerador de inserto para uma clonagem efetiva do fragmento da pré-pró-renina no plasmídeo de transferência (HTc). O pBSRen foi então digerido com as enzimas *Sa*I e *Xba* I e a banda de 1,4 Kb eluída do gel de agarose de baixo ponto de fusão. A banda referente a pré-pró-renina foi inserida com auxílio de T4 ligase no HTc (6,2 Kb) digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo HTcRen (Figura 01) após a transformação em células XL-1Blue. O isolamento do plasmídeo foi feito por fervura. A confirmação da inserção da pré-pró-renina foi feita pela digestão enzimática com *Sa*I e *Xba* I (Figura 02). Foi feita então a transformação do HTcRen

em células competentes DH10Bac para que houvesse a transposição da pré-pró-renina com o bacmídeo, que possui DNA do vírus, presente nestas células gerando o BacRen. O isolamento do DNA viral (BacRen) foi feito conforme o fabricante. Foi feita a confirmação da presença do gene da pré-pró-renina no BacRen utilizando-se a técnica de PCR com os oligonucleotídeos específicos Ren *forward* e *reverse* (Figura 03, amostra 5) e M13 *forward* e *reverse* (Figura 04, amostra 5). O bacmídeo BacRen foi transfectado (mediado por lipossomas) em células de inseto, onde foi gerado o vírus vRenbac.

A infecção com o vírus AcMNPV-L1 foi feita para servir de controle positivo, já que este vírus é capaz de infectar as duas linhagens celulares utilizadas produzindo poliedros. Da mesma forma, para controle da transfecção, foi utilizado o DNA do vírus AcMNPV-L1, o que deveria levar a formação de poliedros nas células transfectadas. Os resultados obtidos para as duas linhagens foram similares e a descrição do que foi observado nas células, em cada ensaio, é apresentada abaixo e podem ser visualizadas na Figura 05:

- Sadias (controle negativo): foi observado o crescimento normal das células sem alterações morfológicas (amostra A).
- Infectadas com o vírus selvagem AcMNPV-L1: foi notada a presença de vários poliedros (estruturas bi-refringentes) no interior do núcleo hipertrofiado das células (amostra B).
- Transfectadas com o DNA do vírus selvagem AcMNPV-L1: foi notada a presença de vários poliedros no interior do núcleo hipertrofiado das células (amostra C).
- Transfectadas com o bacmídeo recombinante BacRen: como esperado na célula High five, foi notado o arredondamento e hipertrofia celular, presença de vacúolos, corpos densos e não houve a formação de poliedros. Também como esperado, na célula Sf21 não foi notada a presença de poliedros, houve hipertrofia e a formação de algumas protusões e de corpos densos por volta do terceiro dia após a infecção (amostra D).
- Infectadas com o vírus vRenbac: como esperado, foi observado o arredondamento e hipertrofia celular, presença de vacúolos, formação de corpos densos no núcleo celular por volta do terceiro dia após a infecção e o não aparecimento de poliedros (amostra E).

Após a purificação do DNA do vírus recombinante, foi feita a confirmação da presença do gene no vírus por PCR com Ren *forward* e *reverse* (Figura 03, amostra 7) e M13 *forward* e *reverse* (Figura 04, amostra 6).

As células infectadas com vRenbac e controles foram também analisadas por microscopia eletrônica. A análise morfológica das células infectadas (vRenbac), por microscopia eletrônica, revelou alterações nas células com efeitos citopáticos característicos de infecção com vírus ocluso negativo. A análise ultraestrutural das células *High five* e Sf21 infectadas com os diferentes vírus às 72 hp.i., é apresentada nas Figuras 07 a 08 e 10 a 12, respectivamente. Após infecção, ocorre hipertrofia do núcleo (N), fazendo com que o citoplasma (C) seja restrito a um pequeno espaço. A cromatina apresenta-se dispersa, com corpúsculos densos concentrados na face interna da membrana nuclear. A região de síntese de DNA e também de capsídeos no núcleo das células, denominada de estroma virogênico (EV), é observada. Espaçadores eletrodensos (EE) e estruturas fibrilares (P10), são visualizados tanto no

citoplasma, quanto no núcleo. As figuras 06 e 09 apresentam, respectivamente, as *High five* e Sf21 controle. Entretanto a formação de corpos poliédricos, pela oclusão de vírions contendo de um a vários nucleocapsídeos, facilmente evidenciada após infecção com o vírus AcMNPVL1 (dados não apresentados) não pode ser observada no vírus mutante por se tratar de um vírus ocluso negativo. Como esperado, nenhuma alteração morfológica foi visualizada nas células controle.

No ensaio de cinética da síntese de proteínas, foi possível ver mudança do perfil das proteínas sintetizadas pelas células para as proteínas sintetizadas pelo vírus vRenbac através de autoradiograma (dados não apresentados). O perfil protéico das células controle e incubadas com o vírus vRenbac a 0 hp.i. (poço 3) foi semelhante. Uma mudança do perfil protéico é observada a 24 hp.i., entretanto, essa mudança é mais evidente no final do ciclo de infecção, as 48 hp.i. e as 72 hp.i. Nesses períodos duas bandas de maior intensidade, com peso molecular de cerca de 40 kDa e 47 kDa, estavam presentes. Embora o vírus seja ocluso negativo, ele possui o promotor forte da poliedrina para expressão da proteína heteróloga. Pelo fato destas proteínas aparecerem na fase muito tardia da infecção, quando o promotor da poliedrina é ativado e encontra-se dirigindo a expressão do gene heterólogo, elas poderiam ser o precursor da renina (pró-renina), de cerca de 47 kDa e a renina, de cerca de 42 kDa. No entanto, esse dado só pode ser confirmado após ensaio imunológico com anticorpos específicos contra a renina. Esses resultados foram similares aos observados em células *High five* infectadas com o vírus vRenbac.

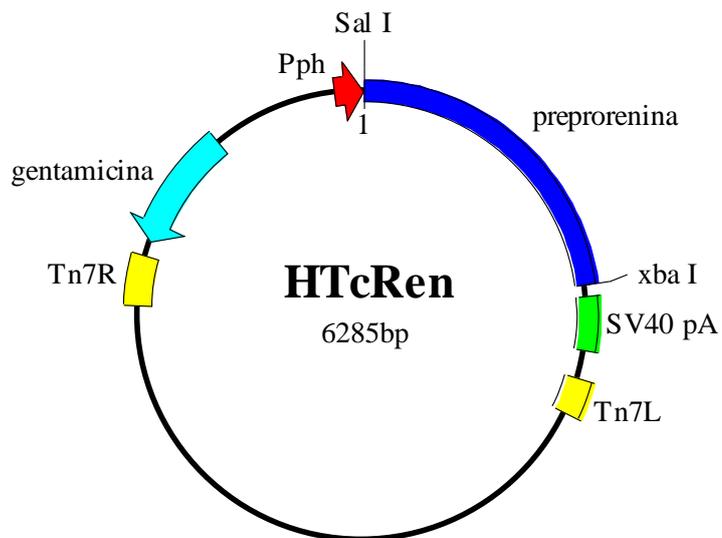
O ensaio imunológico de *western blotting* não apresentou nenhum sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras virais. Não houve hibridização nem com o controle positivo da renina (lisado renal). Como com essa técnica não foi obtido o resultado esperado, para reconhecimento da expressão da renina nas células, o método de *dot blot* foi empregado onde uma quantidade mais concentrada da amostra é submetida ao ensaio imunogênico, aumentando a chance de reconhecimento pelo anticorpo.

O ensaio imunológico de *dot blot* (Figura 13) foi feito com a aplicação de amostras de células controle (intactas sem o vírus recombinante) (amostra 1), células intactas infectadas com o vírus recombinante vRenbac (amostra 2), células rompidas (por sonicador) infectadas com o vRenbac (amostra 3), sobrenadante das células infectadas com o vRenbac (amostra 4), sobrenadante das células controle (amostra 5), lisado tecidual de rim (controle positivo - amostra 6) e albumina (controle negativo - amostra 7), onde era esperado o reconhecimento pelo anticorpo para as amostras de células infectadas com o vRenbac (intactas e lisadas) e pelo lisado renal. Não era esperado o reconhecimento pelo anticorpo para as amostras de células controle, sobrenadantes e o controle negativo com albumina, já que estas amostras não possuem a inserção do gene da pré-pró-renina em seu DNA, impossibilitando a expressão da renina e seu reconhecimento pelo anticorpo. As células infectadas foram lisadas para facilitar o reconhecimento pelo anticorpo, pois poderia ser que as células intactas dificultassem esse reconhecimento. Os sobrenadantes foram utilizados para confirmar se a proteína está sendo retida nas células. A albumina foi utilizada como controle negativo por ser uma proteína que o

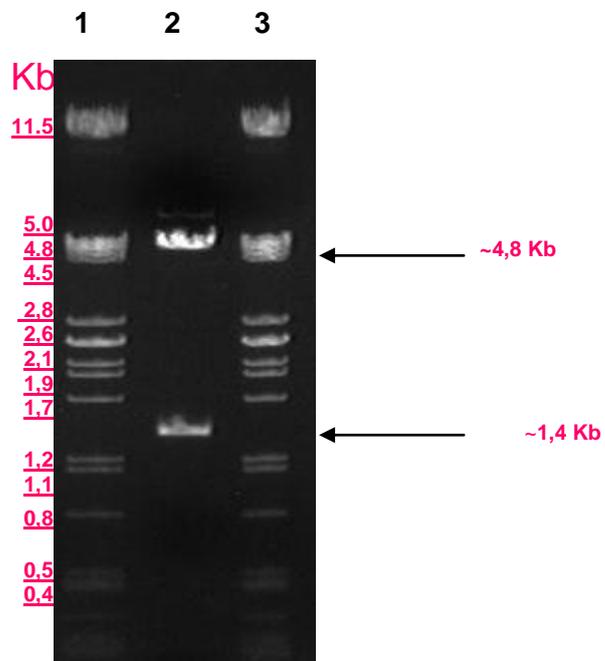
anticorpo não deveria reconhecer. O resultado do ensaio imunológico de *dot blot* apresentou sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras de células infectadas com o vírus recombinante, entretanto, houve também sinal de reconhecimento nas células Sf21 não infectadas (*mock infected* – Figura 13, amostra 1). Este fato não era esperado e pode ter ocorrido devido ao anticorpo ser policlonal e estar reconhecendo alguma das proteínas celulares produzidas pelas células Sf21 de forma inespecífica. Esse efeito não ocorreu em células *High five* sem incubação com o vírus (*mock infected*). As amostras dos sobrenadantes das células não apresentaram reconhecimento pelos anticorpos, indicando que a renina não está sendo liberada no meio.

Para a infecção de lagartas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 (controle positivo) e com os vírus recombinantes vRenbac, duas espécies de insetos foram utilizadas (*Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*). Foram observadas algumas alterações nas lagartas infectadas com vírus vRenbac (Figura 14, C e F) em relação às lagartas controle não infectadas (Figura 14, A e D) e às infectadas com AcMNPV-L1 (Figura 14, B e E). As lagartas *S. frugiperda* infectadas com vRenbac através de injeção na hemocele, apresentaram mudanças na coloração ficando róseas (Figura 14, C) e todas morreram ou apresentaram características de infecção como estado letárgico e flacidez do tegumento. As lagartas *S. frugiperda* infectadas com AcMNPV-L1, através de injeção na hemocele, não apresentaram mudanças na coloração e todas morreram (mortalidade de 100%) e apresentaram características típicas de infecção. As lagartas *A. gemmatalis* apresentaram mudanças na coloração ficando róseas (Figura 14, F) e apresentaram uma mortalidade de 67,3%. As larvas *A. gemmatalis* infectadas com AcMNPV-L1 (Figura 14, E), através de injeção na hemocele, apresentaram descoloração da cutícula e 100% de mortalidade.

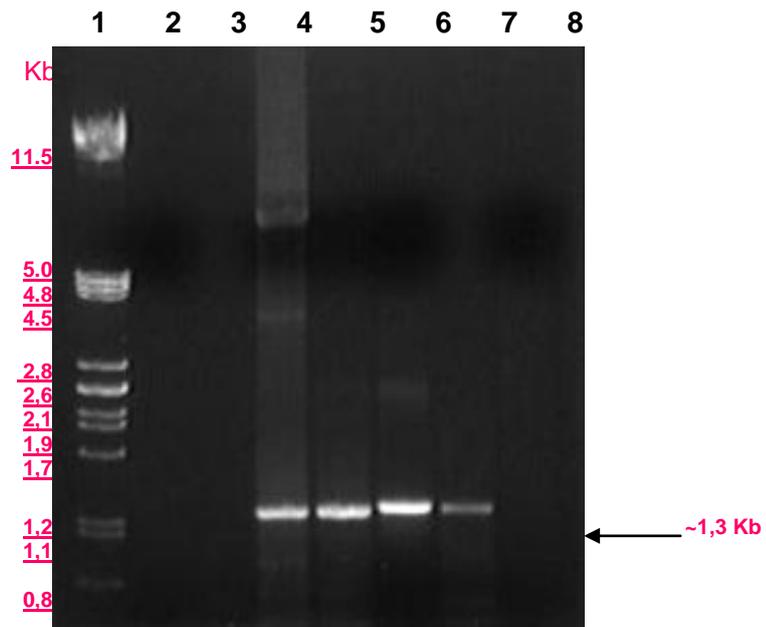
Embora os dados apresentados indiquem fortemente que está havendo expressão de uma proteína que estaria interferindo na fisiologia do inseto, e que essa proteína teria o peso molecular esperado para a pró-renina e renina, para a confirmação de que houve realmente a expressão da renina, ensaios de imunoprecipitação e novos ensaios imunológicos (*western blotting*) estão em andamento.



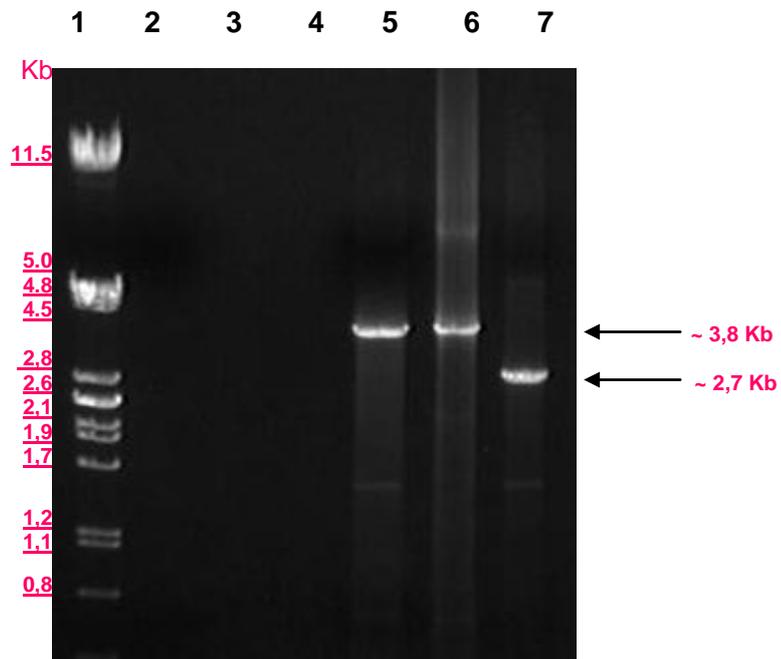
**Figura 01** - Plasmídeo recombinante HTcRen. Desenho esquemático do plasmídeo HTcRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pFastBac HTc.



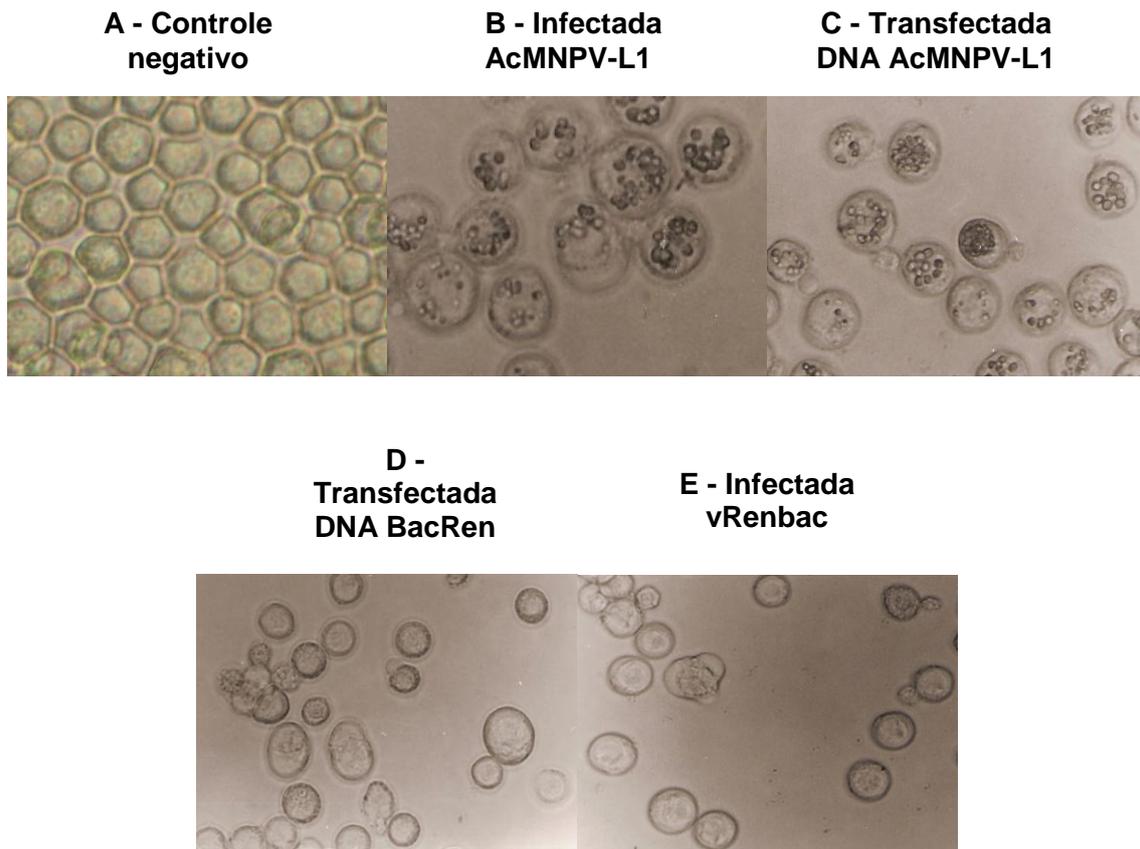
**Figura 02** - Confirmação da clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo HTc por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ /Pst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do HTcRen digerido com as enzimas de restrição Xba I e Sal I; amostra 3: marcador  $\lambda$ /Pst I (Invitrogen).



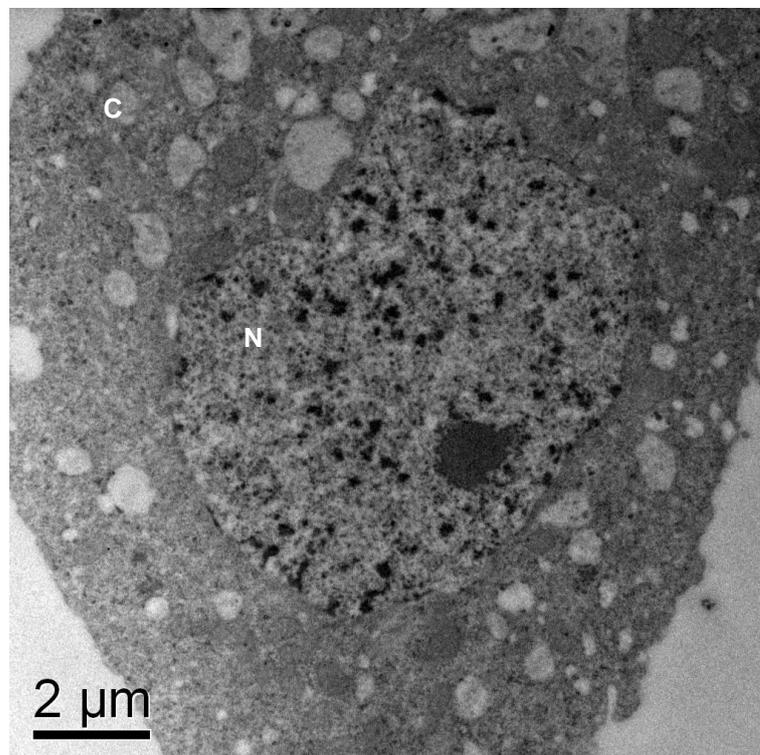
**Figura 03-** Confirmação da inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus recombinante, vRenbac utilizando a técnica de PCR. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ Pst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR (sem DNA) com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 3: DNA do pFastBac HTc com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 4: DNA do HTcRen com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 5: DNA do bacmídeo recombinante BacRen com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 6: DNA do pRHR1100 com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 7: DNA do vírus vRenbac com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 8: DNA do vírus vRoIA com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*.



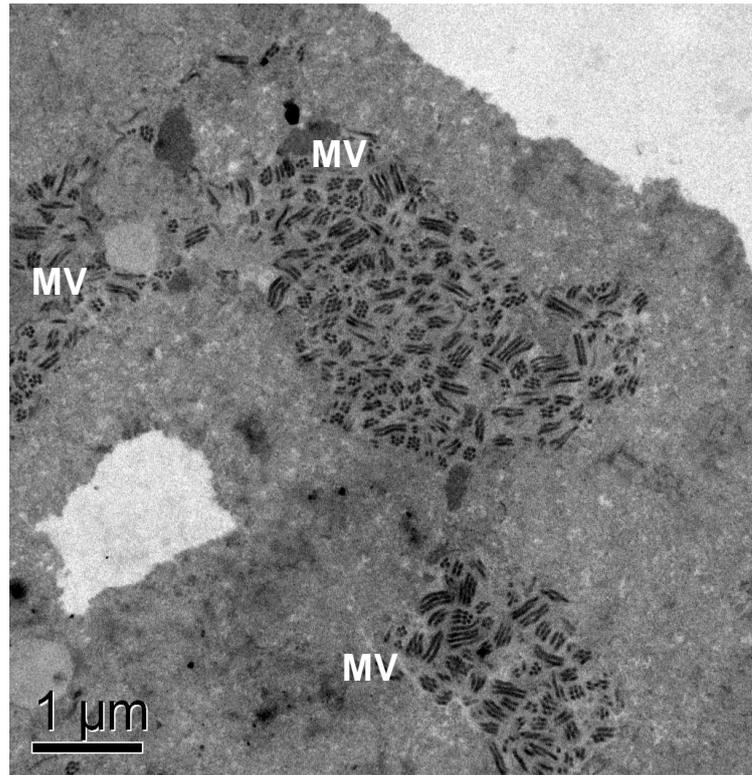
**Figura 04** - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo recombinante (BacRen) por transposição, formando o vírus vRenbac utilizando a técnica de PCR. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador  $\lambda$ /Pst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR (sem DNA) com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*; amostra 3: DNA do pFastBac HTc com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*; amostra 4: DNA do HTcRen com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*; amostra 5: DNA do bacmídeo recombinante BacRen com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*; amostra 6: DNA do vírus vRenbac com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*; amostra 7: DNA do vírus vRoIA com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*.



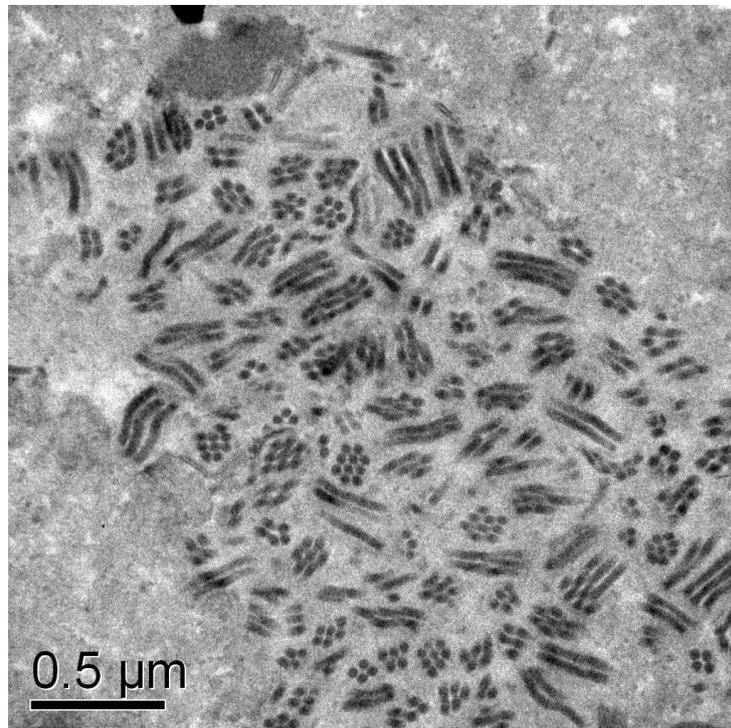
**Figura 05** - Análise morfológica de células Sf21, 72 h após o ensaio, por microscopia óptica.



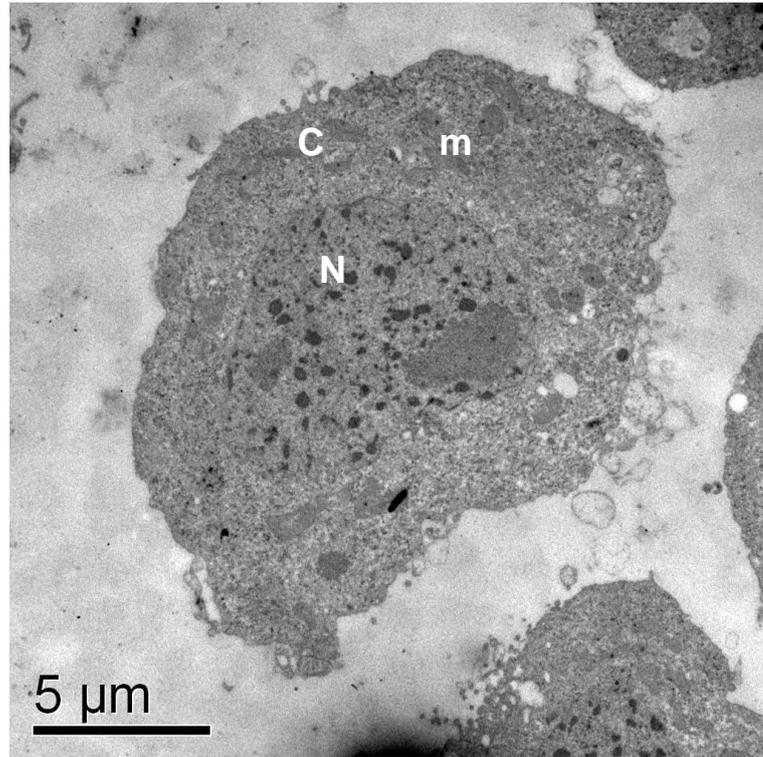
**Figura 06** - Células High five controle (aumento de 10.000x), mostrando o citoplasma íntegro e o núcleo. C- citoplasma, N- núcleo.



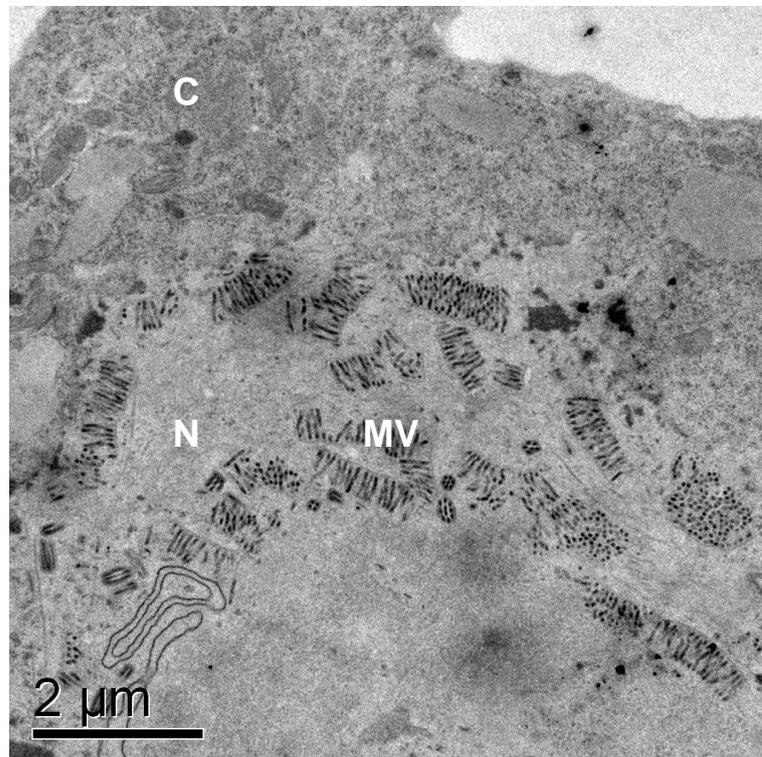
**Figura 07** - Células High five infectadas com vRenbac (aumento de 20.000x), mostrando local de montagem dos vírus (MV) com a presença de várias estruturas virais envelopadas com diferentes números de vírions.



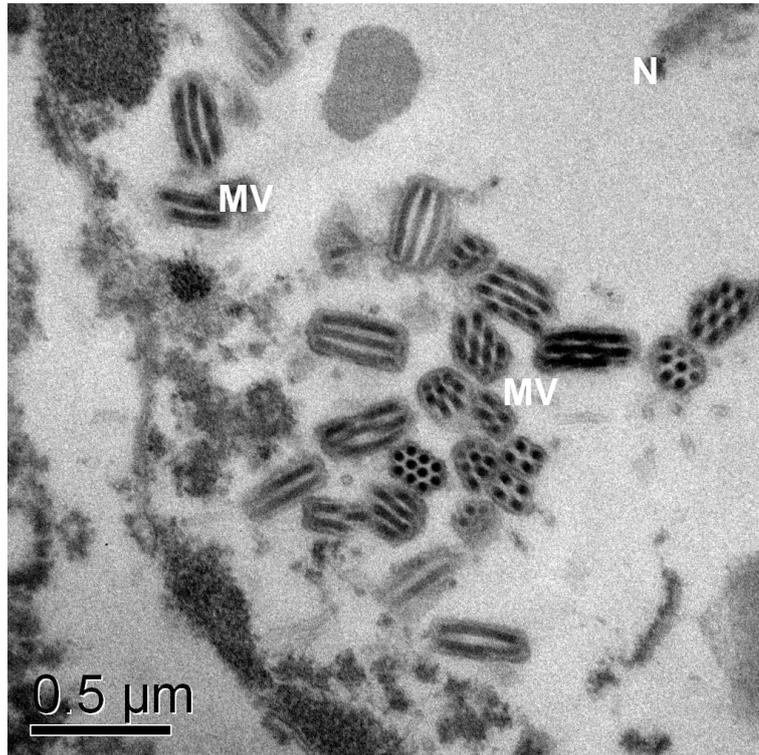
**Figura 08** - Células High five infectadas com vRenbac (aumento de 50.000x), mostrando em detalhe a região de montagem do vírus mostrada na Figura 07.



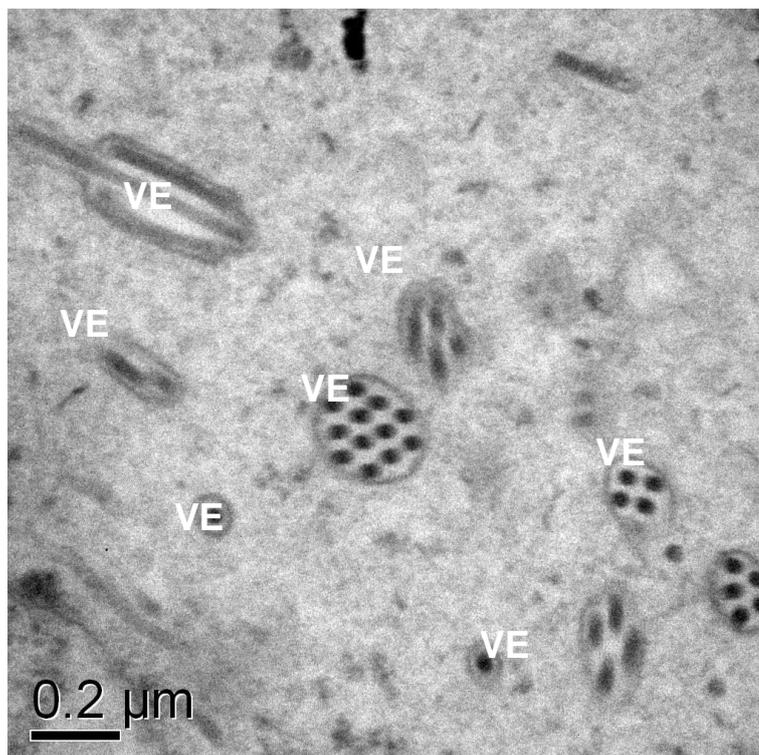
**Figura 09** - Células Sf21 controle (aumento de 6.000x), mostrando o citoplasma (C) íntegro com algumas mitocôndrias (m) e o núcleo (N).



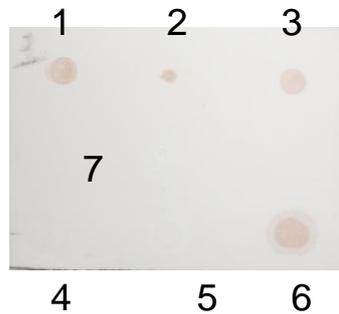
**Figura 10** - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 15.000x), mostrando o citoplasma (C) e o núcleo (N) com área de montagem dos vírus (MV).



**Figura 11** - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 50.000x), mostrando o núcleo (N) com área de montagem dos vírus (MV) com vários vírions envelopados com diferentes números de vírions em seu interior.



**Figura 12** - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 80.000x), mostrando o núcleo (N) com alguns vírus envelopados (VE) com diferentes números de vírions em seu interior.



**Figura 13** - Membrana de nitrocelulose onde foi realizado o *dot blot* das amostras recombinantes com vRenbac em células Sf21. Amostra 1- células; amostra 2- células infectadas com vRenbac intactas; amostra 3- células infectadas com vRenbac lisadas; amostra 4- sobrenadante de células infectadas com vRenbac; amostra 5- sobrenadante de células; amostra 6- lisado de tecido renal (controle positivo); amostra 7- Albumina (controle negativo).

**A** - *Spodoptera frugiperda* (mock

**B** - *Spodoptera frugiperda* infectada com vírus AcMNPV

**C** - *Spodoptera frugiperda* infectada com vRenbac



**D** - *Anticarsia gemmatalis* (mock infected)

**E** - *Anticarsia gemmatalis* infectada com vírus

**F** - *Anticarsia gemmatalis* infectada com vRenbac



**Figura 14** - Lagartas não infectadas e infectadas com vírus AcMNPV ou vRenbac.

## Referência bibliográfica

ALDRICH, H.C. & TODD, W.J. (eds) (1986) Ultrastructural techniques for microorganisms. Plenum, New York.

AUSEBEL, F.M., Brent, R., Kingston, R. Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K.C. (1994). Currents protocols in molecular biology, Ed. Johnson Wiley & Sons, Inc.

HARLOW, E. & LANE, D. (1988) Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

LEE, H.H. & MILLER, L.K. (1978) Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 27:754-767.

MANDEL, M. & HIGA, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage infection. J.Mol.Biol. 53:159-162.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. & LUCKOW, V.A. (1992) Baculovirus expression vectors - a laboratory manual. W.H. Freeman and Company, New York.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed.

SLIGHTOM, J.L., DURAND-TARDIS, M., JOUANIN, L., TETSER, D. (1986) Nucleotide sequence analysis of TL DNA of *Agrobacterium rhizogenes agropine* type plasmid: identification of open reading frames. Journal of Bio. Chemistry 261:108-121