

Figura 48 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 12.000x), mostrando o citoplasma (C) e o núcleo (N) com proteína p10 (P10) com espaçador eletrodense (EE).

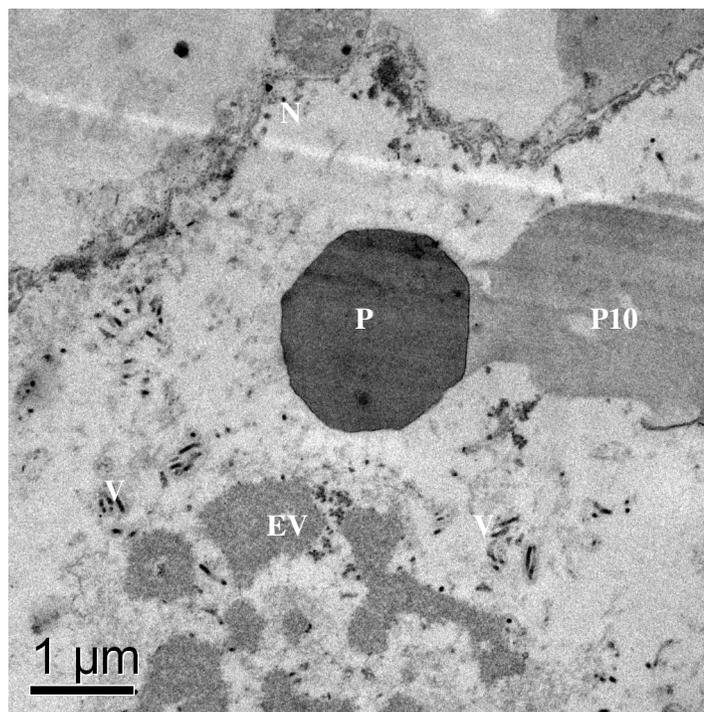


Figura 49 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 20.000x), mostrando o núcleo (N) com poliedro sem vírions incrustados, proteína p10 (P10), estroma virogênico (EV) e vírions (V) dispersos no núcleo.

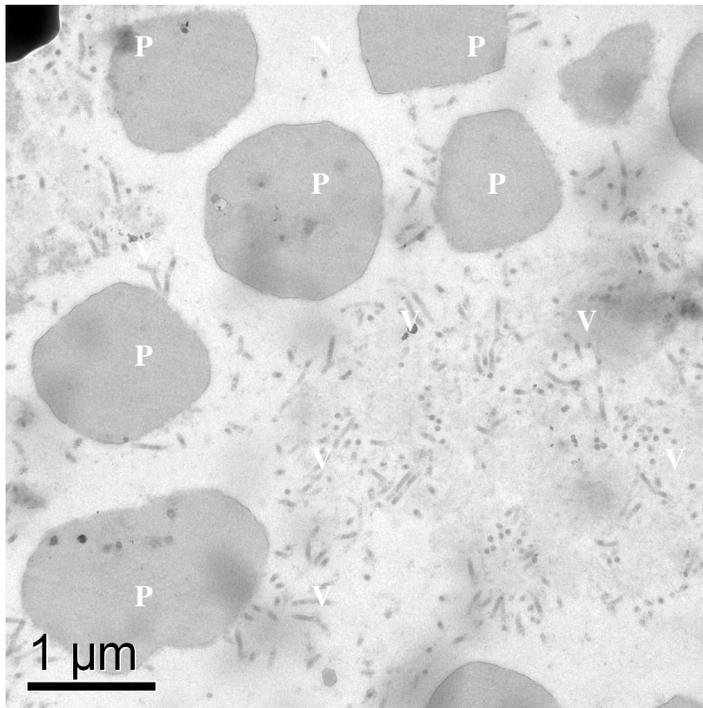


Figura 50 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 25.000x), mostrando o núcleo (N) com poliedros sem vírions incrustados e vários vírions (V) dispersos no núcleo.

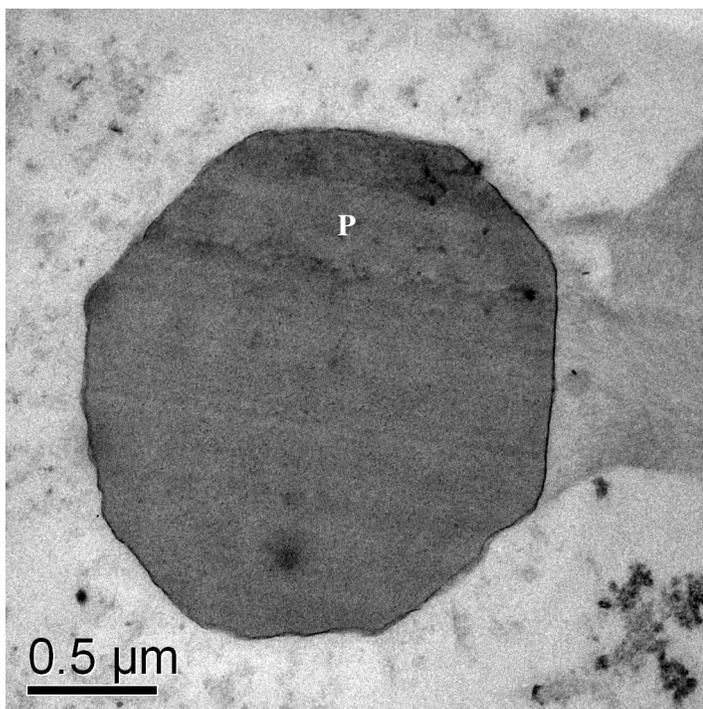


Figura 51 - Células Sf21 infectadas com vRen (aumento de 50.000x), mostrando em detalhe poliedro (P) sem vírions em seu interior.

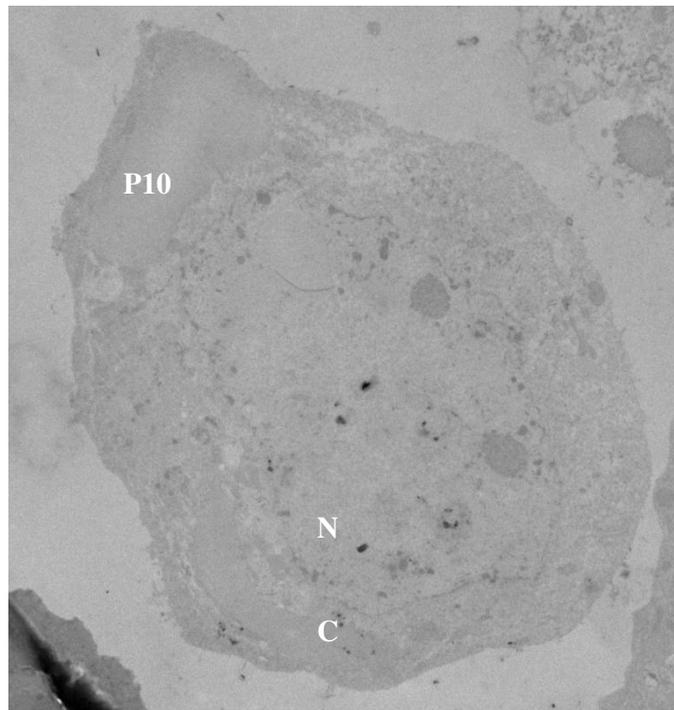


Figura 52 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 5.000x), mostrando o citoplasma (C) íntegro com p10 (P10) e o núcleo (N).

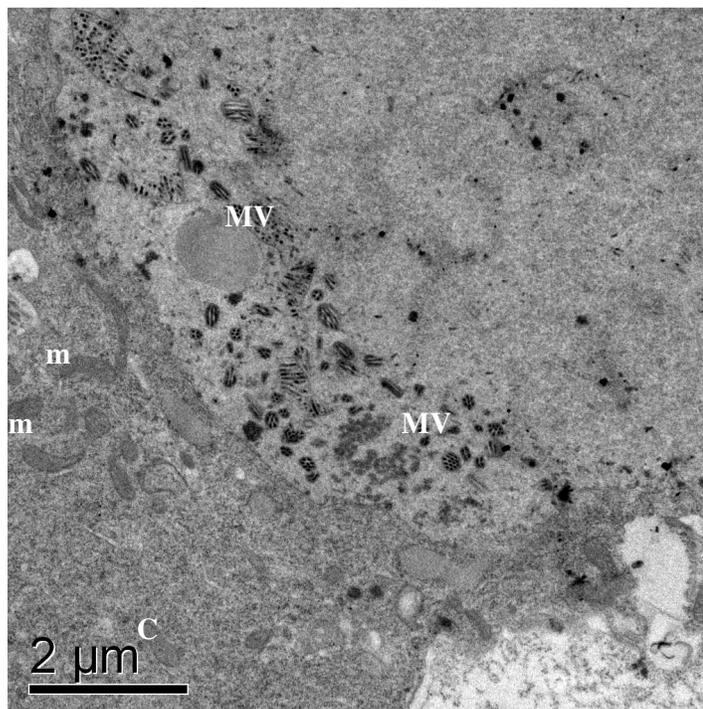


Figura 53 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 15.000x), mostrando o citoplasma (C) íntegro com mitocôndrias (m) e o núcleo (N) com área de montagem dos vírus (MV).

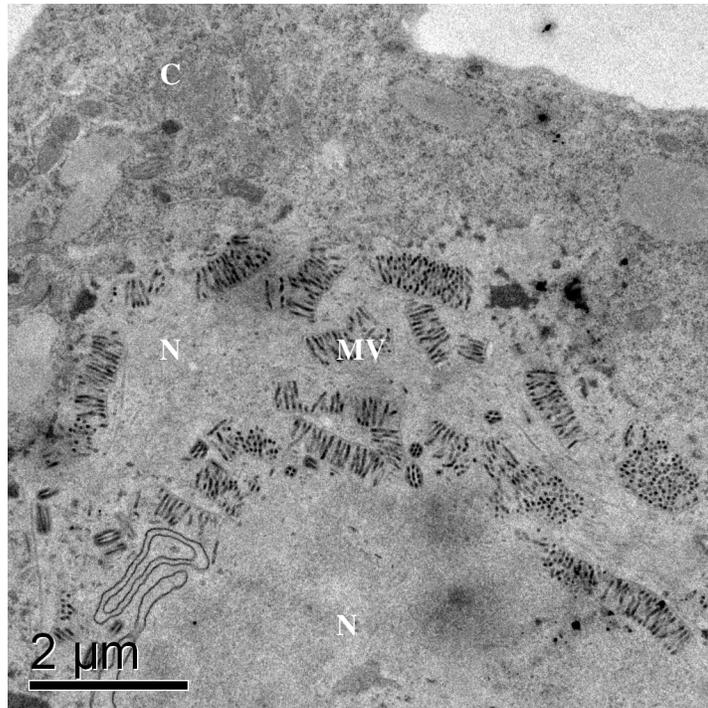


Figura 54 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 15.000x), mostrando o citoplasma (C) e o núcleo (N) com área de montagem dos vírus (MV).

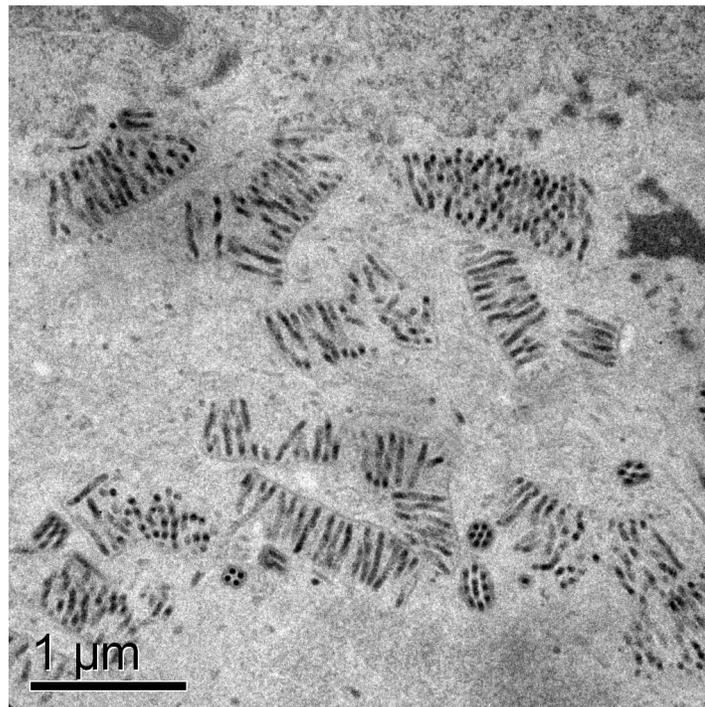


Figura 55 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 30.000x), mostrando a Figura 54 com maior detalhe.

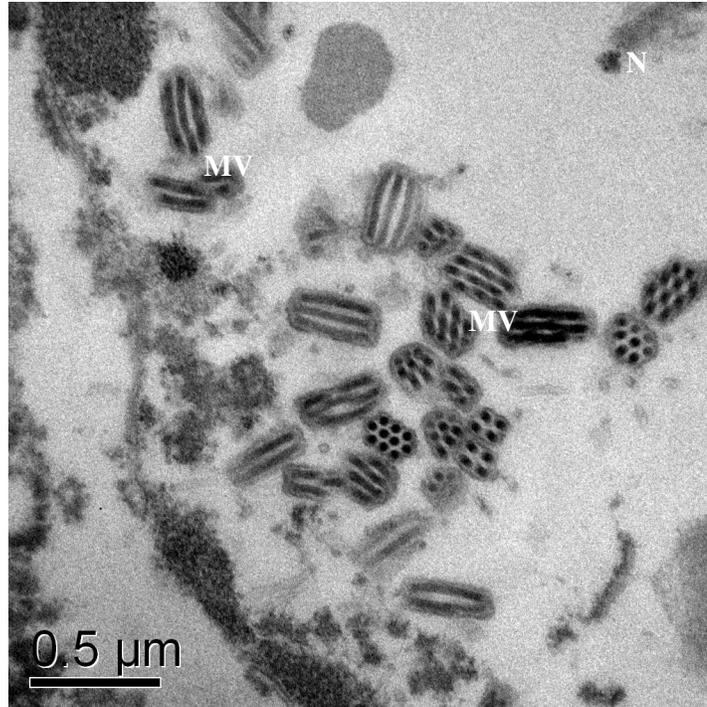


Figura 56 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 50.000x), mostrando o núcleo (N) com área de montagem dos vírus (MV) com vários vírions envelopados com diferentes números de vírions em seu interior.

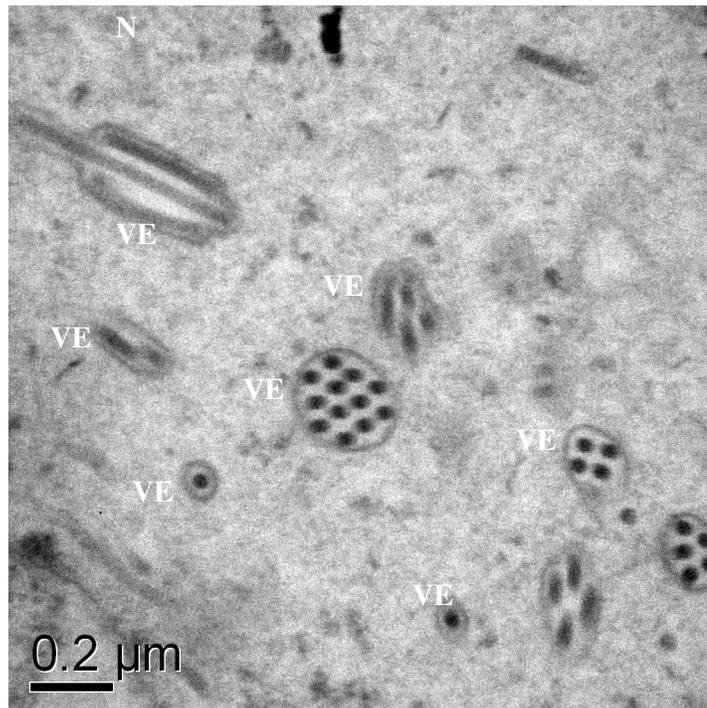


Figura 57 - Células Sf21 infectadas com vRenbac (aumento de 80.000x), mostrando o núcleo (N) com alguns vírus envelopados (VE) com diferentes números de vírions em seu interior.

9. Detecção de produtos de expressão *in vitro* (células)

- Análise do perfil protéico de células infectadas com vírus recombinante vRen:

A análise dos peptídeos das células sadias e das células infectadas com o vírus recombinante vRen, em gel de poliacrilamida-SDS, é mostrado na Figura 58. Inúmeras bandas são observadas no precipitado das células sadias, infectadas com AcMNPV-L1, AgMNPV-2D e vRen (amostras 2, 3, 4 e 5). Devido ao grande número de proteínas presentes no extrato celular, foi difícil visualizar bandas sintetizadas com maior intensidade. Por outro lado, o sobrenadante das amostras revelou a presença de uma banda forte de 68 kDa, que deve corresponder a albumina sérica bovina do meio de cultura. O perfil protéico obtido para as amostras citadas foram similares em células Sf21 e High five e, por isso, foi apresentado abaixo apenas o perfil obtido em células Sf21.

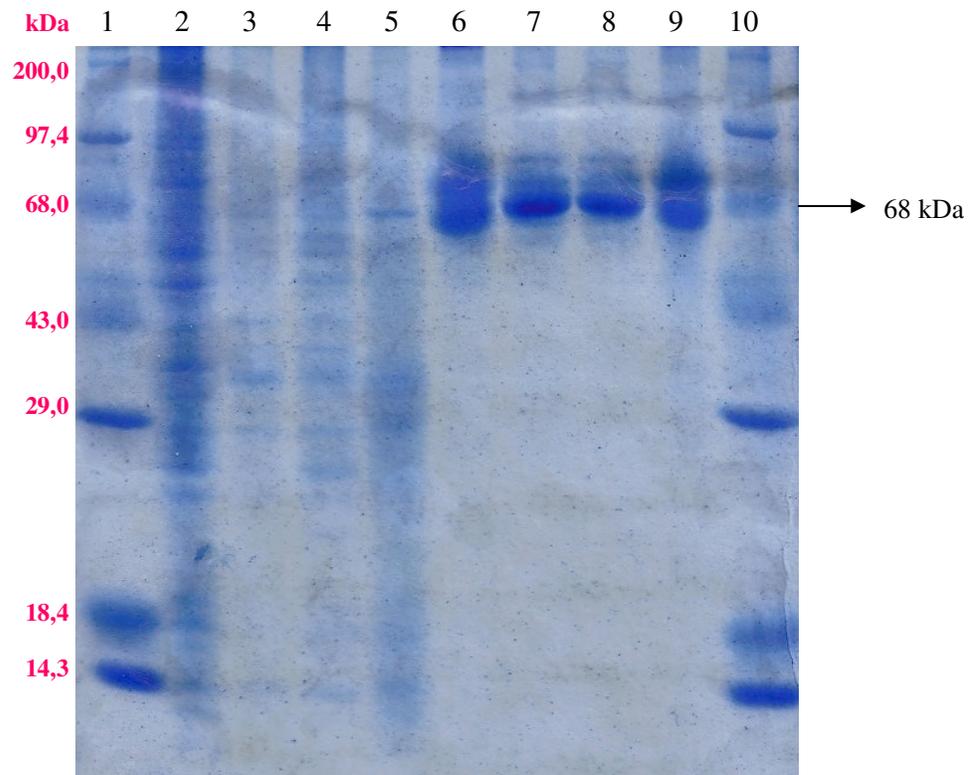


Figura 58 - Análise do perfil de proteínas de células Sf21 sadias e infectadas com vírus 72 hp.i. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%. Poço 1- marcador *Protein High molecular weight* (Life Technology); Poço 2- Células Sf21 (controle negativo); Poço 3- Células Sf21 infectadas com AcMNPV-L1; Poço 4- Células Sf21 infectadas com AgMNPV-2D; Poço 5- Células Sf21 infectadas com vRen; Poço 6- Sobrenadante de células Sf21; Poço 7- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com AcMNPV-L1; Poço 8- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com AgMNPV-2D; Poço 9- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com vRen; Poço 10- marcador *Protein High molecular weight* (Life Technology).

No ensaio de cinética da síntese de proteínas (Figura 59), uma grande variedade de bandas foi observada em células High five controle (poço 2) e células infectadas a 0 hp.i. (poço 3). As 24 hp.i. o perfil das células infectadas (poço 4) começa a se diferenciar do perfil das células controle. Entretanto, a maior mudança é observada as 48 hp.i. (poço 5) quando há um aumento de intensidade de uma banda de cerca de 40 kDa. As 72 hp.i. (poço 6) essa banda continua presente. É possível que esta proteína seja a renina, uma vez que o gene heterólogo está sob a direção do promotor forte da poliedrina (P_{synXIV}) e deve ser expresso na fase muito tardia da infecção. Entretanto, essa informação só pode ser confirmada após ensaio imunológico com anticorpo específico contra a renina. Uma banda de cerca de 29 kDa foi observada em células High five na fase tardia de infecção, 72 hp.i. (poço 6) e deve corresponder a poliedrina, principal componente protéico do poliedro. Esses resultados foram similares aos observados em células Sf21 infectadas com o vírus vRen.

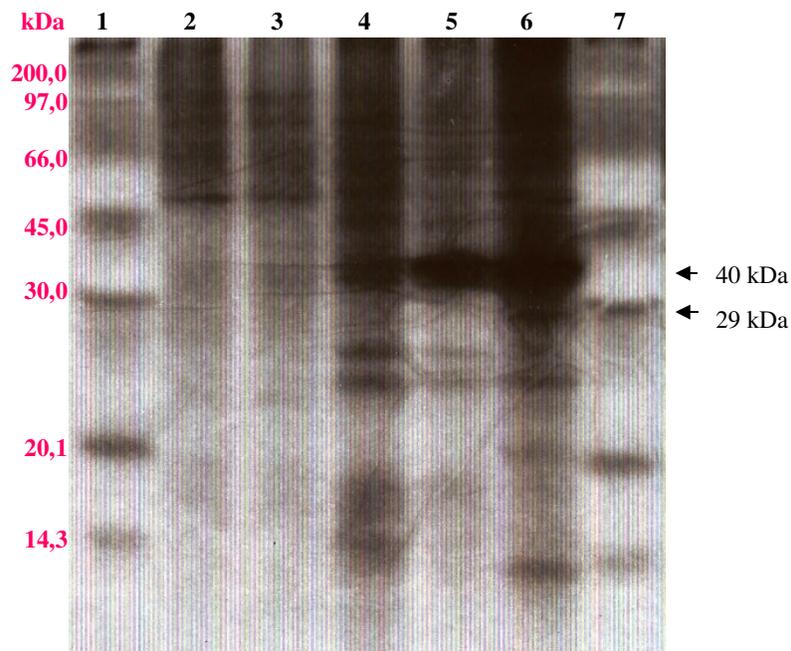


Figura 59 - Cinética da síntese de proteínas em células High five infectadas com vRen. Poço 1- *Rainbow*TM [¹⁴C] *methylated protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences); Poço 2- Células High five (controle negativo); Poço 3- Células High five 0 hp.i. com vRen; Poço 4- Células High five 24 hp.i. com vRen; Poço 5- Células High five 48 hp.i. com vRen; Poço 6- Células High five 72 hp.i. com vRen; Poço 7- *Rainbow*TM [¹⁴C] *methylated protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences).