

Figura 26 - Confirmação da abertura do pFastBac HTc e do isolamento da pré-pró-renina do plasmídeo pBSRen por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ/Pst I (Invitrogen); amostra 2: HTc intacto; amostra 3: HTc digerido com *Sal* I; amostra 4: HTc digerido com *Xba* I; amostra 5: HTc digerido com *Sal* I e *Xba* I; amostra 6: pré-pró-renina (*Sal* I/*Xba* I); amostra 7: marcador λ/Pst I (Invitrogen).

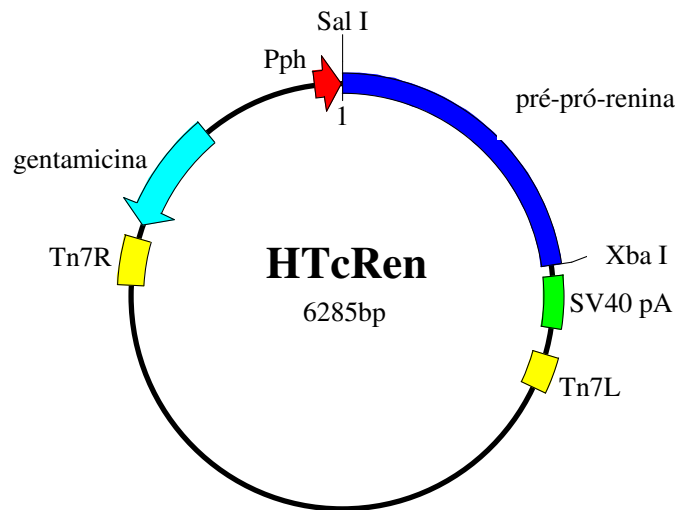


Figura 27 - Plasmídeo recombinante HTcRen. Desenho esquemático do plasmídeo HTcRen mostrando o inserto do gene da pré-pró-renina no vetor pFastBac HTc.

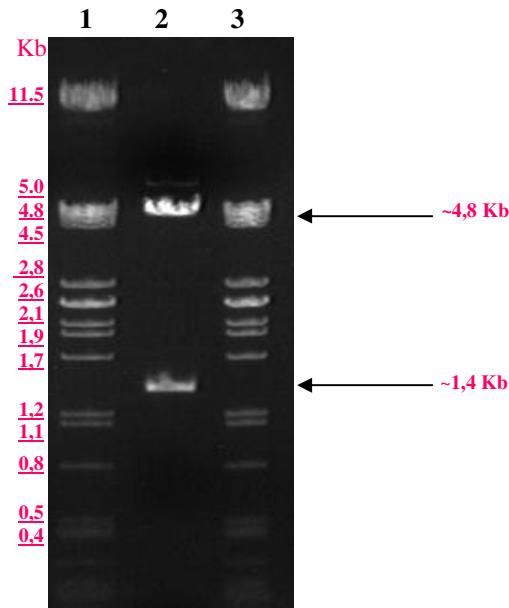


Figura 28 - Confirmação da clonagem do gene da pré-pró-renina no plasmídeo HTc por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: DNA do HTcRen digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Sal* I; amostra 3: marcador λPst I (Invitrogen).

5. Construção do bacmídeo recombinante BacRen (Transformação do HTcRen em DH10Bac)

Após a transformação do HTcRen nas células DH10Bac, onde houve a transposição da pré-pró-renina com o bacmídeo, foi gerado o bacmídeo recombinante denominado BacRen. Foram feitas, como seguem, placas de meio para ter certeza que foi obtido o BacRen: placa controle com meio LB amp⁺ inoculada com o puc 19 após transformação em células DH10Bac em que todas as colônias deveriam ter a coloração branca (Figura 29, 1), placa controle de meio LB amp⁺, IPTG, kan, tetra e genta inoculada com o HTc após transformação em células DH10Bac em que todas as colônias deveriam ter a coloração azul (Figura 29, 2) e placa de meio LB amp⁺, IPTG, kan, tetra e genta inoculada com o HTcRen após transformação em células DH10Bac em que poderia haver colônias brancas e azuis, sendo de interesse somente as brancas (Figura 29, 3 e 4). Como foi obtido o resultado esperado em todas as placas, foram coletadas 5 colônias brancas da placa com HTcRen após transformação em células DH10Bac, ou seja, do BacRen.

Como o DNA do bacmídeo recombinante é superior a 135 Kb, foi utilizada a análise por PCR para verificar a presença do gene de interesse, a pré-pró-renina. A reação de PCR utilizando como molde o DNA do BacRen foi feita primeiramente com os *primers* internos da pré-pró-renina (*Ren forward* e *Ren reverse*), para confirmar a inserção, onde foi observada

banda de ~1,3 Kb (Figura 30, amostras 3 a 7), e depois com os *primers* M13 (*forward* e *reverse*), sítio presente no bacmídeo, onde foi observada banda de ~3,8 Kb (2,4 Kb referente ao bacmídeo + 1,4 Kb referente a pré-pró-renina) (Figura 31, amostras 3 a 7).

Como foram obtidos 5 clones do BacRen e todos confirmaram a presença de pré-pró-renina (Figura 30 e 31), foi selecionado um clone (#1) para dar prosseguimento aos ensaios (transfecção).

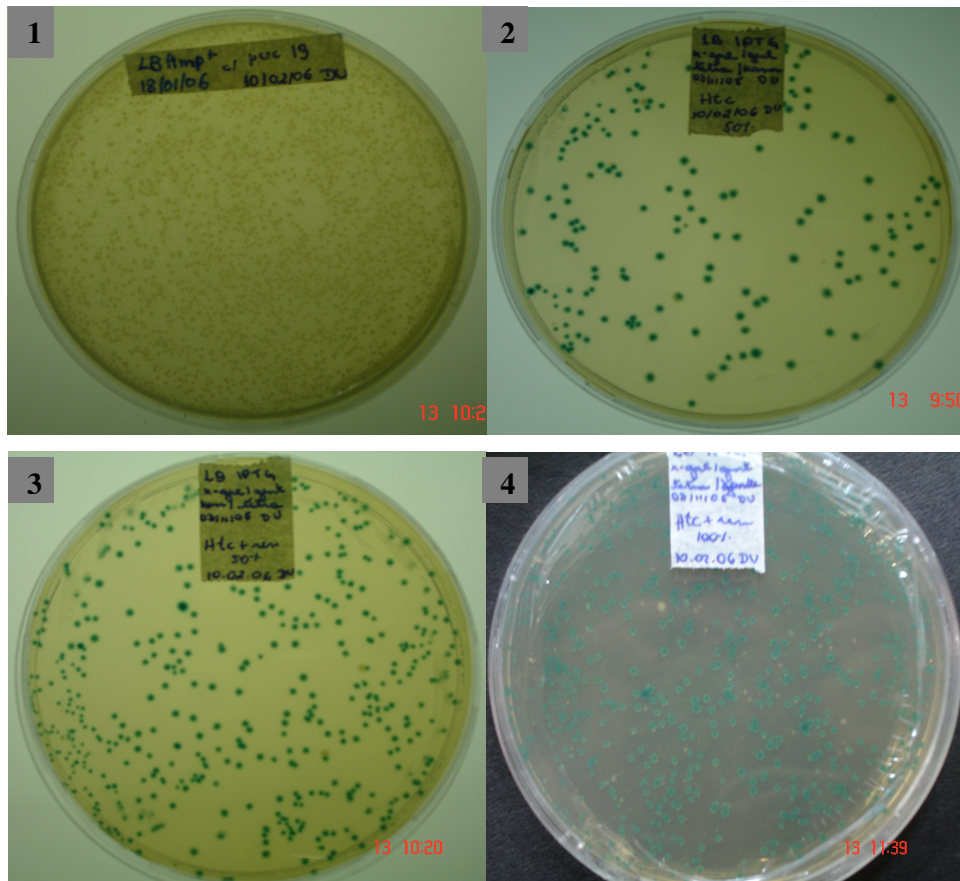


Figura 29 - Placas de meio onde foram inoculadas as transformações em DH10Bac para seleção do BacRen. Placa 1: puc 19, placa 2: HTc, placa 3: HTcRen (fundo claro), placa 4: HTcRen (fundo escuro).

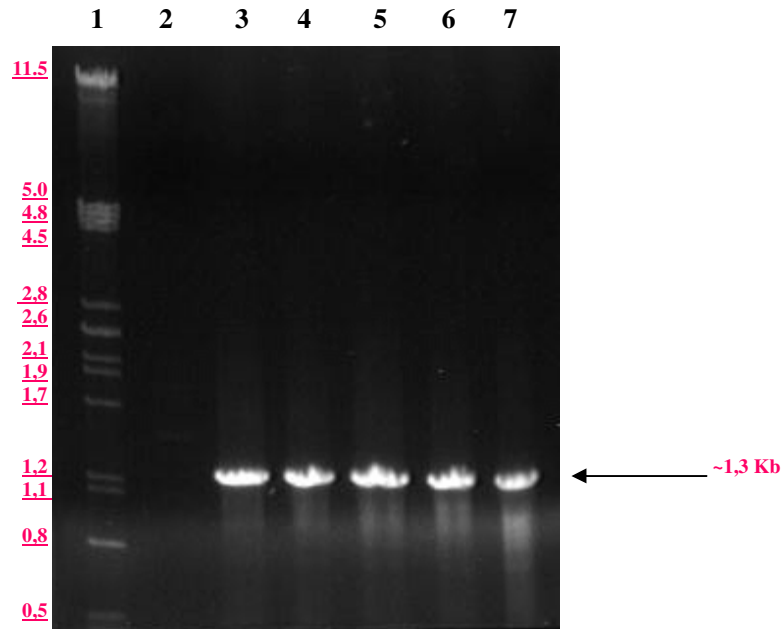


Figura 30 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo através da PCR com os *primers* específicos da renina (*Ren forward* e *Ren reverse*). Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR (sem DNA); amostra 3: DNA do BacRen #1; amostra 4: DNA do BacRen #2; amostra 5: DNA do BacRen #3; amostra 6: DNA do BacRen #4; amostra 7: DNA do BacRen #5.

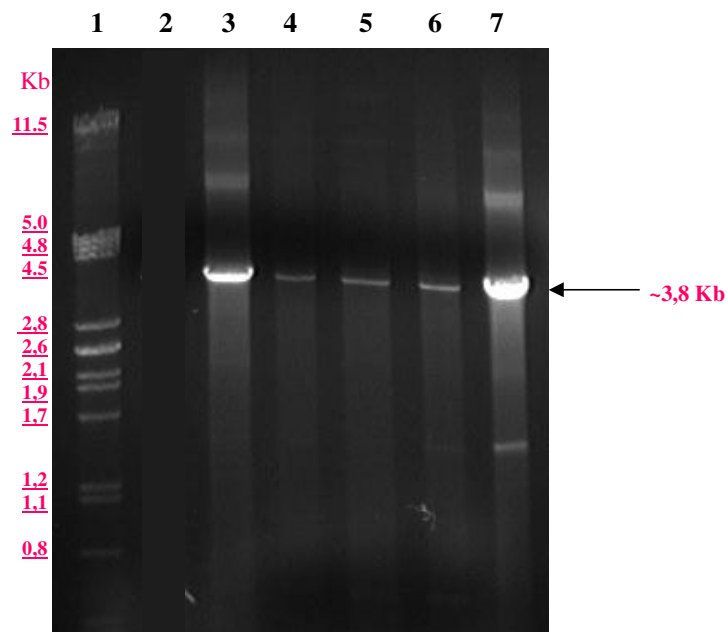


Figura 31 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo através da PCR com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λPst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR; amostra 3: DNA do BacRen #1; amostra 4: DNA do BacRen #2; amostra 5: DNA do BacRen #3; amostra 6: DNA do BacRen #4; amostra 7: DNA do BacRen #5.

6. Construção do vírus recombinante ocluso positivo vRen (Recombinação homóloga)

A obtenção de prováveis recombinantes virais foi favorecida pela linearização do DNA do vírus vSyn VIgal com a enzima de restrição *Bsu* 36I. Desta forma, ainda que o DNA linear conseguisse penetrar na célula de inseto, o vírus não poderia multiplicar-se. Somente com o evento de recombinação, via região do vírus homóloga às regiões flanqueadoras do sítio de clonagem no plasmídeo de transferência (pSynRen), a forma circular seria recuperada e então poderia ocorrer sua proliferação.

Vírus recombinantes foram obtidos após a co-transfecção do plasmídeo pSynRen e o DNA do vírus vSyn VIgal linearizado, em cultura de células, por meio de lipossomas (Figura 32, H). A seleção do recombinante foi feita por *plaque assay*. Os vírus sintetizados nesta fase passaram a se chamar então de vRen (P0) (Figura 32, I). As placas do vírus recombinante vRen, possuem o fenótipo ocluso positivo (recuperação do gene codificante para a poliedrina). Isto decorreu do fato do vírus parental não possuir o gene codificador para a poliedrina, recuperando-o do plasmídeo de transferência. Assim, foi confirmado que a pré-pró-renina foi inserida no vírus através da presença de poliedros nas duas linhagens celulares (High five e Sf21) em que foi feita co-transfecção e também através de amplificação por PCR do gene.

Os efeitos induzidos no 5º dia após o ensaio, em células High five e Sf21, no intuito de obter o vírus recombinante vRen foram observados por microscopia ótica de contraste de fase (Olympus CK-2). A infecção com os vírus AcMNPV-L1 e AgMNPV-2D foi feita para servir de controle da efetividade da infecção, já que estes dois vírus são capazes de infectar as duas linhagens celulares utilizadas produzindo poliedros. Da mesma forma, para controle da transfecção, foram utilizados o DNA dos vírus AcMNPV-L1 e AgMNPV-2D, o que deveria levar a formação de poliedros nas células transfectadas. Foi feita também a infecção das células com o vírus vSyn VIgal para a confirmação do fenótipo ocluso negativo, já que sem a recombinação com o pSyn este vírus não é capaz de formar poliedros. Foi feita também a transfecção do DNA do vSyn VIgal nas células para a verificação do fenótipo ocluso negativo deste DNA. 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 32:

- Sadias (controle negativo): foi observado o crescimento normal das células sem alterações morfológicas (amostra A).

- Infectadas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 ou AgMNPV-2D: foi notada a presença de vários poliedros (estruturas bi-refringentes) no interior do núcleo hipertrofiado das células (amostra B e C, respectivamente).

- Infectadas com o vírus parental vSyn VIgal: não foi notada a presença de poliedros, já que esse vírus sozinho não é capaz de formar poliedros (ocluso negativo), mas as células apresentavam-se hipertrofiadas e com estruturas densas (estroma virogênico) no núcleo por volta do terceiro dia após a infecção (amostra D).

- Transfectadas com o DNA do vírus selvagem AcMNPV-L1 ou AgMNPV-2D: foi notada a presença de vários poliedros no interior do núcleo hipertrofiado das células (amostra E e F, respectivamente).

- Transfectadas com o DNA do vírus parental vSyn VIgal: não foi observado poliedros. Fato já esperado, pois o vSyn sozinho não leva a formação de poliedros (amostra G). Foi observado que as células estavam hipertrofiadas.

- Co-transfectadas com o DNA do vírus parental vSyn VIgal e o plasmídeo pSynRen: foi observada a presença de vários poliedros no núcleo das células e hipertrofia celular (amostra H). As duas linhagens apresentaram os mesmos efeitos descritos para infecção com os vírus selvagens AcMNPV-L1 e AgMNPV-2D, confirmando a ocorrência do processo de recombinação através da recuperação do gene da poliedrina (vírus ocluso positivo).

- Infectadas com o vírus recombinante vRen: foi observada a presença de vários poliedros no núcleo das células e hipertrofia celular (amostra I).

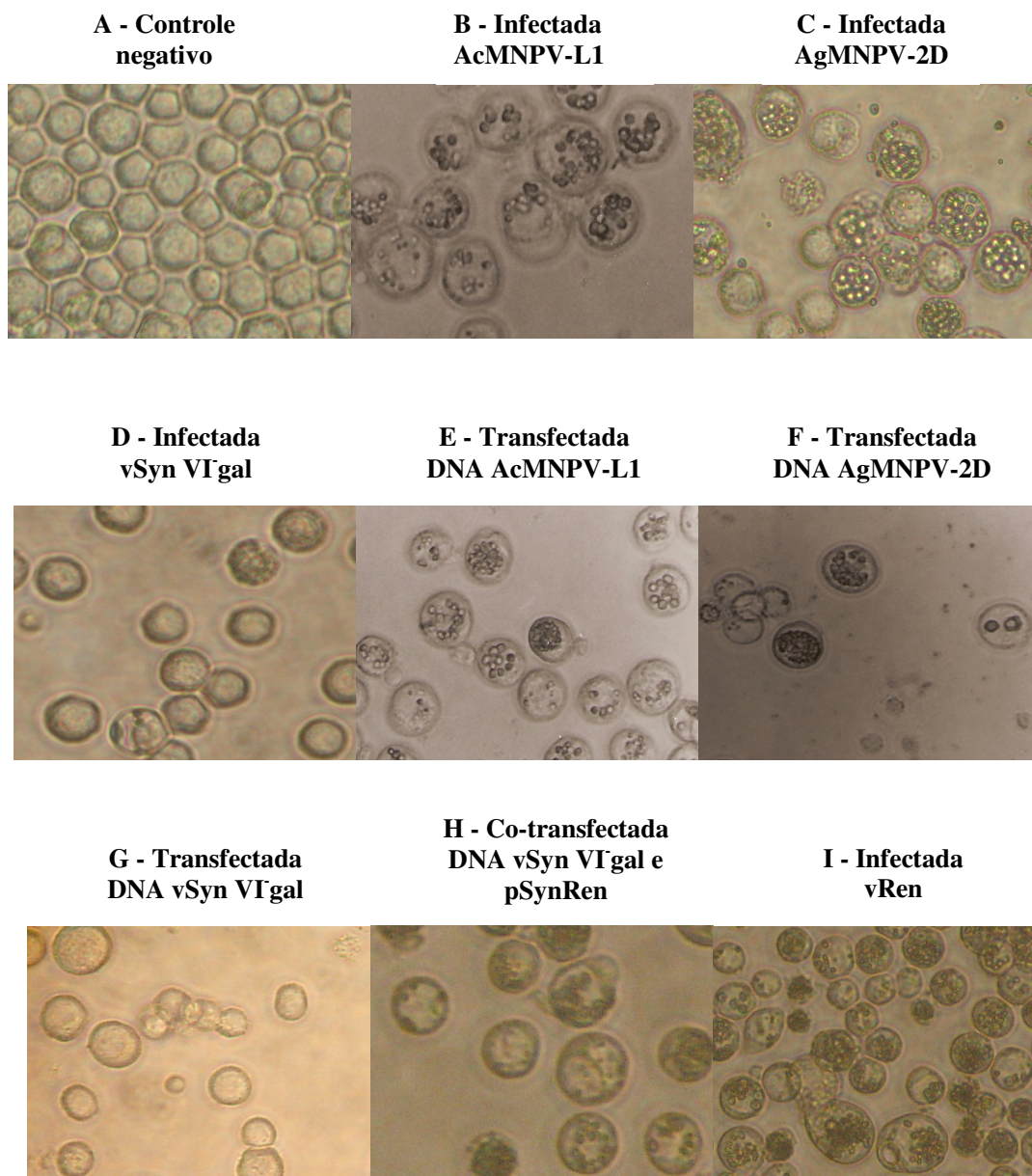


Figura 32 - Análise morfológica de células Sf21, 72 h após o ensaio, por microscopia ótica.

A amplificação por PCR, tendo como objetivo a confirmação da inserção da pré-pró-renina em DNAs é apresentada na Figura 33. Os produtos de amplificação do plasmídeo pSynRen (controle positivo - amostra 5), do plasmídeo pRHR1100 (controle positivo - amostra 6) e do vírus recombinante vRen (amostra 7), analisados em gel de agarose, são semelhantes, resultando em uma banda de cerca de 1,3 Kb referente a presença da pré-pró-renina nestes DNAs. Nas demais amostras, por não possuírem a inserção da pré-pró-renina, não foram detectadas bandas (amostra 2, 3 e 4).

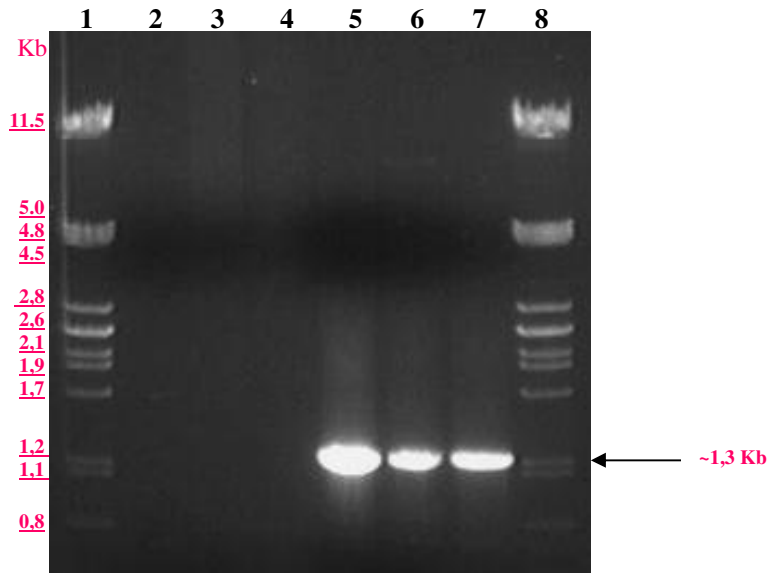


Figura 33 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus recombinante vRen, utilizando a técnica de PCR. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR (sem DNA) com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 3: DNA do vSyn com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 4: DNA do pSyn com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse*; amostra 5: DNA do pSynRen 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 vRen com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse*, amostra 8: marcador λ Pst I (Invitrogen).

7. Construção do vírus recombinante ocluso negativo vRenbac (Transfecção do BacRen)

Vírus recombinantes foram obtidos após a transfecção do bacmídeo recombinante BacRen (Figura 34, amostra A), em cultura de células, por meio de lipossomas. Os vírus produzidos nesta fase passaram a se chamar vRenbac (P0). O vírus recombinante vRenbac, possui o fenótipo ocluso negativo (Figura 34, amostra B). Para este vírus não foi feito *plaque assay* porque nesta transfecção só há a possibilidade de inserção de um DNA.

A inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus foi confirmada pela visualização de alterações nas características morfológicas das células como a presença de protusões e a formação de corpos densos no núcleo das duas linhagens celulares (High five e Sf21) em que foi feita a transfecção, e também através da amplificação do gene por PCR.

Os efeitos induzidos no 5º dia após o ensaio, em células High five e Sf21, no intuito de obter o vírus recombinante vRenbac foram observados por microscopia ótica de contraste de fase (Olympus CK-2) e se mostraram similares para as duas células utilizadas.

Os controles utilizados no ensaio são os mesmos apresentados na Figura 32 (controle negativo – A, infectada com AcMNPV-L1 – B, infectada com AgMNPV-2D – C, transfectada com AcMNPV-L1 – E e transfectada com AgMNPV-2D – F) e descrito anteriormente.

A Figura 34 mostra as alterações morfológicas das células após a transfecção com o bacmídeo recombinante BacRen e após a infecção com o vírus recombinante vRenbac e sua descrição é apresentada a seguir:

- 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 A).

- 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 B).

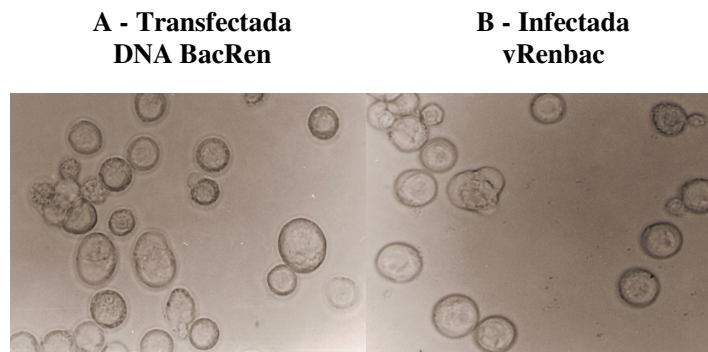


Figura 34 - Análise morfológica de células Sf21, 72 h após o ensaio, por microscopia ótica.

A amplificação por PCR das amostras com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse* é apresentada na Figura 35. Os produtos de amplificação do plasmídeo HTcRen (amostra 4), do bacmídeo recombinante BacRen (amostra 5), do plasmídeo pRHR1100 (amostra 6) e do vírus recombinante vRenbac (amostra 7), analisados em gel de agarose, são semelhantes, resultando em uma banda de cerca de 1,3 Kb, indicando a presença da pré-pró-renina nestas amostras. As demais amostras (HTc e vRolA) submetidas a PCR com os *primers* Ren *forward* e Ren *reverse* por não possuírem a inserção da pré-pró-renina não apresentaram banda no gel (amostras 3 e 8). O DNA do vRolA (amostra 8), vírus recombinante contendo o gene rolA

obtido também pelo sistema de expressão Bac-to-Bac, foi utilizado como controle negativo, já que este vírus não possui o gene da pré-pró-renina.

O bacmídeo possui sítio para os *primers* M13 *forward* e *reverse*, como apresentado na Figura 36; assim, foi feita a amplificação por PCR das amostras necessárias com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* como mais uma confirmação da presença da pré-pró-renina no vírus vRenbac e de sua inserção no bacmídeo, fato apresentado na Figura 37. O produto de amplificação do bacmídeo recombinante BacRen (amostra 5) e do vírus recombinante vRenbac (amostra 6), analisados em gel de agarose, são semelhantes, resultando em uma banda de cerca de 3,8 Kb (2.430 pb referente ao bacmídeo + 1.400 pb referente a renina). Já o DNA do vRolA utilizado como controle aqui irá produzir uma banda de cerca de 2,7 Kb (2.430 pb referente ao bacmídeo + 300pb referente ao RolA), pois foi construído com o mesmo bacmídeo do vRenbac e também apresenta sítio para o *primer* M13 (amostra 7). As demais amostras (HTc e HTcRen) foram submetidas a PCR apenas como controle não gerando banda, como esperado (amostra 3 e 4).

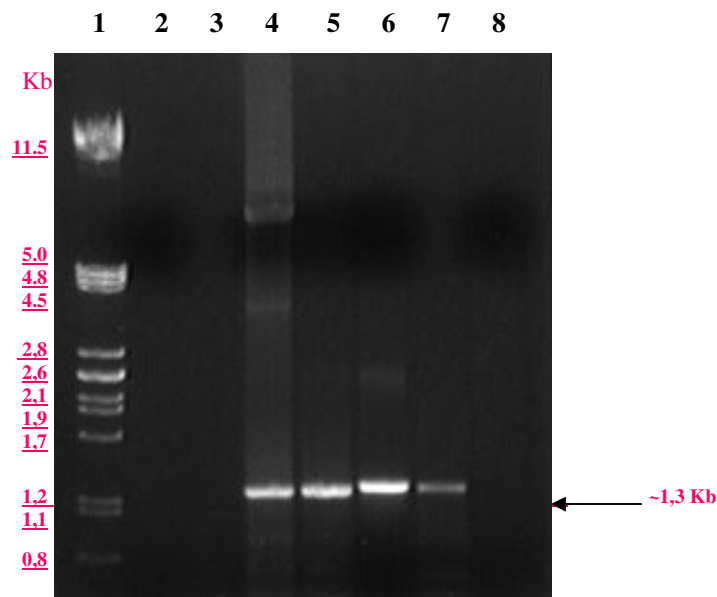


Figura 35 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no DNA do vírus recombinante, vRenbac utilizando a técnica de PCR. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo da PCR (sem DNA) com os primers Ren *forward* 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 vRolA com os primers Ren *forward* e Ren *reverse*.

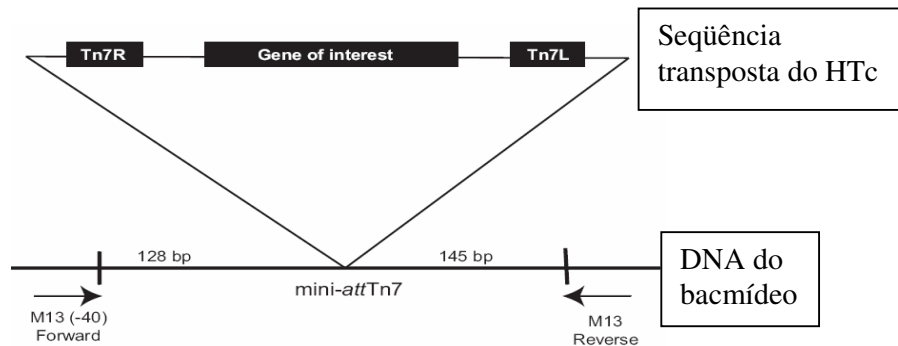


Figura 36 - Sítio de transposição do bacmídeo com a pré-pró-renina do HTcRen. O bacmídeo contém sítios de *primers* M13 *forward* (-40) e M13 *reverse* flanqueando o sítio mini-attTn7 na região de complementação *lacZα* para facilitar análise de PCR (Invitrogen – www.invitrogen.com).

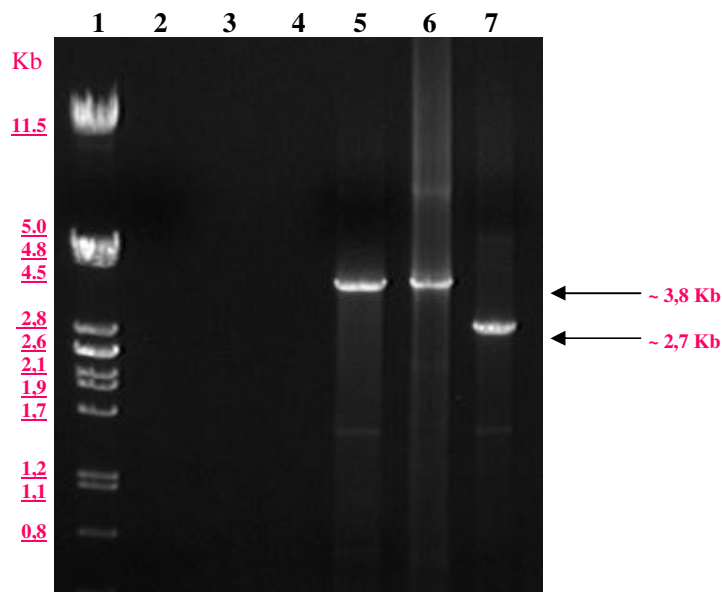


Figura 37 - Confirmação da inserção da pré-pró-renina no bacmídeo recombinante (BacRen) por transposição, formando o vírus vRenbac utilizando a técnica de PCR. Análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostra 1: marcador λ Pst I (Invitrogen); amostra 2: controle negativo 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 vRolA com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*.