

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

ANA CAROLINA VIEGAS CARMO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNA ANTIVIRAL DE *LONOMIA OBLIQUA* EM
SISTEMA BACULOVÍRUS/CÉLULA DE INSETO**

SÃO CARLOS - SP

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

ANA CAROLINA VIEGAS CARMO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNA ANTIVIRAL DE *LONOMIA OBLIQUA* EM
SISTEMA BACULOVÍRUS/CÉLULA DE INSETO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.**

**Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli
Mendonça**

Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS - SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C287ep

Carmo, Ana Carolina Viegas.

Expressão de proteína antiviral de *Ionomia obliqua* em sistema baculovírus/célula de inseto / Ana Carolina Viegas Carmo. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

136 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Agentes antivirais. 3. Células de inseto. 4. Baculovírus. 5. Hemolinfa. 6. Taturana. I. Título.

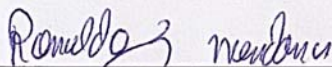
CDD: 660.6 (20^a)

Ana Carolina Viegas Carmo

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 16/02/2012

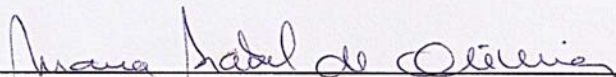
BANCA EXAMINADORA



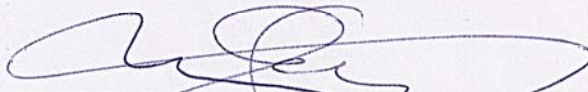
Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça (Orientador)
(Butantan/Laboratório de Parasitologia)



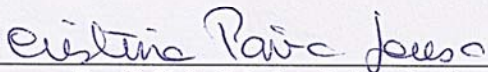
Dr^a. Cristina Adelaide Figueiredo
(Inst. Adolfo Lutz/Núcleo de doenças Respiratórias)



Dr^a. Maria Isabel de Oliveira
(Inst. Adolfo Lutz/ Laboratório de Biologia Molecular)



Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
(DMP-UFSCar)



Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Souza
(UFSCar)

**DEDICO ESTE
TRABALHO A DEUS E A
NOSSA SENHORA
APARECIDA.**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À Deus, pois sem Ele nada seria possível....

Aos meus orientadores Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça e Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo pela orientação e carinho.

Aos meus amigos do LATECC Camilo, Sandra, Simone, Thaís, Amanda, Thaila e do Laboratório de Parasitologia (Instituto Butantan) Rebeca, Nathália e em especial a Luciana pelo carinho e convivência agradável.

Aos meus amigos-irmãos Dalton Giovanni Nogueira da Silva e Lilian Hiromi Tomonari Yamasaki (Miuky) pela ajuda e pelo carinho no desenvolvimento desta tese. Amo vocês e sou eternamente grata por terem me aguentado quando eu “comi” um aminoácido!!

A gentileza e ao aceite por parte da banca e aos pesquisadores Dra. Rita de Cássia Stocco, Dra. Ana Beatriz Gorini da Veiga, Msc. Roberto Henrique Pinto Moraes, Dra. Maria Isabel de Oliveira e Dra. Cristina Adelaide Figueiredo pela ajuda pessoal e científica.

Ao pessoal do hospício pelas risadas e toda a paciência nos meus piores momentos, em especial ao Sérgio (da barraca), a Gabi e a Beth. Flor (Gabi), vamos fumar? Vale lembrar que eu nunca fumei!!!!

A todos os professores que ministraram aulas na UFSCar que foram essenciais ao meu processo de formação, bem como a todos os meus amigos e companheiros de pós-graduação, em especial o professor Dr. Fernando M. Araujo-Moreira e a Cláudia Pastega por ter me aguentado tantas vezes e pelo profissionalismo e competência.

A todos meus docentes e companheiros de graduação na UNESP, onde convivi com pessoas maravilhosas, em especial os amigos da Xis Elésima. Claudinha, Cris, Paulinha, Ana Z (minha irmã!), Bruna, Cíntia, Élen, Miuky, Nádia, Paulo, Wagner, Gabriel, Dayana, Hederson, Guilherme, Hill, Rodrigo Jana, Marina, Vanessa, Adriana. Aline gostaria de fazer um agradecimento especial a você por ter me dado um presente tão especial em um momento tão difícil, e não é que ELA passou na frente????

Ao meu amigo e futuro marido Haniel Han, por me apoiar imensamente na fase final deste trabalho, por ter tido toda a paciência do mundo comigo quando eu queria desistir e por ter chamado as minhas análises de bioinformática de palavras cruzadas. A minha sogra que chamou o meu DNA de “farinha”, pelo apoio e toda a compreensão nos momentos mais difíceis, não é atoa que é minha terceira mãe! Aos meus cunhados MalaDeco, Fabi, Bárbara e Júlio e a minha sobrinha Mirella que é uma verdadeira princesa.

Aos meus amigos pessoais de longa data Gustavo, Thiago Padilia, Ana Paula Ambrósio, Fazinha, Débora Ramalho e todos os outros!

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha família, que sempre acreditou em mim de forma incondicional. Ao meu vô (in memoria) que certamente seria a pessoa que mais se orgulharia deste momento, que me trazia livros de ciência quando eu ainda era pequena. A minha bisa (in memoria), que fazia bolinho de chuva comigo e me deixava brincar com meus presentes de Natal ainda em novembro escondido dos meus pais.

Vó Neusa, você é o máximo, uma das pessoas mais inteligentes do mundo, a quem devo muito, incluindo o “quase cair na panela de mingau” ou as várias vezes que a senhora perdeu o ônibus quando eu tirava o sapato. Mãe você é forte, guerreira, sonhadora e eu tenho muito a lhe agradecer por não ter me deixado desistir. Pai, obrigada por ter sido um exemplo de resiliência e persistência. Eles tentaram pai, mas não conseguiram...

Ao apoio financeiro cedido para a execução do projeto pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 08/5726235) e à CAPES pela bolsa de doutorado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Eu gostaria de agradecer e dedicar este trabalho de forma especial ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pois além de um amigo, ele foi um excelente orientador. Professor, obrigada pelo seu incentivo, paciência, brincadeiras, ensinamentos e disposição.

Obrigada por me entender nos momentos de “bipolarismo negativo” e por ter acreditado no meu trabalho e potencial. Obrigada por ter feito do desenvolvimento desta tese algo agradável e prazeroso.

O senhor é um exemplo de integridade, ética e profissionalismo científico e eu tenho muito orgulho de ter partilhado estes anos da minha formação com o senhor!

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

Albert Einstein

RESUMO

CARMO, A. C. V. **Expressão de proteína antiviral de *Lonomia obliqua* em sistema baculovírus/célula de inseto.** 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.

A tecnologia de cultivo de células animais tem permitido nos últimos anos o desenvolvimento de inúmeros bioprodutos. Principalmente com interesse farmacológico, alguns desses produtos, as proteínas recombinantes, podem ser produzidas em sistemas de expressão heterólogos em escala comercial. Bactérias, leveduras, células de mamíferos e de insetos são alguns dos hospedeiros utilizados nestes processos. Como fonte de proteínas de interesse farmacológico, a hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* mostrou-se um organismo bastante promissor. Proteínas antivirais, antiapoptóticas, antimicrobianas e indutoras de crescimento são alguns destes exemplos. Como o controle das infecções virais é de grande interesse pra saúde pública, a busca por novos antivirais é de extrema importância. Diversos estudos relatam a presença de princípios ativos na hemolinfa de artrópodes. Recentemente nós demonstramos a existência de uma proteína antiviral na hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua*. Esta proteína purificada mostrou-se capaz de reduzir a produção viral (TCID₅₀ mL⁻¹) mais de 157 vezes o vírus do sarampo, 61 vezes para o vírus da pólio e 61 vezes para o vírus influenza H1N1. Assim, este estudo objetivou a construção e expressão de um recombinante contendo sequências de codificação da proteína antiviral para a expressão em sistema baculovírus/célula de inseto Sf-9 e a realização de testes de atividade biológica e caracterização por bioinformática. Para sintetizar cDNA, o RNA de *L. obliqua* foi extraído com o reagente Trizol e usado nas reações de RT-PCR com *primers* específicos para a proteína antiviral, com base na sequência das bibliotecas de cDNA de *L. obliqua* de tegumento e espículas, utilizando todos os *frames* de tradução possíveis para cada cDNA. Sítios de restrição foram inseridos no cDNA para ligação ao vetor doador pFastBacTM 1 (Invitrogen). O plasmídeo recombinante selecionado em *Escherichia coli* DH5α foi utilizado na transformação em *E. coli* DH10Bac para a obtenção do bacmídeo pelo processo de transposição. O bacmídeo recombinante foi utilizado para a expressão da proteína antiviral em células SF-9. A atividade desta proteína recombinante foi testada em Picornavírus (EMC - encephalomiocardite), Rubéola e Herpes. Nestes testes foi observado que a proteína reduziu em 10.000, 10.000 e 1.000.000 a titulação viral, respectivamente. As análises de bioinformática demonstraram que esta proteína é secretada, globular e provavelmente pertença a uma nova classe de proteínas.

Palavras-chave: Antiviral. Células de inseto. Baculovírus. Hemolinfa. *Lonomia obliqua*.

ABSTRACT

CARMO, A. C. V. **Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* in baculovirus/insect cell system.** 2012. 136 p. Thesis (Biotechnology) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.

In recent years, the technology animal cells culture has allowed the development of many byproducts, especially those with pharmacological interest. Some of these products, the recombinant proteins, can be produced by heterologous expression systems on a commercial scale. Bacteria, yeast, mammalian cells and insects are some of the hosts used in these processes. As source of proteins with farmacological interest, the caterpillar *Lonomia obliqua* hemolymph was demonstrated to be a helpful organismo. Antiviral, antiapoptotic, antimicrobial and inducing growth proteins, are some of examples. Since the control of viral infections is a major interest to public health, the searching for new antiviral drugs has utmost importance. Several studies have reported the presence of active principles in the arthropods hemolymph. Recently, we demonstrated the existence of an antiviral protein in the hemolymph of the caterpillar *Lonomia obliqua*. This purified protein induced viral production reduction (TCID₅₀ mL⁻¹) over 157 times in cells infected with the measles virus, 61 times for polio and 61 times for influenza virus H1N1 infections. Thus, the present goals were building and expression of a recombinant plasmid contained coding sequences for expression of viral proteins (using baculovirus) in insect cell Sf-9 system. By this process, it was aimed to test biological activity of the protein. Further sequence analyses of this protein were performed using bioinformatics tools. The RNA of *L. obliqua* was extracted with Trizol reagent. RNA product was used in RT-PCR reactions with primers specific for the antiviral protein, based on the sequence of the cDNA libraries of *L. obliqua* tegument and spines, using all possible frame of translation for each cDNA. Restriction sites were inserted in cDNA sequence to insert it in pFastBacTM1 donor vector (Invitrogen). The sequence contained in selected clone of *Escherichia coli* DH5 α was used for transformation into *E. coli* DH10Bac to obtain a bacmid by transposition process. This bacmid was used for antiviral recombinant protein expression in Sf-9 cells. This recombinant protein activity was tested in Picorna (EMC encephalomyocardite), Rubeola and Herpes virus. In these trials, it was observed a replication reduction of 10,000, 10,000 and 1,000,000 times, respectively. The bioinformatics analysis demonstrated that this protein is secreted, globular and probably belongs to a new class of proteins.

Key words: Antiviral. Insect cells. Baculovirus. Hemolymph. *Lonomia obliqua*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de vírion.....	26
Figura 2 - Plot demonstrando o total de cadeias protéicas depositadas no PDB, cujo sistema de expressão empregado foi baculovírus ou células de mamíferos por ano de deposição.....	28
Figura 3 - Recombinação linear com vetor de transferência.....	31
Figura 4 - Vantagens para a utilização do sistema BEVS.....	32
Figura 5 - Geração do bacmídeo recombinante conforme manual Bac-to-Bac®.....	34
Figura 6 - Linhagens celulares que são utilizadas para expressão heteróloga em baculovírus e seus respectivos insetos de origem.....	36
Figura 7 - Lagarta da espécie <i>Lonomia obliqua</i> (lagarta de fogo).....	37
Figura 8 - Hábito gregário de lagartas <i>Lonomia obliqua</i>	38
Figura 9 - Ultraestrutura do tegumento de <i>Lonomia obliqua</i>	38
Figura 10 - Ciclo de vida da <i>Lonomia obliqua</i>	39
Figura 11 - Planejamento experimental do desenvolvimento deste trabalho.....	48
Figura 12 - Sequência de aminoácidos da proteína antiviral obtidos por degradação de Edman.....	50
Figura 13 Análise SDS-PAGE de cerdas, extrato de tegumento, hemolinfa e criosecção de <i>Lonomia obliqua</i>	51
Figura 14 Mapa do vetor pFastBac™1 (Invitrogen) com os sítios de clonagem.....	53
Figura 15 Construção de recombinante pFastBac 1 + rAVLO.....	54
Figura 16 - Construção de recombinante pFastBac 1 + proteína 5.....	55
Figura 17 - Exemplo de classificação de dificuldade de cristalização.....	70
Figura 18 Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência correspondente a proteína 1 (rAVLO) (587 pb).....	72
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência correspondente a proteína 5 (8-LOH) (963 pb).....	72
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência correspondente a proteína antiviral (Proteína 1) (587 pb).....	73

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (1%) para confirmação da clonagem, com a amplificação da sequência correspondente a proteína 5 (8-LOH) (963pb).....	73
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a liberação do inserto após digestão enzimática com as enzimas utilizadas para o processo de clonagem.....	74
Figura 23 - Sequências nucleotídicas e de aminoácidos da proteína com atividade antiviral hipotética e clonada demonstrando as mutações pontuais.....	75
Figura 24 Placa com colônias de <i>E. coli</i> DH10Bac™ após transposição para geração de bacmídeo contendo a sequência para expressão da proteína antiviral.....	76
Figura 25 Região de transposição do baculovírus com rAVLO e confirmação em gel de agarose (1%).....	78
Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a presença do DNA da proteína recombinante AcMNPV-AVLO em célula Sf-9.....	79
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a presença da transcrição da sequência da proteína recombinante AcMNPV-AVLO em célula Sf-9.....	80
Figura 28 - Sequência do cDNA da proteína recombinante rAVLO.....	80
Figura 29 - Western Blot da proteína antiviral.....	81
Figura 30 – Cromatografias em coluna de gel filtração.....	82
Figura 31 – Cromatografias em colunas de troca iônica.....	83
Figura 32 - Curva padrão de BSA utilizada para quantificação de proteínas.....	84
Figura 33 - Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9.....	85
Figura 34 Efeito antiviral da proteína recombinante, células L929 infectadas com o vírus EMC.....	87
Figura 35 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral.....	90
Figura 36 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pelos recombinantes antiviral rec 10, rec 16 e rec 23 e por suas frações purificadas.....	92
Figura 37 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pelos recombinantes antiviral rec 10 e rec 23 e por uma construção sem proteína recombinante (Fr5).....	93
Figura 38 Efeito do baculovírus recombinante AcMNPV-AVLO e do baculovírus sem presença de proteína recombinante (rec5), na inibição da replicação do vírus EMC.....	94

Figura 39 - Citometria de fluxo de duas amostras de cultivos infectados com baculovírus, uma infectada com o AcMNPV-AVLO e outra contendo um baculovírus vazio, sem proteína recombinante.....	95
Figura 40 - Presença de códons raros na linhagem de células Sf-9.....	97
Figura 41 - Presença de códons raros na cepa bacteriana <i>E. coli</i> K12.....	98
Figura 42 - Sequência da proteína antiviral gerada pelo ExPASy.....	99
Figura 43 - Gráfico demonstrando a baixa tendência a desordem dos aminoácidos formadores da proteína antiviral.....	100
Figura 44 - Análise para predição de localização celular realizada pelo programa TargetP 1.1 Server.....	101
Figura 45 - Análise para predição de localização celular pelo programa pelo programa SignalP 3.0 Server.....	101
Figura 46 - Gráfico gerado pelo programa SignalP 3.0, determinando provável sítio de clivagem da proteína.....	102
Figura 47 - Possível estrutura secundária da proteína antiviral de <i>Lonomia obliqua</i> gerada pelo programa QuichPhyre.....	103
Figura 48 - Resultado obtido a partir de alinhamento de <i>fold</i> pelo programa QuichPhyre.....	105
Figura 49 - Predição de clivagem proteossômica.....	106
Figura 50 - Previsões geradas utilizando Redes Neurais Artificiais pelo programa NetMHC versão 3.2 com o alelo HLA-A0202.....	107
Figura 51 - Previsões geradas utilizando Redes Neurais Artificiais pelo programa NetMHC versão 3.2 com o alelo HLA-A0201, HLA-A0203 e HLA-A0250.....	107
Figura 52 - Classificação de cristalização.....	108
Figura 53 - Gráfico de acessibilidade demonstrando as possíveis regiões protéicas de maior acessibilidade.....	109
Figura 54 - Gráfico de interiorização demonstrando as possíveis regiões protéicas de maior probabilidade de serem interiorizadas.....	109
Figura 55 – Gráfico de antigeneidade.....	110
Figura 56 - Sequência da região de múltipla clonagem do vetor de expressão pFastBac TM 1.....	125
Figura 57 - Mapa com a descrição do vetor doador pFastBac TM 1.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista com os 10 produtos da empresa Biopharma mais vendidos em 2010.....	23
Tabela 2 - Comparação entre sistemas de expressão recombinantes.....	29
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação da sequência codificadora da proteína antiviral.....	53
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação da sequência codificadora da proteína 8-LOH.....	53
Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados no sequenciamento para a confirmação da clonagem do plasmídeo doador pFastBac1 TM	57
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados para a confirmação da transposição.....	59
Tabela 7 - Tamanho esperado dos fragmentos gerados por PCR resultantes do processo de transposição.....	77
Tabela 8 - Determinação da quantidade de proteínas presentes na hemolinfa e nas frações purificadas dos recombinantes rAVLO.....	84
Tabela 9 - Produção de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929.....	88
Tabela 10 - Redução do título viral de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929.....	91
Tabela 11 - Produção do vírus da Herpes (células VERO) e do vírus da Rubéola (células SIRC).....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus
AcMNPV-rAVLO	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Multiplie Nuclear Polihedrosis Vírus com sequência recombinante da proteína antiviral
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Multiplie Nuclear Polihedrosis Vírus
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
apoLp-III	Apoliforina III
ATP	Adenosina trifosfato
AVLO	Proteína antiviral da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>
Bac W	Bacmídeo selvagem (AcMNPV)
BEVS	Sistema de Expressão baseado em Baculovírus
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
BVs	<i>Budded Virus</i>
CAV-2	Adenovírus canino 2
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dieill pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	DL-Ditiotreitol
EMC	Vírus da encefalomiocardite
FCV	Calicivírus felino
GV	<i>Granulovirus</i>
Hb	Hemolinfa
His ₆	Cauda formada por 6 histisinas
HIV-1	Vírus da imunodeficiência adquirida-1
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

HSV	Virus herpes simplex tipo-1
HUVECs	Células endoteliais da veia umbilical humana
HVJ	Vírus Sendai
HzSNPV	<i>Heliothis zea</i> nuclear polyhedrosis Vírus
IFN	Interferon
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactoside
kb	Quilobase
L929	Linhagem celular de fibroblasto de <i>Mus musculus</i>
Lopap	<i>Lonimia obliqua</i> prothrombin activator protease
Losac	<i>Lonomia obliqua</i> Stuart-factor activator
MEM	Meio mínimo essencial
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (multiplicidade de infecção)
NPV	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
ODVs	<i>Oclclusion-Derived Virus</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> , matriz aberta de leitura
p29	Gene da poliedrina
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P _{PH}	Promotor da poliedrina
rAVLO	Proteína antiviral recombinante da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>
Rec 10, Rec 16 e Rec 23	Construções recombinantes contendo a sequência da proteína antiviral
Rec 5	Bacmídeo comercial Bac-to-Bac® transposto com o vetor (pFastBac TM 1) vazio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT	Reação de transcriptase reversa
S2	Linhagem celular originária de <i>Drosophila</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Sf-9, Sf-21	Linhagens celulares do ovário da pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRC	Células de córnea de coelho – <i>Oryctologus aniculus</i>

TCID ₅₀ /mL	Maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular
TEV	Vírus do mosaico do tabaco
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tni	<i>Trichoplusia ni</i>
TOI	<i>Time of infection</i> (momento de infecção)
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
UFLAG	Linhagem de células de <i>Anticarsia gemmatalis</i>
VLPs	Partículas virais semelhantes a vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Proteína antiviral	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Baculovírus selvagem e recombinante	26
2.1.1 Importância econômica dos baculovírus	27
2.1.2 Expressão de proteínas heterólogas	28
2.1.3 Baculovírus como sistema de expressão	29
2.1.4 Vantagens e desafios do uso do sistema de expressão em baculovírus	32
2.1.5 Sistema <i>Bac-to-Bac</i>	33
2.1.6 Linhagens celulares utilizadas no sistema de expressão em baculovírus	35
2.2 <i>Lonomia obliqua</i>	37
2.2.1 Produtos biotecnológicos obtidos de insetos	40
2.2.2 Produtos de interesse biotecnológico presentes na <i>Lonomia obliqua</i>	41
2.2.3 Antivirais	41
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Linhagem celular, meio de cultivo e cultivo celular	45
4.2 Vírus e infecção	45
4.2.1 Baculovírus e recombinantes	45
4.2.1.1 Infecção de células Sf-9 por baculovírus	46
4.2.1.2 Definição de passagem viral ou passagem nos cultivos	46
4.2.1.3 Titulação viral dos baculovírus	46
4.2.2 Outros vírus	47
4.2.2.1 Vírus da Herpes, Picornavírus e Rubéola	47
4.2.2.2 Titulação viral dos vírus da Herpes, Picornavírus e Rubéola	47
4.3 Hemolinfa	47
4.3.1 Efeito da hemolinfa na replicação viral	47
4.4 Geração do baculovírus recombinante e produção da proteína antiviral	48
4.4.1 Planejamento Experimental	48
4.4.1.1 Extração de RNA e geração de cDNA	49
4.4.1.2 Amplificação das sequências de interesse	49
4.5.1 Geração do vetor recombinante pFastBac TM 1	53

4.5.1.1 Vetor pFASTBac TM 1	53
4.5.1.2 Ensaio de restrição enzimática	54
4.5.1.3 Reação de ligação	56
4.5.2 Análise dos transformantes	56
4.5.2.1 Triagem por PCR	56
4.5.2.2 Ensaio de restrição enzimática	57
4.5.2.3 Sequenciamento nucleotídico	57
4.5.3 Geração do bacmídeo recombinante	57
4.5.3.1 Análise e isolamento do bacmídeo recombinante	58
4.5.3.2 Transfecção em célula de inseto com o baculovírus recombinante antiviral AcMNPV-AVLO e AcMNPV-8-LOH	60
4.5.3.3 Confirmação da presença do recombinante nos cultivos transfectados	61
4.5.4 Confirmação da sequência da proteína recombinante	61
4.5.5 Identificação da proteína recombinante por anticorpo anti-histidina	62
4.5.5.1 Microscopia eletrônica	63
4.6 Procedimentos analíticos	63
4.6.1 Purificação da proteína recombinante	63
4.6.2 Dosagem protéica de amostra da proteína recombinante	64
4.6.3 Concentração e viabilidade celular	64
4.6.4 Determinação de aminoácidos	64
4.7 Procedimentos para análise da atividade antiviral	64
4.7.1 Teste de atividade antiviral do sobrenadante de cultivo infectado com a proteína recombinante	64
4.7.2 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral	65
4.7.3 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela proteína recombinante antiviral total do sobrenadante e da proteína recombinante purificada	65
4.7.4 Ação da proteína recombinante antiviral sobre o vírus da Herpes e da Rubéola	66
4.7.5 Efeito do baculovírus sobre a replicação do vírus EMC	66
4.7.6 Determinação do tamanho e granulosidade das células infectadas com o recombinante antiviral por Citometria de fluxo	66
4.8 Bioinformática	67
4.8.1 Escolha do sistema de expressão	67
4.8.2 Caracterização da proteína com atividade antiviral por bioinformática	67
4.8.2.1 IUPRED (Previsão de Proteínas não estruturadas intrinsecamente)	67
4.8.2.2 TargetP 1.1 Server e SignalP 3.0 Server	67
4.8.2.3 Predição de estrutura secundária	68
4.8.2.4 Predição de clivagem proteossômica (MAPPP)	68

4.8.2.5 NetMHC 3.2 Server e NetMHCII 2.2 Server	69
4.8.2.6 JaMBW (Gráfico de antigenicidade).....	69
4.8.2.7 Predição de dificuldade para cristalização (XtalPred).....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Proteína antiviral recombinante.....	71
5.1.1 Sequência da proteína antiviral	71
5.1.2 Geração das sequências das proteínas de interesse	71
5.1.2.1 Extração de RNA e geração de cDNA	71
5.1.2.2 Amplificação das proteínas de interesse.....	71
5.1.2.3 Clonagem em pFASTBac TM 1	73
5.1.2.4 Sequenciamento nucleotídico da proteína antiviral.....	74
5.2 Geração dos bacmídeos recombinantes.....	77
5.2.1 Análise e isolamento do bacmídeo recombinante	78
5.2.1.1 Confirmação da presença da partícula viral nos cultivos transfectados	79
5.2.1.2 Confirmação da presença do recombinante nos cultivos transfectados	80
5.2.1.3 Confirmação da sequência da proteína recombinante	81
5.2.1.4 Identificação da proteína recombinante por anticorpo anti-histidina	82
5.2.1.5 Purificação da proteína recombinante antiviral rAVLO.....	82
5.2.2 Dosagem protéica de amostra da proteína recombinante	85
5.2.3 Determinação de aminoácidos.....	86
5.3 Atividade da proteína antiviral recombinante	88
5.3.1 Teste de atividade antiviral do sobrenadante do cultivo infectado com baculovírus recombinante e da proteína recombinante purificada.....	88
5.3.1.1 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral.....	91
5.3.1.2 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela proteína recombinante antiviral purificada.....	93
5.4 Efeito do baculovírus sobre a replicação do vírus EMC	96
5.4.1 Determinação do tamanho e granulosidade das células infectadas por Citometria de fluxo.....	96
5.5 Bioinformática (Análise <i>in silico</i>)	98
5.5.1 Escolha do sistema de expressão	98
5.5.2 Caracterização da proteína com atividade antiviral por bioinformática.....	101
5.5.2.1 Determinação da sequência da proteína antiviral	101
5.5.2.2 Determinação da estrutura da proteína antiviral.....	101
5.5.2.3 Determinação da probabilidade de secreção e possível região de clivagem da proteína rAVLO.....	102
5.5.2.4 Predição de estrutura secundária	104

5.5.2.5 Predição de clivagem proteossômica (MAPPP).....	107
5.5.2.6 Ligação da proteína antiviral com sítios de HLA.....	108
5.5.2.7 Probabilidade de cristalização da proteína	110
5.5.2.8 Gráfico de acessibilidade e gráfico de <i>buried</i> (interiorização).....	110
5.5.2.9 Determinação da região de atividade antigênica	112
6 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE A – Sítio de múltipla clonagem do vetor pFastBacTM1.	129
APÊNDICE B - Mapa do vetor doador pFastBacTM1.....	130
APÊNDICE C - Código de abreviatura dos aminoácidos.	131
ANEXO - Artigo apresentado na íntegra.....	132

1 INTRODUÇÃO

Atualmente conhecido como Tecnologia de Cultivo de Célula Animal, a manutenção de células animais em laboratório iniciou-se na última década do século 19. Desde então, inúmeros avanços nas pesquisas foram alcançados, principalmente relacionados à produção de meios de cultivo definidos e aos avanços da engenharia genética. O desenvolvimento desta tecnologia nos permite a produção de vacinas virais, anticorpos monoclonais, glicoproteínas complexas estruturadas e proteínas recombinantes para diagnóstico e terapia. (KRETZMER, 2002).

A produção de bioprodutos a partir de cultivo de células animais conta com importantes ferramentas biotecnológicas, como o desenvolvimento de linhagens celulares, os processos de engenharia voltados para o aumento de produtividade, a genômica e a proteômica, a otimização do metabolismo celular, o controle de apoptose e redução da instabilidade (KUYSTERMANS et al., 2007).

As proteínas são consideradas de fundamental importância para o metabolismo normal de um organismo. Uma vez que atuam como catalisadores de reações metabólicas, componentes estruturais responsáveis por interações inter e intracelular e sinalização, eventuais problemas na expressão de proteínas por um organismo pode causar sérias doenças. Para o tratamento destas enfermidades, a administração de proteínas produzidas em laboratório vem sendo aplicado de modo satisfatório, o que torna a produção de proteínas recombinantes uma das áreas mais importantes e promissoras para a indústria farmacêutica (FERRER-MIRALLES et al., 2009).

O mercado mundial de proteínas recombinantes para fins terapêuticos e farmacêuticos movimentou em 2007 cerca de 86 bilhões de dólares, com previsão para duplicar estes valores em 2013 (HUANG; MCDONALD, 2012).

Com o crescente aumento da demanda por biofármacos, as indústrias farmacêuticas começaram a utilizar a tecnologia da engenharia genética para esta produção. O primeiro passo desta metodologia é a clonagem, seguido pela expressão da proteína no sistema escolhido. Bactérias, leveduras, fungos, plantas e animais transgênicos, linhagens celulares de plantas, mamíferos ou insetos estão atualmente disponíveis para esta finalidade (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Esta tecnologia permitiu a produção de inúmeros produtos, sendo que, somente em 2010, 9 dos 10 produtos da empresa Biopharma com maior faturamento foram obtidos a partir desta tecnologia (**Tabela 1**) (<http://www.biopharma.com/top50biopharma.pdf>).

Tabela 1 - Lista com os 10 produtos da empresa Biopharma mais vendidos em 2010.

Nome comercial	Descrição	Comerciantes 2010	Receita revenda
Enbrel	TNF Mab, rDNA	Amgen/ Pfizer	\$7.287
Avastin	VEGF Mab, rDNA	Roche	\$6.973
Rituxan	CD20 Mab, rDNA	Roche / Biogen	\$6.859
Remicade	TNF Mab, rDNA Mab, rDNA	Johnson & Johnson	\$6.520
Herceptin	HER2 receptor	Roche	\$5.859
Humira	TNF Mab, rDNA	Baixo	\$5.488
Lantus	Insulin glargine, rDNA	Sanofi	\$4,834
Neulasta	G-CSF, rDNA, PEG	Amgen	\$3,558
Lucentis	VEGF Mab Fab, rDNA	Roche	\$3.106
Aranesp	EPO, darbo-, rDNA	Amgen	\$2.995

FONTE: <http://www.biopharma.com/top50biopharma.pdf>

O sistema bacteriano é o mais utilizado para a expressão de proteínas heterólogas. Este sistema apresenta protocolos mais simples, disponibilidade de várias cepas e vetores de expressão, custos menores e altos rendimentos (TROWITZSCH et al., 2010). Porém, como o hospedeiro é um organismo procarionte, algumas modificações pós-traducionais não são realizadas de forma eficiente, bem como a utilização de códons divergentes pelos utilizados por células humanas (REYES-RUIZ; BARRERA-SALDAÑA, 2006).

Para a solução desta problemática, o sistema de expressão baseado em baculovírus (BEVS) foi desenvolvido para a produção de proteínas recombinantes mais complexas (que necessitam de modificações pós-traducionais) em células de inseto. Neste sistema, o vírus recombinante é utilizado para infectar as células de insetos. Durante a infecção, o baculovírus recombinante é replicado e as proteínas exógenas são produzidas (BELJELARSKAYA, 2011).

As proteínas recombinantes possuem as mais diversas aplicações como, diagnóstico (BARBER; CLEGG; LLOYD, 1990), produção de epítopos para vacinas biossintéticas (TAMI et al., 2004), produção de vacinas para uso humano (SAFDAR; FIDSA; COX, 2007).

Por serem capazes de infectar apenas células de inseto, os baculovírus são utilizados de forma segura em outros processos biotecnológicos. O controle biológico por estes vírus é realizado de forma seletiva contra pragas (principalmente Lepidoptera) (SZEWCZYK et al., 2009; MOSCARDI, 1999; ZWART et al., 2010; BIXBY-BROSI; POTTER, 2011), assim como em diversos procedimentos de terapia gênica (PAUL et al.,

2011; RIVERA-GONZALEZ et al., 2011), incluindo a entrega de genes de proteção em órgãos sólidos durante os procedimentos de transplante (HITCHMAN et al., 2011).

Por apresentarem um grande interesse comercial em sua produção, muitas proteínas são alvo da indústria biotecnológica. Neste contexto, a lagarta *Lonomia obliqua* ganha grande destaque no cenário da biotecnologia brasileira, devido ao fato de que nosso grupo de pesquisa no Instituto Butantan de São Paulo encontrou em sua hemolinfa proteínas com atividades de grande interesse aplicado, como: antivirais, antimicrobianas, fatores de crescimento, antiapoptóticas e potencializadores da produção de proteínas recombinantes.

Vários trabalhos de pesquisa realizados pelo grupo demonstram não só a presença dessas proteínas na hemolinfa da lagarta, como também a comprovação e caracterização do efeito biológico em aplicações práticas inovadoras. Neste estudo, nosso alvo foi a expressão recombinante e caracterização de uma proteína antiviral isolada da hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua*.

Este trabalho possui grande relevância, devido ao baixo número de antivirais presentes no mercado, fazendo-se de extrema importância a descoberta e a caracterização de novas drogas. O medicamento Oseltamivir (Tamiflu® – Roche) merece destaque, uma vez que, Kao et al. (2010) apontaram com base na sequência genética e na estrutura predita da Neuraminidase (alvo de inibidores como oseltamivir e zanamivir – comercialmente conhecido como Relenza®), que o H1N1 podia desenvolver resistência ao Tamiflu facilmente.

1.1 Proteína antiviral

O controle de viroses é de alto interesse na área de saúde pública e animal, porém poucos agentes estão disponíveis para o combate destas enfermidades. A identificação de agentes com ação antiviral é de suma importância devido ao frequente surgimento de micro-organismos resistentes a drogas. O desenvolvimento de terapias eficazes para doenças virais humanas é estritamente dependente da identificação de novos agentes terapêuticos, mostrando-se fundamental a busca de compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas (KAO et al., 2010; LOHNER; STAUDEGGER, 2001).

Anteriormente identificamos uma proteína com uma potente ação antiviral presente na hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua*. Experimentos com a proteína purificada (AVLO) levou a uma redução no título viral de 157 vezes (de $3.3 \pm 1.25 \times 10^7$ para $2.1 \pm 1.5 \times 10^5$ TCID50 mL⁻¹) na produção do vírus do sarampo, redução de 61 vezes (de $2.8 \pm 1,08 \times 10^9$ para

$4.58 \pm 1.42 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) na produção de um poliovírus (sabin 1) e de 64 vezes na replicação do vírus da influenza (H1N1) (GRECO et al., 2009).

Foi observado que a proteína não possui nenhuma ação neutralizante direta sobre o vírus e nem interfere na penetração viral. Pelos dados obtidos até o momento a ação antiviral desta proteína ocorre de forma intracelular ativando algum mecanismo interno de proteção inata. Temos observado também que a hemolinfa afeta a produção de alguns imunomoduladores como interferon, TNF (fator de necrose tumoral) e óxido nítrico que são agentes inespecíficos da proteção dos organismos. Acreditamos que a proteína antiviral extraída da hemolinfa de *Lonomia obliqua* em estudo, esteja ativando algum mecanismo da célula que iniba a replicação ou a montagem viral. A obtenção em maior escala desta proteína irá permitir estudos mais precisos dos mecanismos de ação, bem como estudos de estrutura/função (dados não publicados).

Um dos alvos do nosso grupo de pesquisa é a produção e otimização de uma proteína com ação antiviral (rAVLO) recombinante, obtida da lagarta *Lonomia obliqua*, pelo sistema de expressão célula Sf-9/baculovírus (AcMNPV-rAVLO). A produção em maior escala desta proteína tem grande potencial de aplicação, seja na área médica, ou na área biotecnológica.

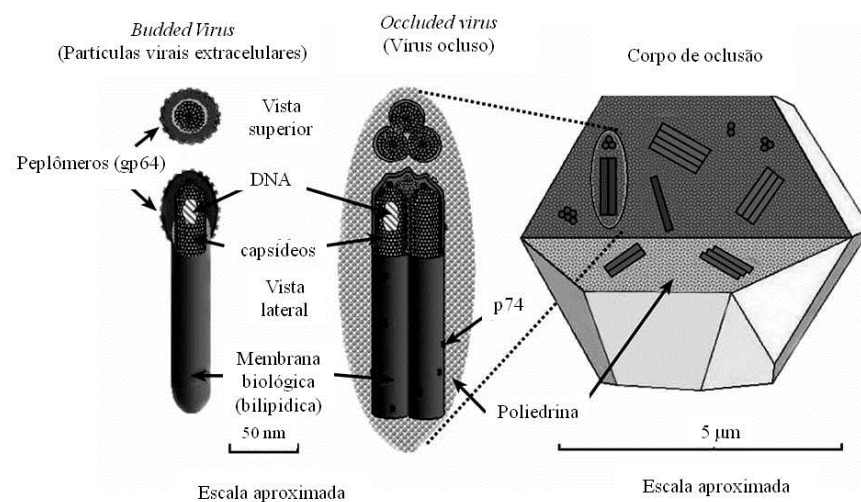
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Baculovírus selvagem e recombinante

Patogênicos para insetos, predominantemente para as ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera, os baculovírus apresentam morfologia de bastonete (do latim *baculum*). Os baculovírus são vírus envelopados, com o genoma formado por DNA circular dupla fita, com tamanho variando entre de 90 kb a 180 kb e capsídeo viral apresentando tamanho entre 30-60 nm de diâmetro e 250-300nm de comprimento (HERNIOU et al., 2003; JEHLE et al., 2006; OKANO et al., 2006).

Fenotipicamente distintos, mas geneticamente idênticos, os vírions podem apresentar-se sob duas formas em diferentes fases do ciclo de vida destes vírus. Desta forma, o mesmo genoma é responsável pela síntese de proteínas para a formação dos vírus extracelulares ou BVs (*Budded Virus*) e dos vírus oclusos ou ODVs (*Occlusion-Derived Virus*) (**Figura 1**). Os vírus BVs são liberados da célula na fase inicial de infecção, enquanto os vírus ODVs são liberados em fase tardia e são incorporados em uma matriz cristalina no núcleo para formar os corpos de oclusão, que são a estrutura montada para a proteção da partícula viral no ambiente (YANG; MILLER, 1998).

Figura 1 - Diagrama de virion.



FONTE: desenhado por Dr. D. Lynn, USDA, Agricultural Research Service, dos EUA. Adaptado de Hitchamn et al., 2009.

Com base na morfologia dos corpos de oclusão, a família Baculoviridae é dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Os NPVs

produzem corpos de oclusão formados por inúmeros vírions envoltos pelo núcleo de células infectadas, enquanto os GVs produzem corpos de oclusão pequenos e granulares contendo normalmente um único vírion (OKANO et al., 2006).

Com o sequenciamento de um grande número de genomas de baculovírus foram obtidas novas informações sobre a diversidade, sequência e conteúdo dos genes. Desta forma, Jehle et al (2006) propuseram uma nova classificação baseada nas características filogenéticas, dividindo então este táxon em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*.

O genoma dos baculovírus codifica cerca de 90-180 quadros de ORFs (“*Open reading frame*”, ou fase aberta de leitura), com a expressão de proteínas envolvidas na replicação do DNA, na transcrição do RNA, na formação da estrutura dos vírions, na atuação em funções auxiliares ou mesmo atuando em funções desconhecidas (JEHLE et al., 2006).

Além das sequências essenciais para a replicação viral, o genoma de alguns baculovírus também apresenta sequências para a síntese de proteínas auxiliares, que podem estar relacionadas a vantagens seletivas adquiridas por estes vírus. Genes que codificam proteínas como a quitinase e a catepsina são exemplos de genes auxiliares, e segundo Hawtin et al (1997) seriam os responsáveis pela liquefação de larvas infectadas. O gene da quitinase está presente em alguns baculovírus do grupo I dos NPVs, incluindo o vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Em contrapartida, os genes da quitinase e da catepsina não estão presentes no baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) (LIMA, 2008).

2.1.1 Importância econômica dos baculovírus

Os baculovírus são muito utilizados em processos biotecnológicos como o controle biológico de pragas, expressão de proteínas heterólogas, vetores no desenvolvimento de vacinas (PUSHKO et al., 2010; CHEN et al., 2010).

Na terapia gênica a utilização do baculovírus para a entrega de genes em células de mamíferos é realizada pelo sistema conhecido como BacMan. Neste sistema o baculovírus é geneticamente modificado para transmitir o transgene sob o comando de promotores gênicos de mamíferos. A facilidade na construção, os altos títulos virais, a facilidade no processo de purificação, a possibilidade de escalonamento, e a não patogênicidade e não toxicidade para o ser humano e animais (mamíferos) são vantagens para

a utilização deste sistema, que apresenta como fator negativo uma menor eficiência quando comparada a outros vetores virais para mamíferos, como os adenovírus (PAUL et al., 2011).

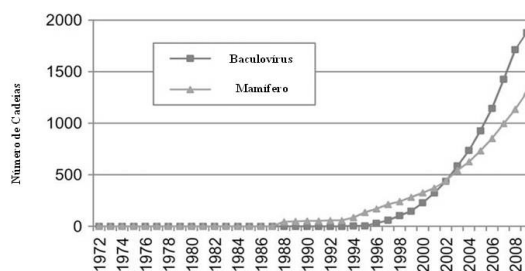
2.1.2 Expressão de proteínas heterólogas

A expressão de proteínas recombinantes foi favorecida com os recentes avanços na ciência. A insulina foi a primeira proteína terapêutica humana produzida através da tecnologia do DNA recombinante. Licenciada em 1982 e com uma estrutura relativamente simples, bactérias *Escherichia coli* foram utilizadas para a expressão desta proteína, permitindo a produção em larga escala, uma vez que estes organismos apresentam um crescimento mais rápido comparado a células animais. Devido a inviabilidade de expressão de proteínas mais complexas neste sistema, a expressão de proteínas em células animais tornou-se uma interessante alternativa (BUTLER, 2005).

Desde o início do cultivo das células animais na última década do século 19, muitas técnicas foram desenvolvidas, tornando o cultivo dessas células uma das áreas mais promissoras da biotecnologia (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007).

Um aumento progressivo no uso de células de mamíferos e de insetos para a produção de proteínas vem sendo observado (**Figura 2**). Porém, apesar dos grandes avanços na utilização de outros sistemas de expressão para proteínas recombinantes em hospedeiros como leveduras, células de inseto e de mamíferos, as bactérias *Escherichia coli* continuam sendo o principal hospedeiro escolhido para este fim. Com 88% das sequências depositadas no banco de dados de proteína PDB (*Protein Data Bank*) as bactérias encabeçam esta lista, seguidas pelos sistemas baculovírus/células de inseto (4%) e células de mamíferos, incluindo linhagens celulares estáveis e de expressão transitória (2,4%) (NETTLESHIP et al., 2010).

Figura 2 - Plot demonstrando o total de cadeias protéicas depositadas no PDB, cujo sistema de expressão empregado foi baculovírus ou células de mamíferos por ano de deposição.



FONTE: Nettleship et al., 2010.

A escolha de um sistema de expressão ideal é de fundamental importância para a expressão da proteína heteróloga, uma vez que, a funcionalidade, o rendimento, a purificação e os custos de produção envolvidos estão diretamente relacionados ao sistema escolhido. Essa seleção muitas vezes é realizada com base em fatores complexos, tais como o efeito desejado da proteína, as propriedades físico-químicas, as modificações pós-traducionais e assim por diante. Devido a esses fatores, nem sempre é fácil escolher um sistema de expressão adequado, pois cada sistema apresenta vantagens e desvantagens que devem ser analisados (**Tabela 2**) (CHA et al., 2005).

Tabela 2 - Comparação entre sistemas de expressão recombinantes.

	<i>E.coli</i>	Levedura	Inseto	Mamíferos
Taxa de crescimento	Muito rápido	Rápido	Lento	Lento
Rendimento de expressão (peso seco)	Alto (1-5%)	Alto (>1%)	Muito (30%)	alto (<1%) Muito baixo
Produtividade	Muito alto	Alto	Alto	Baixo
Custo do meio	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Técnicas de cultura	Muito fácil	Fácil	Difícil	Muito difícil
Custo de produção	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Enovelamento da proteína	Razoável	Bom	Muito bom	Muito bom
Glicosilação simples	Não	Sim	Sim	Sim
Glicosilação complexa	Não	Não	Sim ^a	Sim
Secreção	Pobre	Muito bom	Muito bom	Muito bom
Funcionalidade da proteína eucariótica expressa	Pobre	Bom	Muito bom	Muito bom
Viabilidade de sistemas genéticos	Muito bom	Bom	Razoável	Razoável
Problemas pirogênicos	Possível	Não	Não	Não

^a Padrões de glicosilação diferentes de células de mamíferos
 FONTE: Cha *et al.*, 2005.

2.1.3 Baculovírus como sistema de expressão

No início dos anos 80, de forma independente, pesquisadores norte-americanos relataram a aplicação dos baculovírus para expressão de sequências gênicas heterólogas. As proteínas β -interferon (SMITH; FRASER; SUMMERS, 1983), β -galactosidase (PENNOCK; SHOEMAKER; MILLER, 1984) e interleucina-2 (SMITH et al., 1985) foram as primeiras a serem expressas neste sistema com a utilização do vírus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV).

O baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), cujo genoma é composto de 134 kB e 154 ORFs (*Open Reading Frame*), é o

mais utilizado atualmente para expressão de proteínas recombinantes em linhagens de células de inseto. Esta aplicação foi favorecida por diversos estudos que possibilitaram a caracterização molecular e o sequenciamento deste vírus em 1994 (AYRES et al., 1994; BELJELARSKAYA, 2011).

Assim como os demais baculovírus, seu genoma apresenta sequências que codificam proteínas não essenciais à infecção viral e, portanto, podem ser deletadas. Devido a essa particularidade, estes vírus são utilizados para a expressão de proteínas heterólogas (SRIDHAR et al., 1994).

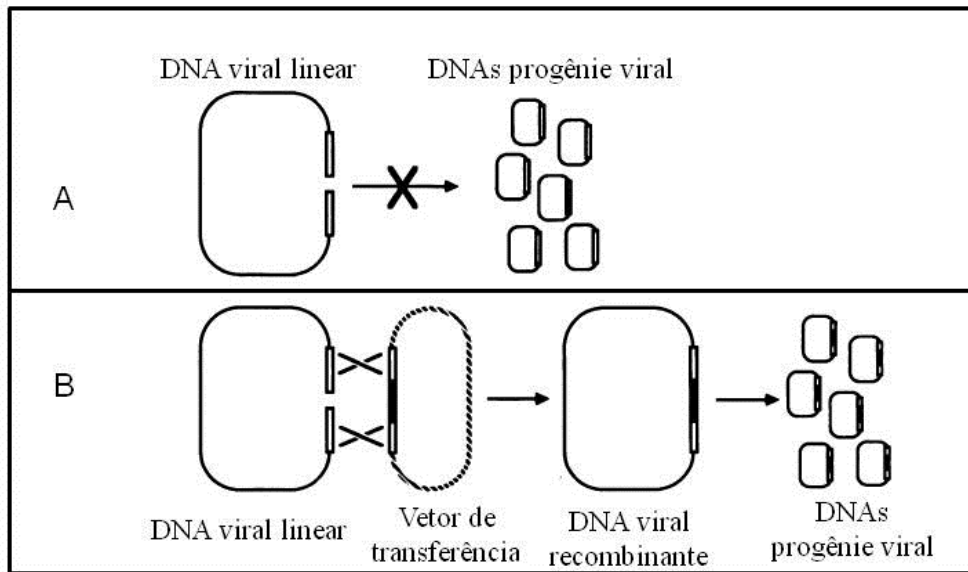
Um destes exemplos é o gene da poliedrina (p29), presente também em outros baculovírus, que por meio de engenharia genética é substituído por um gene heterólogo ficando sob o comando de um promotor forte, o promotor da poliedrina (P_{PH}), permitindo que as células infectadas com estes vírus recombinantes expressem a proteína *in vitro* em grandes quantidades (INCEOGLU et al., 2001). O gene p10, outro gene utilizado para esta finalidade, também é expresso em altas taxas nas fases tardias de infecção podendo ser utilizado para construção de vetores de expressão (YANG; MILLER, 1998).

Por apresentar tamanho em torno 90 kb a 180 kb e inúmeros sítios sensíveis a endonucleases, o genoma dos baculovírus não permite clonagens diretas em seu DNA. Desta forma, o desenvolvimento desta tecnologia foi baseado na construção de vetores de transferência (KITTS; AYRES; POSSEE, 1990).

Os experimentos iniciais para esta finalidade foram realizados com base em recombinação homóloga e seleção dos recombinantes por ensaio de placa. O DNA viral parental e um plasmídeo doador contendo o gene heterólogo a ser expresso eram co-transfectados em cultivos de células de inseto para a geração dos baculovírus recombinantes. Porém este sistema não foi eficaz por ser laborioso e apresentar taxas de recombinação muito baixas, com uma frequência de apenas 0,1% (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

Novas tecnologias foram então desenvolvidas para a solução desta problemática, entre elas a utilização de um baculovírus linearizado com um sítio único Bsu36I no *locus* da poliedrina co-transfectado com um plasmídeo de transferência em células de inseto (**Figura 3**) (KITTS; AYRES; POSSEE, 1990).

Figura 3 - Recombinação linear com vetor de transferência.



Legenda: (A) DNA linear não replicativo, pois a replicação do AcMNPV ocorre apenas com o DNA viral circular; (B) Circularidade restabelecida por recombinação com um vetor de transferência.
 FONTE: Adaptado de Kitts; Ayres; Possee, 1990.

O sistema desenvolvido por Kitts e Possee (1993), possibilitou a seleção de vírus AcMNPV recombinante através da expressão de um gene essencial do vírus. Como a replicação viral ocorre apenas quando o seu genoma encontra-se em formato circular, os cientistas desenvolveram um sistema onde o DNA viral encontra-se linearizado. Desta forma, incapaz de replicar-se, ele não é capaz de gerar a progênie viral. Como a expressão é restabelecida com a circularidade do genoma, são realizadas reações de recombinação entre vetor de transferência e DNA viral, para este restabelecimento. Esta metodologia aumenta a frequência de recombinação pela vantagem seletiva dos recombinantes em comparação aos vírus não recombinantes.

Estes sistemas descritos, no entanto, eram laboriosos e necessitavam de ensaios de placas para o isolamento viral. Para eliminar este procedimento, em 1993 Luckow et al desenvolveram um sistema de expressão baseado em transposição sítio-específica que eliminava esta etapa de isolamento.

Desde então, buscando-se a melhoria do sistema, outros estudos foram realizados, sendo que, Marek et al (2011) desenvolveram um sistema de expressão heteróloga baculovírus/célula de inseto para simplificar o processo de purificação de biofármacos produzidos neste sistema, uma vez que nesta estratégia a formação dos vírions é impedida. Este efeito é desejado uma vez que o baculovírus pode desencadear efeitos desconhecidos no sistema imunológico.

2.1.4 Vantagens e desafios do uso do sistema de expressão em baculovírus

A escolha da linhagem celular é de extrema importância e é o primeiro passo para o sucesso da expressão heteróloga. O sistema de expressão baculovírus/células de inseto, em especial, possui inúmeras vantagens em relação a outros sistemas (**Figura 4**) (ARANTES, 2007; MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007).

Figura 4 - Vantagens para a utilização do sistema BEVS.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Comparado ao sistema de expressão bacteriano, a expressão de proteínas heterólogas pelo sistema de baculovírus/célula de inseto apresenta inúmeras vantagens, principalmente em relação às modificações pós-traducionais. Além das modificações pós-traducionais, os baculovírus apresentam alta especificidade em infectar células de inseto, sendo incapazes de infectar células de plantas ou vertebrados. Além disso, são cultivos relativamente simples de manutenção por crescerem bem em meio livre de soro sem necessidade de CO₂ (VAN OERS, 2011).

O rendimento neste sistema também é considerado uma vantagem, uma vez que altos níveis de expressão de proteínas foram relatados. Isto se deve principalmente pela presença de promotores fortes em genes não essenciais que são expressos tardiamente no ciclo viral (como o promotor P_{PH} do gene da poliedrina e o promotor P_{p10} do gene p10). A aplicabilidade deste sistema também é mais vantajosa no que diz respeito a permissividade

para clonagem de grandes fragmentos de DNA, possibilitando a expressão de genes eucarióticos maiores. A eficiência na expressão de genes com éxons e íntrons, a possibilidade de expressão de dois ou mais genes sob o comando de diferentes promotores e a facilidade de manipulação do sistema também são características deste sistema (CASTRO et al., 1999). Desta forma, estes vírus são uma importante ferramenta para a expressão de proteínas recombinantes com aplicação em diversas áreas da biotecnologia e medicina.

Este sistema também permite a expressão de proteínas mais complexas como partículas virais semelhantes a vírus (VLPs) e complexos enzimáticos. A vacina Cervarix™ contra o câncer cervical, produzida pela empresa GlaxoSmithKline, foi a primeira vacina humana licenciada baseada em VLPs expressos em sistema baculovírus/célula de inseto (MAREK et al., 2011).

A aplicação deste sistema em escala laboratorial é relativamente simples, porém alguns problemas como a taxa de transferência de oxigênio, contaminação e purificação das proteínas expressas são relatados em cultivos em maior escala (CHA et al., 2005).

Para a solução dos problemas gerados pelas taxas de transferência de oxigênio em frascos com agitação que necessitam de processo de esterilização, foram desenvolvidas alternativas como a utilização de reatores descartáveis, como o sistema Wave™ (Wave Biotech). Estes reatores são sacos de plástico que ficam sobre uma plataforma oscilante, permitindo a homogeneização do cultivo e aumentando a transferência de oxigênio (WEBER et al., 2002).

Outros avanços nas tecnologias de cultivo celular e o desenvolvimento de novos reagentes, vetores de transferência e métodos de quantificação também estão possibilitaram o aumento de aumento de escala (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

O conhecimento e a manutenção de outros parâmetros também são de fundamental importância para que o sistema possibilite a obtenção de altos rendimentos na produção de proteínas heterólogas. O momento de infecção (TOI), a multiplicidade de infecção (MOI), a temperatura e a disponibilidade de nutrientes são exemplos de parâmetros que devem ser analisados (ZHANG et al., 1994).

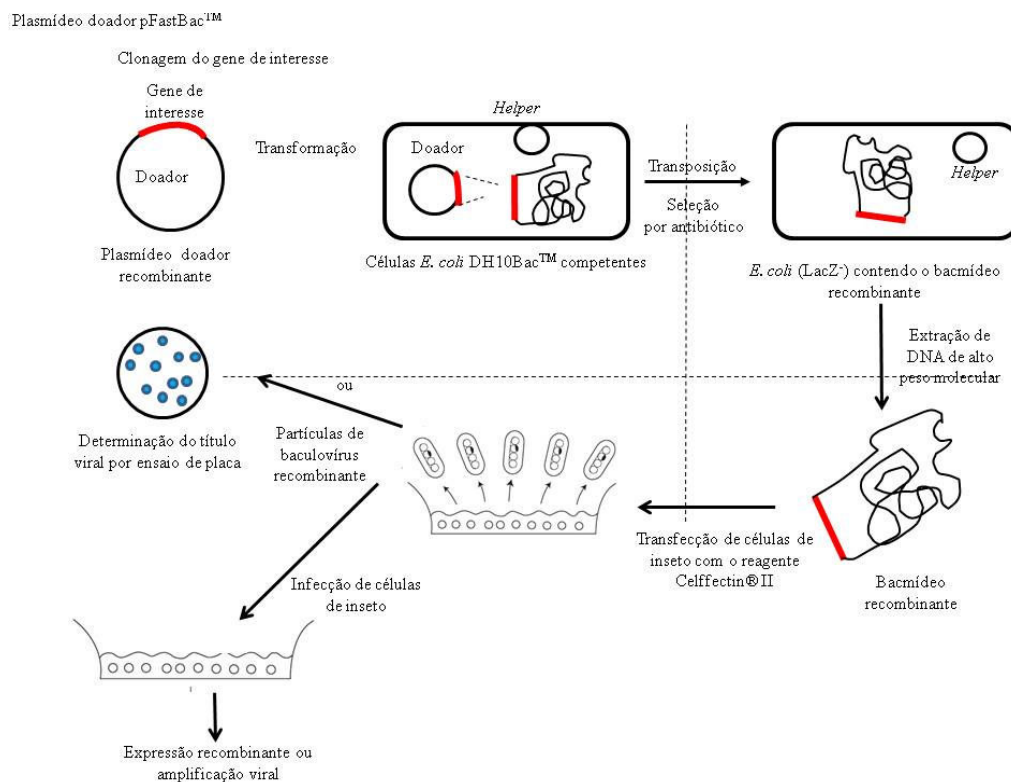
2.1.5 Sistema *Bac-to-Bac*

No mercado estão disponíveis diferentes sistemas que utilizam os baculovírus como vetores de expressão. Dentre eles podem ser citados o Bac to Bac® e o BaculoDirect™

Baculovirus (Invitrogen), o Sistema Bacvector[®] e BacMagic[™] (Novagen) e BacPAK Baculovirus Expression[™] (Clontech).

Neste estudo foi utilizado o sistema comercial de expressão em baculovírus *Bac-to-Bac*[®] (Invitrogen). Basicamente, este sistema é composto por dois componentes: um vetor doador e uma cepa bacteriana (**Figura 5**).

Figura 5 - Geração do bacmídeo recombinante conforme manual *Bac-to-Bac*[®].



FONTE: Figura adaptada do Manual *Bac-to-Bac*[®] (Invitrogen[™], 2004).

Como vetor doador, podem ser encontrados o pFastBac[™] 1, pFastBacBac[™] HT, com expressão heteróloga sob o comando do promotor da poliedrina e pFastBacBac[™] Dual, que permite a expressão de diferentes proteínas sob o comando dos promotores da poliedrina (P_{PH}) e p10 (P_{p10}).

O vetor pFastBac[™] 1, utilizado neste estudo, apresenta um sítio múltiplo de clonagem, onde o gene de interesse é inserido por clonagem sob o controle do promotor da poliedrina (P_{PH}). Este vetor também apresenta um sítio de replicação mini-F, um sítio de transposição Tn7, sinal SV40 polyA para a terminação de transcrição do bacmídeo de forma eficiente. Este vetor também apresenta sequências gênicas que codificam resistência à gentamicina e ampicilina. (INVITROGEN[™], 2009).

O segundo componente, a cepa bacteriana *E. coli* DH10 Bac™, é utilizado como hospedeiro para o plasmídeo doador. Esta cepa contém um bacmídeo, um baculovírus utilizado como vetor com capacidade de replicação em *E. coli* que permanece infeccioso quando introduzido em células de inseto. Estes vetores possuem um sítio alvo mini-*att* Tn7 e um plasmídeo *helper* com sequência codificante para transposase, uma enzima que auxilia no processo de transposição (LUCKOW et al., 1993).

Primeiramente é realizada uma transformação da cepa bacteriana *E. coli* DH10Bac™ com o vetor doador pFastBac™1 recombinante permitindo com que a transposição ocorra entre os sítios Tn7 do vetor e mini-*att* Tn7 do bacmídeo. A seleção dos clones é realizada em meio seletivo contendo os antibióticos apropriados, permitindo posterior isolamento viral. O bacmídeo recombinante, um DNA viral de alto peso molecular, pode ser recuperado por lise alcalina, para posterior transfecção nas células de inseto. (INVITROGEN™, 2009).

O sistema Bac to Bac® (Invitrogen) apresenta vantagens como o fato de não haver a necessidade de ensaio de placa para a seleção viral, porém a população viral pode ser policlonal (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

2.1.6 Linhagens celulares utilizadas no sistema de expressão em baculovírus

O cultivo de células animais é de fundamental importância para a indústria biofarmacêutica. A primeira proteína terapêutica recombinante produzida em células de mamíferos que obteve aprovação para comercialização foi o tPA (ativador de plasminogênio tecidual) pela empresa Genentech (S. San Francisco, CA, EUA) em 1986 (WURM, 2004).

As linhagens celulares de mamíferos são capazes de realizar modificações pós-traducionais e receber inúmeros plasmídeos. Porém, este sistema apresenta altos custos e necessita de meios ricos, o que torna mais difícil sua utilização em larga escala. Nas últimas décadas surgiu uma das alternativas para este problema, que foi a utilização de sistemas como o de células de inseto/baculovírus. Este sistema vem sendo amplamente utilizado principalmente porque as modificações pós-traducionais são semelhantes a aquelas encontradas em células de mamíferos (BATISTA et al., 2006).

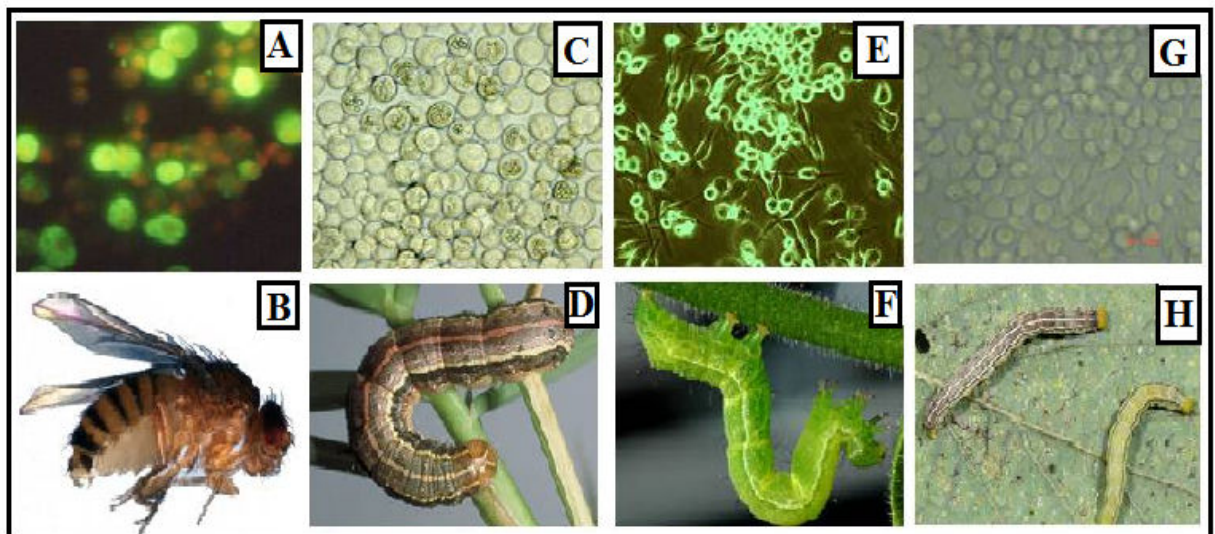
Devido à alta susceptibilidade natural a infecção por baculovírus, células de inseto são utilizadas no cenário biotecnológico em procedimentos de expressão heteróloga. As células de inseto apresentam outras vantagens no que diz respeito a sua utilização em cultivo celular quando comparadas às células de mamíferos como a facilidade no cultivo, alta

tolerância a osmolaridade e altos níveis de expressão quando infectadas por um baculovírus recombinante (BATISTA et al., 2006).

Esta tecnologia utiliza linhagens celulares de inseto, principalmente células epiteliais de ovário de lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho) (**Figura 6**). Estas linhagens amplamente utilizadas são comercialmente conhecidas como Sf-21, isolada primeiramente em 1977, e Sf-9 (derivada da linhagem Sf-21) em 1987 (SCHNEIDER; SEIFERT, 2010).

A linhagem comercialmente conhecida como HighFive™, originária de células de ovo de *Trichoplusia ni* (Tni) também pode ser utilizada neste sistema (BÖGLI et al., 2011), assim como as células de *Drosophila* comercialmente conhecidas como S2 (**Figura 6**) (LEE et al., 2000).

Figura 6 - Linhagens celulares que são utilizadas para expressão heteróloga em baculovírus e seus respectivos insetos de origem.



Legenda: (A) Células S2; (B) *Drosophila*; (C) Células Sf-9; (D) *Spodoptera frugiperda*; (E). Células High Five™; (F) *Trichoplusia ni* (Tni); (G) UFLAG; (H) *Anticarsia gemmatalis*.
 FONTE: (A) Zhang et al., 2007; (B) Mystery Rays, 2012; (C) University of Cambridge, 2012; (D) Drees, 2012; (E) Boyce Thompson Institute for Plant Research, 2012; (F) Fotonatura.org, 2012; (G) Carmo, A. C. V., 2012; (H) Viarural, agro e construção, 2012.

Apesar dos poucos relatos presentes na literatura, a utilização da linhagem celular UFLAG originária da lagarta *Anticarsia gemmatalis* para a expressão de proteínas heterólogas também deve ser mencionada, uma vez que, já que foi descrito o potencial destas células para expressão em grandes quantidades (CASTRO et al., 1999; GIORIA; BECCARÍA; CLAUS, 2006; MCCARTHY; ROMANOWSKI, 2008).

A linhagem Sf-9 é uma das mais utilizadas para a expressão heteróloga com baculovírus. Este fato é favorecido pela alta capacidade de secreção das proteínas expressas, rápido crescimento, substrato para cultivo com preços menores quando comparados aos utilizados em cultivos de células de mamíferos, modificações pós-traducionais e a não necessidade de incubação com CO₂ ou adição de soro fetal bovino (SFB), caso haja necessidade desta adição no meio utilizado (ARANTES, 2007; GRANADOS; LI; BLISSARD, 2007).

2.2 *Lonomia obliqua*

As lagartas da espécie *Lonomia obliqua* (**Figura 7**) (Lepidoptera: Saturniidae) possuem importância médica devido a presença de cerdas urticantes com toxina de efeitos hemorrágicos para o ser humano. Encontradas na América do Sul, estes animais são conhecidos no Brasil como “taturanas” (do tupi guarani “semelhante a fogo”) (WOLFF et al., 2002).

Figura 7 - Lagarta da espécie *Lonomia obliqua* (lagarta de fogo).



FONTE: Cedidas por Moraes, R. H. P. (comunicação pessoal).

As lagartas são conhecidas por seu hábito gregário (**Figura 8**) e pelo corpo revestido por cerdas (espículas) (**Figura 9**) urticantes que liberam toxinas com propriedades coagulantes e inflamatórias (MORAES, 1997; VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001).

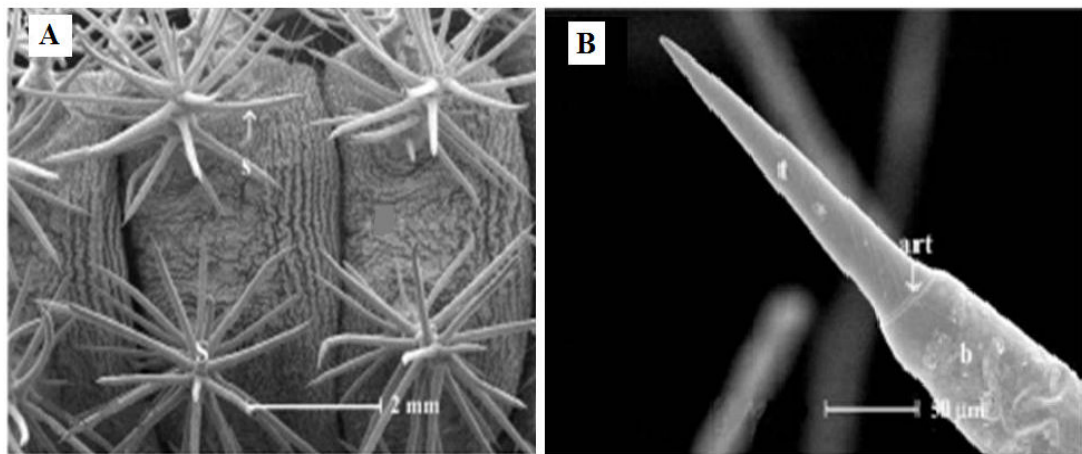
Figura 8 - Hábito gregário de lagartas *Lonomia obliqua*.



Lagartas *Lonomia obliqua* apresentam hábito gregário, ficando agrupadas durante o dia nos troncos de árvores.

FONTE: Cedidas por Moraes, R. H. P. (comunicação pessoal).

Figura 9 - Ultraestrutura do tegumento de *Lonomia obliqua*.



Legenda: (A) Região dorsal do tegumento com a presença das espículas; (B) Espícula íntegra.

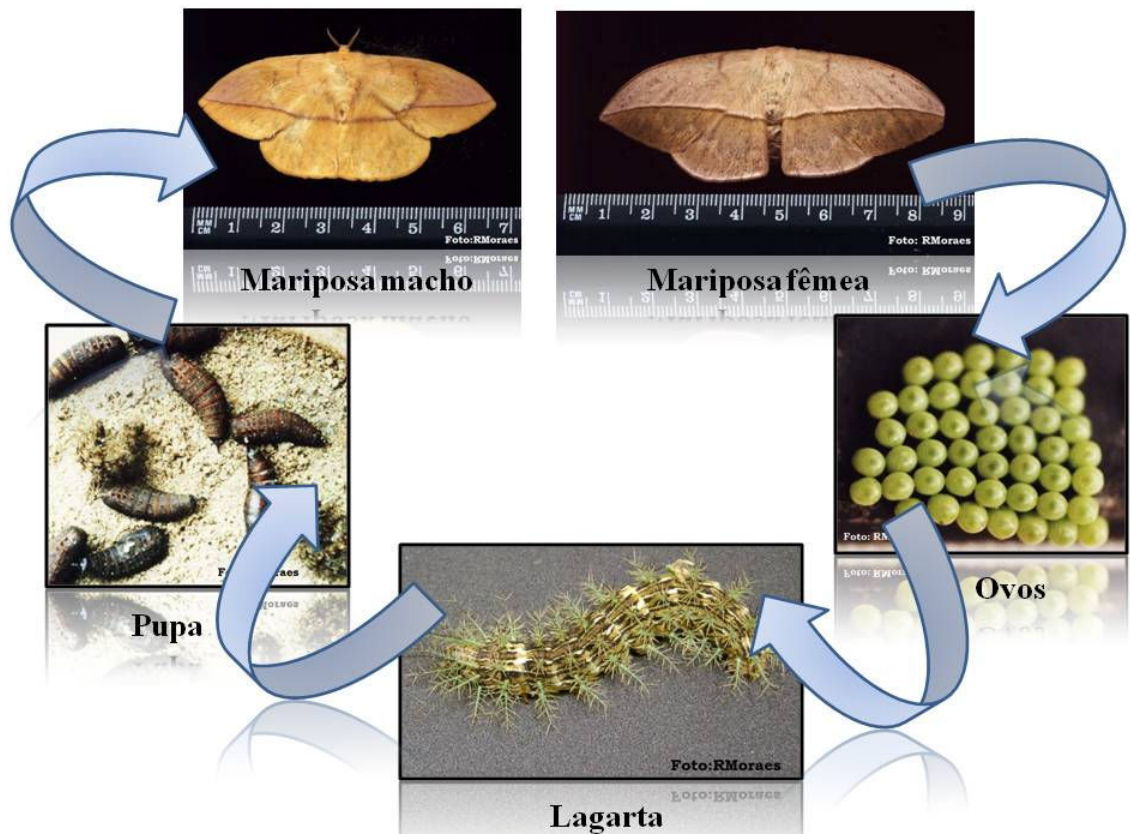
FONTE: Veiga; Blochtein; Guimarães, 2001).

Os acidentes com estas taturanas acontecem geralmente em árvores frutíferas perto de residências rurais (VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001; CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007). Comuns no Sul e Sudeste do Brasil, estes acidentes ocorrem quando há o contato do veneno com a pele humana, provocando uma intensa sensação de queimação, geralmente seguido por dor de cabeça e náusea. Como sintomas do acidente envolvendo estas lagartas também podemos citar falha renal, sangramento e dano cerebral, sendo que, em casos graves pode levar a morte (DUARTE et al.,

1990; CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007; WOLFF et al., 2002; LORINI; CORSEUIL, 2001).

O ciclo de vida da espécie *L. obliqua* tem duração variando entre quatro meses e meio oito meses e meio, divididos em seis instares. Após este período, estes insetos atingem a fase de pupa que pode variar entre 46 a 92 dias. Após a imersão das pupas, as mariposas reiniciam o ciclo. Apesar de apresentar dimorfismo sexual, ambos possuem uma listra transversal sobre as asas. A mariposa fêmea é maior e apresenta coloração pardo-rosado e a mariposa macho é menor e mais amarelada, com tonalidades mais vivas (**Figura 10**) (MORAES, 1997; LORINI, 1999, VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001).

Figura 10 - Ciclo de vida da *Lonomia obliqua*.



FONTE: Cedidas por Moraes, R. H. P. (comunicação pessoal).

2.2.1 Produtos biotecnológicos obtidos de insetos

Diversos estudos demonstraram a presença de produtos biotecnológicos obtidos a partir de insetos. Em 1980, Hultmark et al demonstraram a presença de substâncias bacteriológicas na hemolinfa em pupas imunizadas de *Hyalophora cecropia*.

Em 2001, Konno et al purificaram a partir do veneno da vespa *Anoplius samariensis* a anopolina, um pequeno peptídeo antimicrobiano que por seu tamanho, apresenta vantagens para a manipulação biotecnológica.

O peptídeo cicadina, isolado de cigarras secas, foi capaz de suprimir a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 e também demonstrou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Coprinus comatus* (WANG; NG, 2002).

A proteína holotricina 3, encontrada na hemolinfa das larvas do inseto *Holotrichia diomphalia*, apresenta propriedades antifúngicas (LEE et al., 1995). A mesma atividade biológica foi demonstrada pela proteína teneicina 3 isolada da espécie *Tenebrio molitor*, inseto utilizado na dieta de animais mantidos em cativeiro, sendo que esta proteína antifúngica já foi caracterizada em laboratório, porém com mecanismo de ação ainda desconhecido (LEE et al., 1996; LEE et al., 1999).

Horita e et al (2010) demonstraram a presença de inibidores de diversas serino proteases provenientes da hemolinfa do besouro rinoceronte, *Oryctes rhinoceros*.

O efeito antiapoptótico da hemolinfa obtido das espécies *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa armigera* também foi testado. A atividade antiapoptótica foi comprovada em células de inseto, sendo que os testes realizados com *S. exigua* apresentaram melhores resultados (ZHANG et al., 2011).

Apoliforina III (apoLp-III), abundante na hemolinfa de insetos, possui papel no transporte lipídico, sendo capaz de associar com as membranas de fungos e bactérias e estimular a resposta imune celular. Em 2011, Malik e Amir isolaram e purificaram a apoLp-III a partir da hemolinfa de gafanhotos do deserto *Schistocerca gregaria*.

2.2.2 Produtos de interesse biotecnológico presentes na *Lonomia obliqua*

A lagarta *Lonomia obliqua* apresenta diversas substâncias farmacologicamente ativas. Cultivos de células de inseto suplementados com hemolinfa de *Lonomia obliqua* tiveram sua longevidade aumentada (MARANGA et al., 2003).

Em 2005, Souza et al demonstraram a presença de fatores com atividade antiapoptótica nesta hemolinfa, capazes de evitar a apoptose induzida pela depleção de nutrientes ou por indutores químicos como Actinomicina D.

Em 2009, Greco et al relataram a atividade antiviral de uma proteína extraída da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. No mesmo ano, Mendonça et al demonstraram a existência de uma proteína purificada da hemolinfa desta mesma lagarta capaz de aumentar em torno de 59% a produção da glicoproteína do vírus da raiva, expressa em células de *Drosophila melanogaster* S2.

Em 2010, Vieira et al observaram que a mesma hemolinfa também era capaz de aumentar o nível de expressão das proteínas recombinantes VP6 e VP7 em células Sf-9.

A Lopap, (*L. obliqua prothrombin activator protease* ou proteína ativadora de protombina), é uma lipocalina que demonstrou capacidade de prolongamento do tempo de coagulação do sangue através da depleção do fibrinogênio (REIS et al., 2001). Esta proteína já foi produzida de forma recombinante (REIS et al., 2006), sendo que, patentes relacionadas já foram depositadas com indicação desfibrinante, uso em kits diagnósticos, citoproteção ou como agentes biotecnológicos.

A Losac (*L. obliqua Stuart-factor activator* ou ativador de fator X), obtida a partir do veneno da *L. obliqua*, induziu em cultivos de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) maior proliferação e inibição da apoptose. Esta proteína também é um fator pró-coagulante e biotecnologicamente pode ser aplicada para a redução de morte celular e por consequência, para o aumento da produtividade em cultivos (FLORES et al., 2006).

2.2.3 Antivirais

Bioprodutos produzidos por animais, plantas e bactérias capazes de induzir a angiogênese e a apoptose, inibir a síntese de proteínas celulares ou exibir atividade antiviral apresentam um potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Doenças como a trombose, o câncer e a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) são algumas das

doenças que poderão ter seus tratamentos favorecidos com o desenvolvimento destes novos fármacos (HEINEN; VEIGA, 2011).

O desenvolvimento de agentes antivirais, especialmente para as recentes cepas de vírus humanos (como SARS coronavírus e vírus da gripe H5N1 e H1N1) são de grande importância, uma vez que afetam centenas de milhões de pessoas no mundo. Em 2010, cerca de 40 compostos antivirais estavam em fase de teste (DELCROIX; RILEY, 2011).

Só nos Estados Unidos podem ser encontrados quatro agentes antivirais para influenza. O zanamivir e oseltamivir são agentes pertencentes à classe de inibidores da neuromidase e ativos contra os vírus influenza A e B. Já a amantadina e a rimantadina são medicamentos da classe conhecida como adamantanes, sendo eficazes apenas contra vírus influenza A, demonstrando a necessidade de desenvolvimentos de novos agentes virais (FIORE et al., 2011).

Apesar de terem um sistema imunológico simples e necessitarem de uma resposta imune adquirida, o organismo dos invertebrados é capaz de combater uma ampla variedade de parasitas e patógenos. O sistema destes organismos reconhece pequenos ou grandes invasores, fagocitando-os por hematócitos circulantes encapsulando-os respectivamente. A hemolinfa dos também contém uma variedade de proteínas antibacterianas, antifúngicas e antivirais (COTTER; WILSON, 2002).

Vários estudos têm demonstrado o efeito antiviral de produtos obtidos a partir de artrópodos. Isto se deve principalmente ao fato de que, os insetos, são encontrados habitando todos os ecossistemas do planeta, levando-se a acreditar que os mesmos tenham desenvolvido sistemas de proteção para sobreviver nestes locais, estimulando-se assim, as pesquisas de novos agentes terapêuticos (CHERNYSH et al., 2002).

Susceptíveis a infecções virais, os insetos apresentam mecanismos de resistência a estas infecções pouco conhecidos, o qual reconhece células infectadas e recruta células imunes. Alguns insetos podem apresentar fatores que inibem as respostas humoral e mediada por células imunes contra os ovos e larvas de vespa. A apoptose é uma alternativa que também funciona nestes organismos como mecanismo de defesa antiviral. Os bloqueios físicos como a cutícula e a matriz peritrófica, as cascatas de proteases que levam a coagulação e melanização e as respostas celulares como a fagocitose, encapsulamento e a produção de peptídeos antimicrobianos também fazem parte desta proteção (YAO et al., 2006).

Hiraki et al (1997) demonstraram a presença de uma molécula com atividade antiviral obtida das fezes de lagartas capaz de combater o HVJ (vírus Sendai), HSV (virus herpes simplex tipe-1), e HIV (vírus da imunodeficiência adquirida).

Chernysh et al (2002) purificaram uma proteína com 12,65 kDa da hemolinfa de *Calliphora vicina* que controla a infecção viral intracelular e inibe a replicação do vírus da influenza A e B, desencadeando respostas intracelulares quando adicionada antes da infecção do vírus de forma semelhante ao interferons de vertebrados.

Em 2004, Popham et al relataram redução significativa nos títulos do baculovírus HzSNPV (*Heliothis zea* nuclear polyhedrosis vírus) devido à ação de uma proteína antiviral presente na hemolinfa de larvas de *Heliothis virescens*. Neste mesmo ano foi encontrada atividade antiviral na hemolinfa da lagarta *H. virescens* contra sete vírus de DNA e RNA, incluindo HIV-1 que pode infectar humanos. A atividade antiviral foi atribuída a um pequeno peptídeo de peso molecular de 916 Da e apenas seis aminoácidos (OURTH, 2004).

O própolis, material resinoso produzido por abelhas, tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, imunomodulatória e antiproliferativa (HEINEN; e VEIGA, 2011). Cueto et al (2011) demonstraram a atividade antiviral de extrato de própolis contra o calicivírus felino (FCV), adenovírus canino 2 (CAV-2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Além dos insetos, também foi encontrada atividade antiviral de amplo espectro contra DNA encapsulados e não encapsulados e vírus RNA em extratos de tecidos de crustáceos, sendo que esta atividade provavelmente está relacionada a múltiplos inibidores contidos nos extratos (PAN et al., 2000). A atividade antiviral também foi descrita na hemolinfa de ostras (OLICARD et al., 2005).

Recentemente identificamos uma proteína (**AVLO**) de aproximadamente 20 kDa, purificada da hemolinfa de *L. Obliqua*, capaz de inibir a replicação de todos os vírus testados quando adicionado a culturas uma hora antes da infecção (GRECO et al., 2009). Foi observado neste trabalho que a hemolinfa não apresenta qualquer efeito virucida, sugerindo que ela possa atuar em diferentes estágios da replicação do vírus, semelhante ao alloferon, ou em fases tardias da infecção por vírus, como demonstrado por Popham et al (2004) com um peptídeo extraído de *H. Virescens*.

A sequência da proteína antiviral (20-LOH) citada no trabalho foi descrita por Veiga et al (2005). Neste presente estudo, um bacmídeo, contendo a sequência desta proteína com atividade antiviral, foi usado para a expressão dessa proteína em cultura de células Sf-9.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a expressão de uma proteína com ação antiviral (rAVLO) através do sistema baculovírus/células de inseto.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um bacmídeo para a expressão de uma proteína antiviral de *Lonomia obliqua*;
- Avaliar a expressão da proteína recombinante (rAVLO) produzida através do sistema de expressão células Sf-9/baculovírus;
- Avaliar a atividade da proteína antiviral recombinante;
- Caracterizar por bioinformática a proteína antiviral recombinante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular, meio de cultivo e cultivo celular

- a) **Células Sf-9** (ovário de *Spodoptera frugiperda*) foram cultivadas a 29° C em frascos T contendo 5 mL de meio SF-900 II (GIBCO) ou em frascos de cultivo do tipo Schott com volume de trabalho de 15 mL e agitação orbital (*shaker*) a 90 rpm. Cultivos também foram realizados em microplacas de 6, 12 ou 96 escavações;
- b) **Células VERO** (rim de macaco verde - *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas a 37° C em frascos T (25 cm²) com 5 mL de meio Leibovitz (L-15) suplementado com 5% de soro fetal bovino, ou em microplaca de 6 ou 96 escavações;
- c) **Células L929**. Células L929 (fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*) foram cultivadas a 37° C em frascos T (25 cm²) contendo 5 mL de meio Leibovitz (L-15) suplementado com 5% de soro fetal bovino ou em microplaca de 6 ou 96 escavações;
- d) **Células SIRC**. Células SIRC (córnea de coelho – *Oryctolagus cuniculus*) foram cultivadas a 37° C em frascos T (25 cm²) contendo 5 mL de meio MEM (Meio mínimo essencial) suplementado com 5% de soro fetal bovino ou em microplaca de 6 ou 96 escavações.

4.2 Vírus e infecção

4.2.1 Baculovírus e recombinantes

- a) **Baculovírus recombinante:** Como suporte para a produção da rAVLO (proteína recombinante antiviral), foi utilizado o baculovírus *Autografa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) expressando o gene da AVLO sob controle do promotor da poliedrina. O baculovírus recombinante AcMNPV-AVLO com a sequência nativa da AVLO foi montado com uma sequência codificadora para cauda de histidina (His)₆ na região C-terminal, gerado com a utilização do sistema comercial *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* (Invitrogen) como descrito abaixo, em 4.5.3;

- b) Baculovírus selvagem:** *Baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcMNPV) foi utilizado neste trabalho como modelo de infecção;
- c) Bacmídeo Vazio:** O bacmídeo sem transposição, extraído da cepa *E. coli* DH10 também foi utilizado neste estudo, sendo denominado Rec 5;
- d) Outros recombinantes:** Como controle negativo de resposta imune do baculovírus, foi utilizado um baculovírus contendo a sequência da proteína recombinante 8-LOH (VEIGA et al., 2005).

4.2.1.1 Infecção de células Sf-9 por baculovírus

Células Sf-9, em fase inicial ou exponencial de crescimento, foram infectadas com os baculovírus citados acima, com valores de multiplicidade de infecção 0,01; 0,1; 1 ou 10 MOI (Multiplicidade de infecção). Todos os cultivos foram mantidos a 29° C.

4.2.1.2 Definição de passagem viral ou passagem nos cultivos

Após 144 horas, quando os cultivos infectados apresentaram início da lise celular ocasionada pelo ciclo de infecção viral o sobrenadante dos cultivos foram coletados e armazenados em geladeira (4° C) e protegidos da luz. As partículas virais presentes neste sobrenadante foram utilizadas para a infecção de novas células. O processo de infecção de novos cultivos com o sobrenadante do cultivo anterior é denominado passagem.

Os bacmídeos extraídos da bactéria *E.coli* DH10Bac foram transfectados nas células de inseto com o reagente Cellfectin® (Invitrogen), conforme as indicações do fabricante. Este procedimento foi denominado de primeira passagem do vírus recombinante, sendo o sobrenadante deste primeiro cultivo chamado de passagem 1. Quando novas células de inseto foram infectadas com os bacmídeos de passagem 1, o sobrenadante deste cultivo foi denominado de passagem 2, e assim sucessivamente.

4.2.1.3 Titulação viral dos baculovírus

As diferentes cepas de baculovírus, selvagem ou recombinante, foram tituladas em microplacas de 96 escavações em células Sf-9. Para isso 100 µL de cada uma das amostras de baculovírus (em diluições seriadas de 2, 3, 5 ou 10) foram adicionadas sobre a camada celular e observadas diariamente para a visualização do efeito citopático. O título

viral foi calculado determinando-se a maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular (TCID₅₀), como descrito por Reed e Muench (1938). As placas foram então coradas com cristal de violeta (0,25%) e fotografadas.

4.2.2 Outros vírus

4.2.2.1 Vírus da Herpes, Picornavírus e Rubéola

Células VERO, em fase exponencial de crescimento foram infectadas com vírus da Herpes em multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 a 0,1. Células L929 foram infectadas com Picornavírus (EMC). Células SIRC foram infectadas com o vírus da Rubéola RK27/13.

4.2.2.2 Titulação viral dos vírus da Herpes, Picornavírus e Rubéola

Para determinar o título dos vírus a serem usados nos testes de proteção da proteína rAVLO, uma amostra do sobrenadante dos cultivos de células infectadas com cada uma das diferentes cepas virais foram obtidos e titulados como descrito acima, utilizando para isso uma microplaca de 96 escavações contendo a célula específica para cada vírus.

4.3 Hemolinfa

A hemolinfa foi obtida de lagartas de *Lonomia obliqua*, do 6º instar de desenvolvimento, estocadas a -20° C. A hemolinfa foi coletada do extravasamento obtido após a retirada dos scoli (cerdas), tomando-se o cuidado para não haver mistura desta hemolinfa com quaisquer outros fluidos da lagarta. A hemolinfa foi então centrifugada a 1.000G por 10 minutos, tratada a 60° C por 30 minutos e filtrada em membrana esterilizante de 0,22 µm. O material foi mantido a 4° C e utilizado como suplemento das culturas na concentração de 1% e testada quanto sua citotoxicidade e genotoxicidade em células VERO.

4.3.1 Efeito da hemolinfa na replicação viral

Para verificar o efeito antiviral da hemolinfa total e das diferentes construções recombinantes foram realizados testes em cultivos de células infectas com as diferentes cepas

virais. Para isso, hemolinfa total ou amostras dos cultivos de células Sf-9 infectados com os bacmídeos recombinantes (contendo a proteína rAVLO) foram adicionadas aos cultivos realizados em microplaca, 1 hora antes da infecção. Após este tempo, foi adicionado aos cultivos tratados, 100 μ L de diluições dos diferentes vírus em teste. Todos os cultivos infectados foram mantidos a 29° C sendo observado diariamente o aparecimento de efeito citopático.

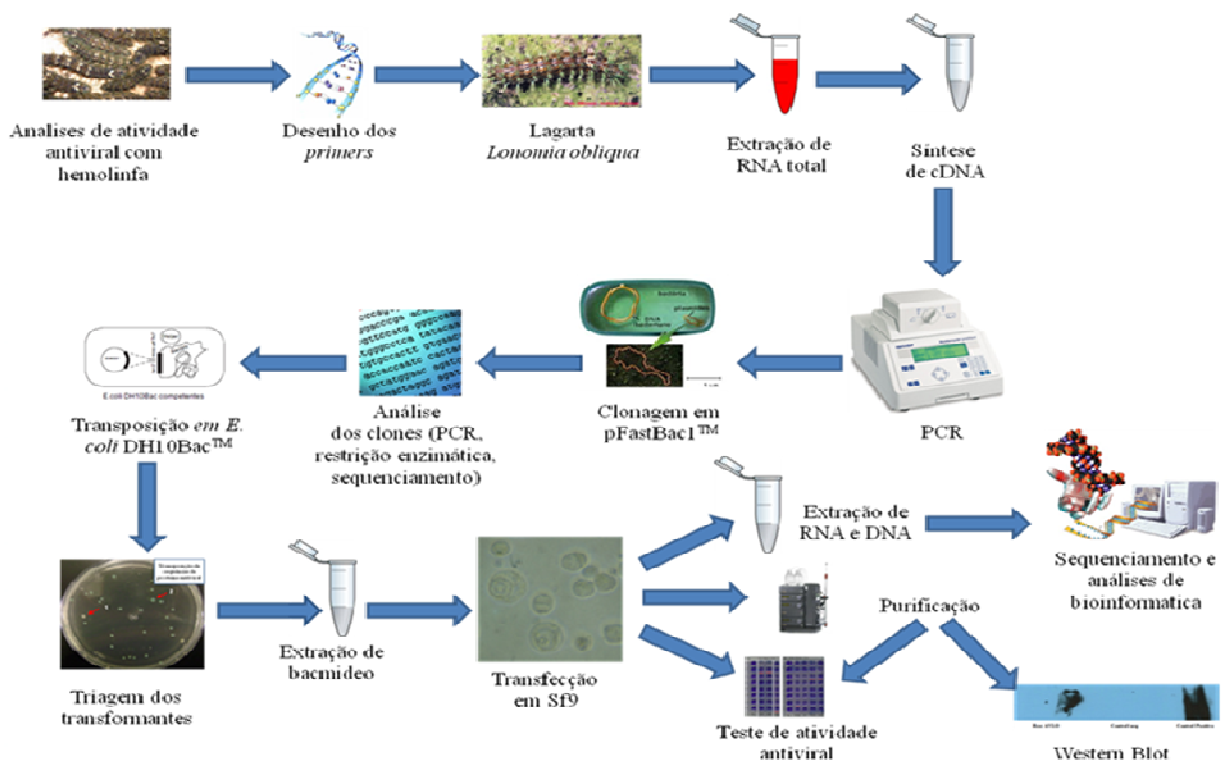
Após isso, a proteção celular pela hemolinfa ou dos recombinantes foi determinada visualizando-se qual a última escavação da microplaca que não apresentou efeito citopático pelo vírus em teste. As placas foram então coradas com cristal de violeta (0,25%) e fotografadas.

4.4 Geração do baculovírus recombinante e produção da proteína antiviral

4.4.1 Planejamento Experimental

A geração dos baculovírus recombinantes foi obtida de acordo com o esquema apresentado na Figura **Figura 11**:

Figura 11 - Planejamento experimental do desenvolvimento deste trabalho.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

4.4.1.1 Extração de RNA e geração de cDNA

A reação de extração do RNA total foi realizada com Trizol® (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Para isto, cerca de 50 mg de tecido de uma lagarta *Lonomia obliqua* no quinto ínstar, foi masserado em gelo com 1 mL de Trizol (Invitrogen). Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 12000 G por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 500 µL de isopropanol e incubado *overnight* a -80° C. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4° C em 12000 G com posterior retirada de sobrenadante. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% e nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4° C em 7500 G. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem do tubo, o *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de H₂O DEPC.

Para a geração do cDNA foi realizada reação de RT com o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme indicações do fabricante. Para isto, 5 µL de RNA total (1 µg) foi aquecido por 5 minutos a 70° C para evitar a formação de estruturas secundárias. Foram adicionados 500 ng de Oligo(dT)₁₈, 1 µL de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP and dTTP) e H₂O DEPC para volume final de 14 µl. Esta reação foi incubada por 5 minutos a 65° C e no gelo por 1 minuto com adição posterior de 4µl de 5X First-Strand Buffer, 1µl DTT (0,1M) e 1µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µL). Nova incubação foi realizada a 50° C por 60 minutos, com posterior inativação da reação a 70° C por 15 minutos.

4.4.1.2 Amplificação das sequências de interesse

Para a realização deste projeto foi escolhida uma proteína com atividade biológica antiviral (GRECO et al., 2009). O desenho dos *primers* para amplificação da sequência foi realizado de forma a permitir a amplificação da proteína com a presença de uma cauda de histidina e com a sequência TEV para facilitar a etapa de purificação das mesmas após a fase de expressão em projetos posteriores.

Para amplificação da sequência codificadora para a proteína antiviral foi realizada uma análise em SDS-PAGE da proteína isolada e purificada da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sendo determinado o peso molecular desta proteína. Com base nesta informação foi escolhida a sequência para a proteína antiviral de cDNA 20-

LOB/LOT/LOH/LOC-JN807330 de uma biblioteca de cDNA da *Lonomia obliqua* da Dra. Ana Beatriz Gorini Veiga, docente da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, (**Figura 12**) (VEIGA et al., 2005). Para fins didáticos esta proteína foi denominada rAVLO.

Figura 12 - Sequência de aminoácidos da proteína antiviral obtidos por degradação de Edman.

Band	Edman degradation result	Cluster match ¹	Tissue ²	Putative function
1-LOB	TKstQKiCvL	140	B	lectin
1-LOB	GKhpPKGQVA/DLPxLE	24/433	T	tropinin T/myosin
1-LOB	NTPILE/DTDdLE	184/35	T/B	unknown
1-LOB	DVPpLE/DKDaLE	260/222	T/B	chaperone
2-LOH	SVVEKKkNtnK	278	B	chaperone/endopeptidase
2-LOH	SAVGKKtvnRV	263	T	cytochrome P450
3-LOH	GKSXYKIXVASXYLKAXQ	-	-	-
4-LOH	SXIQND	-	-	-
5-LOH	TAXIEDN	-	-	-
6-LOH	TAPXQXKVL	-	-	-
7-LOB	SHqKLQhFLK	104	B	pheromone binding protein
7-LOB	DHDILpsCLR	364	T	ubiquitin-ligase
8-LOB/LOH/LOC	TETDLQRILRdgNDqFtaKM	42	T	serpin
8-LOH	FHYFGHEYDR TALGDAIdKA	247	T	serpin
9-LOB	TETIA QDy	371	T	laminin
9-LOB	VPVEKIPVIKSQ / aGVErsVII GDQ /	37/262	B	hemolin/en dopeptidase
10-LOT	NEDLLQ	338	B	unknown
11-LOB	VEgEAEDPsKNdeS / gGTEAaFGdwPwMVyI	12	B	trypsin
12-LOH	SENQVQNI VTDQNINLAKQV	-	-	-
13-LOH	SHAFxVNDVXXEQ	-	-	-
14-LOH	NVGFdVSIQEVpXA	-	-	-
15-LOB	APAPDaAc	469	T	unknown
16-LOB	TVIKDIAK / AVkEakAK	129/221	T	lectin/ribosomal protein
17-LOC	DVGQSVXXLXQ	-	-	-
18-LOH	DIEIPNdKREQLKqILTeQe	352	T	hemolymph glycoprotein
19-LOB/LOT/LOH/LOC	DVVIDGAePDMKA VSKFDMN	37/1	T/B	lipocalin
20-LOB/LOT/LOH/LOC	EENELIGSGHLIA TFPRLQK	375	T	transferrin
21-LOB	SEQYTNKYDNTNLDEILGND	22	B	chemosensory protein
21-LOT	SLYYSNepy	288	B	unknown
21-LOT	fVKY TsQyD/ALYcTiQgD	203/494	T	unknown
22-LOB/LOH	DENYTTENDXVDIEAVVKDP	-	-	-
23-LOH	DvNLTNLkAQAARQrAcL	333	B	protease inhibitor
24-LOT/LOC	MqIFVKILT	451/352	T/B	ubiquitin
25-LOB	SkSYErLEVtV Tel	433	T	myosin

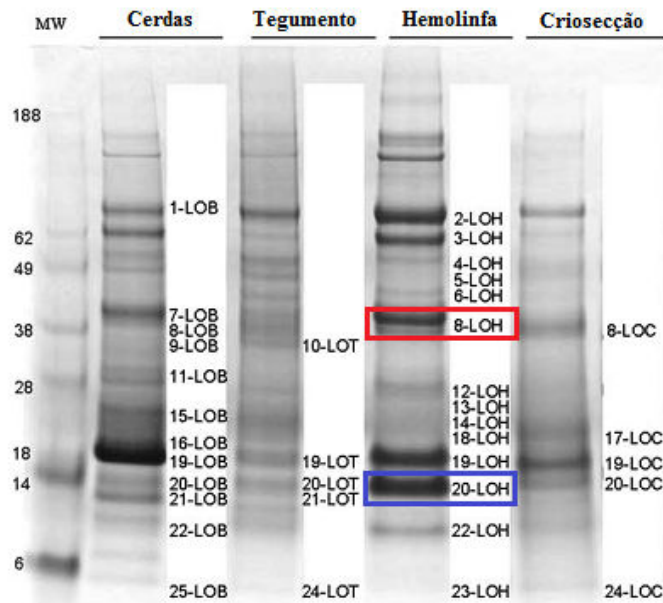
¹Clusters from cDNA library, see Table 1

²Tissue used in the cDNA library, T: tegument, B: bristle

FONTE: Veiga et al., 2005.

Devido a resposta imune desencadeada pelo baculovírus e pela presença da cauda de histidina em proteínas recombinantes reportados anteriormente (GRONOWSKI et al., 1999; MASEK et al., 2011), optamos pela construção de um recombinante de outra proteína nas mesmas condições que foram realizadas para a proteína antiviral. A proteína escolhida foi a proteína 8-LOH (**Figura 13**) (VEIGA et al., 2005).

Figura 13 - Análise SDS-PAGE de cerdas, extrato de tegumento, hemolinfa e criosecção de *Lonomia obliqua*.



Legenda: **(LOB)** cerdas; **(LOT)** tegumento; **(LOH)** hemolinfa; **(LOC)** criosecção.
(azul) proteína antiviral; **(vermelho)** proteína para controle.
 FONTE: Veiga et al., 2005.

Para garantir a amplificação da sequência do cDNA da proteína antiviral (também denominada Proteína 1, P1 ou AVLO) por reação da cadeia da polimerase (PCR), foram realizadas reações de amplificação com gradiente de temperatura, inicialmente variando entre 55° C a 65° C. As reações de PCR foram realizadas com 12,5 µL de Master Mix (Promega), 1 µL de *primer forward* e 1 µL de *primer reverse* (Tabela 3), 1 µL de cDNA (200 nanogramas), H₂O MilliQ autoclavada para volume final de 25 µL de reação.

O desenho dos *primers*, denominados P1 *forward* e P1 *reverse*, foi realizado com a inserção de sequências para a clonagem, com os sítios de clivagem para BamHI e HindIII, que estão presentes no vetor pFastBacTM1.

Também foram inseridos na região C terminal, dois sítios para as etapas posteriores de purificação. A primeira destas sequências codifica para cauda de histidina (6xHis tag) permitindo a purificação por coluna de níquel, uma vez que a histidina possui afinidade por este metal. A outra sequência adicionada codifica para o sítio de reconhecimento TEV (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly), que permite a remoção da cauda de histidina C-terminal, pela clivagem com uma TEV protease entre os aminoácidos glutamina (Gln) e glicina (Gly) (**Tabela 03**) (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1988; CARRINGTON et al., 1989).

Tabela 3 - *Primers* utilizados para a amplificação da sequência codificadora da proteína antiviral.

<i>Primer</i>	Sequência 5'3'	Aminoácidos
<i>Foward P1</i>	GAGGGATCCATGTTGAAGTTTATAATTC	E G S Met L K F I I
<i>Reverse P1</i>	GAGAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGGCCCTG AAAATACAGGTTTTCACTCAAATCGCATAACAG	L L C D L S <u>E N L</u> <u>Y F Q G H H H H H</u> H Stop K L L

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para confirmação do produto amplificado, com banda de 587pb para a proteína antiviral.

Para a amplificação da proteína 8-LOH (também denominada Proteína 5 ou P5) foram desenhados *primers*, denominados P5 *foward* e P5 *reverse* (**Tabela 4**) com a inserção de sequências para a clonagem, com os sítios de clivagem para BamHI e EcoRI, que estão presentes no vetor pFastBacTM1. Na região C-terminal também foram inseridos dois sítios para as etapas posteriores de purificação: cauda de histidina (6xHis tag) e sítio de reconhecimento TEV (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1988; CARRINGTON et al., 1989).

Tabela 4 - *Primers* utilizados para a amplificação da sequência codificadora da proteína 8-LOH.

<i>Primer</i>	Sequência 5'3'	Aminoácidos
<i>Foward P5</i>	GAGGGATCCATGTTCAAATTTATATTG	E G S Met F K F I L
<i>Reverse P5</i>	GAGGAATTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGCCC TGAAAATACAGGTTTTCAGATCCAATGAGCTCTTG	Q E L I G S E N L Y F Q G H H H H H H Stop E F L

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Foram realizadas reações de amplificação com gradiente de temperatura, inicialmente variando entre 55° C a 65° C, nas mesmas condições descritas para a proteína antiviral.

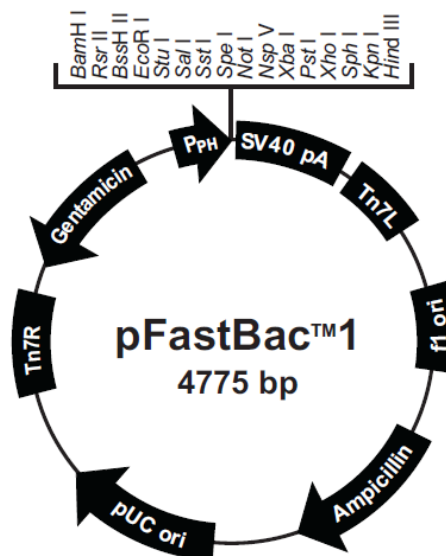
Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para confirmação do produto amplificado, com banda de 963pb.

4.5.1 Geração do vetor recombinante pFastBacTM1

4.5.1.1 Vetor pFASTBacTM1

O plasmídeo pFASTBacTM1 (Invitrogen) (**Figura 14**) foi utilizado no presente estudo. Este vetor não apresenta *tags* em sua constituição e se faz necessário a presença de um *start códon* (ATG) na sequência gênica a ser clonada para o início da tradução. Este fato é devido a presença no vetor de um códon de iniciação mutado ATG para ATT *upstream* ao sítio múltiplo de clonagem, uma vez que, geralmente é ineficiente para a expressão da proteína heteróloga.

Figura 14 - Mapa do vetor pFastBacTM1 (Invitrogen) com os sítios de clonagem.



FONTE: Manual *Bac-to-Bac*[®] (Invitrogen[™]).

O controle da expressão do gene de interesse neste vetor está controlado pelo promotor da poliedrina (P_H) do vírus *Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcMNPV) que permite altos níveis de expressão em células de inseto. O cassete de expressão é flanqueado por sítios Tn7 (L: *left* e R: *right*) que permitem a transposição sítio-específica do gene heterólogo no genoma de um baculovírus (bMON14272, 136 kb) (LUCKOW et al., 1993), apresentando também sequências codificadoras para resistência ao antibiótico gentamicina para seleção em *E. coli* DH10BacTM e um sinal de poliadenilação SV40, que permite o término da transcrição e a poliadenilação do mRNA (WESTWOOD; JONES; BISHOP, 1993).

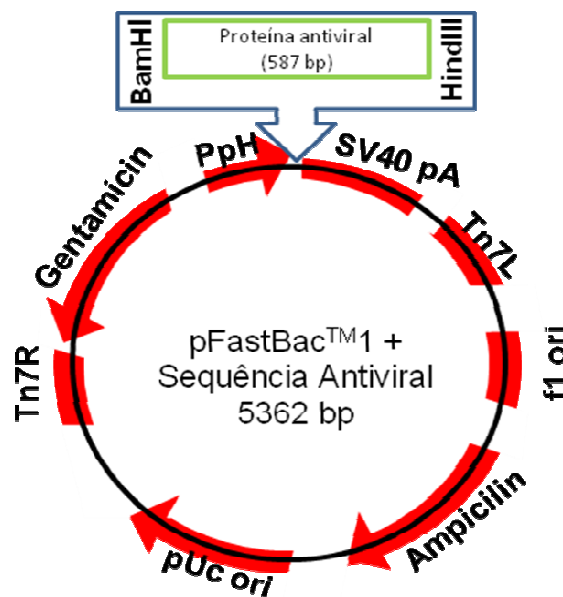
As sequências amplificadas nas condições descritas acima foram clonadas no plasmídeo doador pFastBacTM1 (Invitrogen), doador de sítios de transposição, com seleção dos clones pela resistência a ampicilina.

4.5.1.2 Ensaios de restrição enzimática

Para realizar clonagens da sequência do gene correspondente foi utilizado o vetor doador pFastBacTM1 (**Figura 14**). Para as reações de clonagem, tanto o vetor como ao DNA da sequência da proteína amplificada foram digeridos com as enzimas de restrição.

Para a clonagem da sequência das proteínas rAVLO com vetor pFastBacTM1, formando pFastBacTM1+ rAVLO (**Figura 15**) foram escolhidas as enzimas de restrição BamHI e HindIII (New England Biolabs – NEB).

Figura 15 - Construção de recombinante pFastBacTM1 + rAVLO.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Para estes ensaios, o plasmídeo pFastBacTM1 e o inserto foram inicialmente digeridos com a enzima HindIII. A reação foi realizada com 2 µL de tampão NEBII (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol) (New England Biolabs®Inc.), 5 U da referida enzima, 1,0 µg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 4 horas à 37° C.

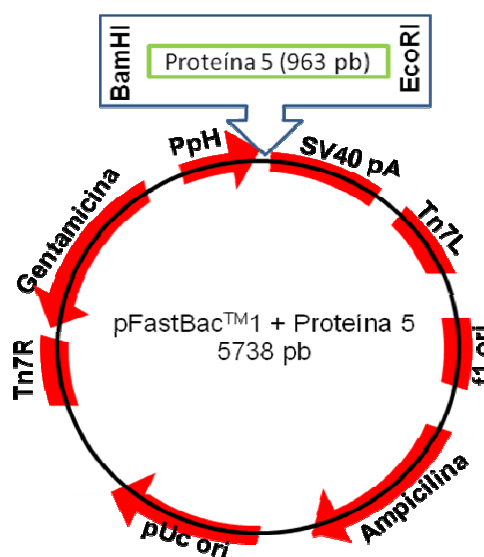
Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para confirmação da digestão enzimática. Os fragmentos de gel correspondentes aos fragmentos do vetor e do inserto digerido com HindIII foram purificados com o uso de kit GFX PCR and DNA Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme as indicações do fabricante.

Em seguida, foi realizada digestão com a enzima BamHI com conseqüente purificação pelo kit acima mencionado, com a reação de restrição consistindo de 2µl de tampão NEBIII (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol) (Biolabs®Inc.), 2 µL de BSA 10x, 5 U de enzima, 1,0 µg de DNA do inserto ou vetor e água *Milli-Q* para um volume final de 20µL. A reação foi incubada por 4 horas à 37° C.

Para as reações de restrição enzimática foram feitos controles positivos e negativos da reação (plasmídeo pFastBacTM1 na presença ou ausência de enzima). Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para confirmação das digestões enzimáticas do inserto e do vetor, sendo as bandas recortadas para posterior extração de DNA dos fragmentos. Para a purificação dos fragmentos foi usado o kit GFX PCR and DNA Gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as orientações do fabricante, e posterior quantificação dos respectivos DNAs em espectrofotômetro.

Para a clonagem da sequência correspondente a proteína 8-LOH, também chamada de proteína 5 (**Figura 16**), foram escolhidas as enzimas EcoRI e BamHI com digestão dupla, sendo a reação constituída por 5 µL de tampão EcoRI (NEB), 5 µL de BSA 10x, 5 U de cada enzima, 30 µL de inserto ou vetor. A reação foi incubada por 16 horas à 37° C.

Figura 16 - Construção de recombinante pFastBacTM1 + proteína 5.



4.5.1.3 Reação de ligação

Após a geração dos fragmentos de restrição dos insertos, bem como do vetor pFastBacTM1, foi realizada reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (1 U/ μ L) (Invitrogen, USA). Para esta reação foi utilizado 2,0 μ L de tampão T4 DNA Ligase (5x) (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG-8000) (Invitrogen, USA) e água *Milli-Q* para um volume final de 10 μ L. As razões molares inserto/vetor usadas foram de 1:1, 2:1 e 3:1, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{50,0 \text{ ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{RAZÃO MOLAR} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng do inserto}$$

As reações de ligação foram incubadas a 16° C por 16 horas. Foi realizada transformação em *E. coli* DH5 α quimicamente competente com cloreto de cálcio de 5,0 μ L de volume de reação de ligação em 50,0 μ L de bactéria, com incubação em gelo por 30 minutos e posterior choque térmico por 1 minuto a 42° C. Seguiu-se nova incubação no gelo por dois minutos e adição de 250,0 μ L meio S.O.C. (Invitrogen, USA) a temperatura ambiente com incubação por uma hora a 37° C, sob agitação de 200 rpm. A mistura foi plaqueada em meio seletivo LB-ágar (Luria Bertani) com o antibiótico ampicilina 100 μ g/mL. As placas foram mantidas em estufa a 37° C por 16 horas para o crescimento das colônias.

4.5.2 Análise dos transformantes

4.5.2.1 Triagem por PCR

Após a incubação, 10 colônias transformantes foram selecionadas para triagem inicial quanto à positividade dos clones. Cada um dos transformantes foi inoculado em 4,0 mL de meio LB (Serva) contendo antibiótico ampicilina (100 μ g/mL), seguido por incubação a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. Reações de PCR foram realizadas com 10,0 μ L de cada cultura sob as mesmas condições descritas para a amplificação da sequência da proteína. Para verificar a amplificação destes produtos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos recombinantes das culturas consideradas positivas pela análise dos resultados obtidos na reação de PCR foram extraídos dos cultivos utilizando o kit

miniprep High Pure Plasmid Isolation (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, os DNAs plasmidiais foram quantificados em espectrofotômetro.

4.5.2.2 Ensaio de restrição enzimática

Os clones positivos foram analisados quanto ao perfil de restrição enzimática. Para estas reações foram utilizadas as mesmas enzimas e condições utilizadas no processo de clonagem (BamHI/HindIII ou BamHI/EcoRI). Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para a análise dos fragmentos gerados.

4.5.2.3 Sequenciamento nucleotídico

Para a confirmação da clonagem do inserto no vetor de interesse, os clones triados por PCR e restrição enzimática foram submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico no Centro de Estudos do Genoma Humano, utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456, Applied Biosystems). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Foram utilizados primers *foward* e *reverse* (**Tabela 5**) que se anelam na sequência do vetor pFastBacTM1.

Tabela 5 - *Primers* utilizados no sequenciamento para a confirmação da clonagem do no plasmídeo doador pFastBacTM1.

<i>Primer</i>	Sequência 5'3'
Seq <i>Foward</i> pFastBac TM 1	AAATGATAACCATCTCGC
Seq. <i>Reverse</i> pFastBac TM 1	CAAGCAGTGATCAGATCCAGACAT

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

4.5.3 Geração do bacmídeo recombinante

Após a confirmação das construções em vetor de transferência pFastBacTM1, os clones recombinantes foram quimicamente transformados em *E. coli* cepa DH10BacTM. Esta cepa contém o genoma do baculovírus AcMNPV como vetor, (bacmídeo bMON14272), ou seja, o genoma destes vírus com uma origem de replicação bacteriana que permite a

replicação do mesmo em bactéria (LUCKOW et al., 1993). Este vetor contém um sítio mini-*attTn7* e um plasmídeo *helper*. Após a transformação, a transposição ocorre entre o elemento mini-TN7 do vetor pFastBacTM1 recombinante e mini-site *attTn7* alvo do bacmídeo para gerar um bacmídeo recombinante, que é então, utilizado para infectar as células e produzir as proteínas heterólogas desejadas.

Para a reação de transformação, foram adicionados 200 nanogramas de DNA plasmidial dos clones recombinantes previamente triados nas células DH10BacTM (Invitrogen) quimicamente competentes. Para controle da eficiência da transformação, 50 pg de DNA do plasmídeo pUC19 também foram transformados. Este é um dos plasmídeos mais utilizados em trabalhos com recombinantes e auxilia na avaliação dos resultados, uma vez que sua transformação pode ser considerada como controle positivo.

Estas reações foram incubadas no gelo por 30 minutos, com um posterior choque térmico por 2 minutos a 42° C. Após 2 minutos no gelo, foram adicionados 800µl do meio S.O.C. Esta reação foi incubada no shaker com agitação de 200 rpm e temperatura de 37° C por 4 horas (incubação de apenas 1 hora para pUC19). Após o período de incubação, as culturas foram plaqueadas em diferentes diluições em meio LB ágar contendo 50 µg/mL canamicina, 7 µg/mL gentamicina, 10 µg/mL tetraciclina, 100 µg/mL X-gal, and 40 µg/mL IPTG (a cultura com pUC19 foi plaqueada em meio LB ágar 100µg/mL de ampicilina).

As placas foram incubadas 48 horas para verificação dos fenótipos das colônias transformantes. Inserções no mini-Tn7 no sítio de ligação mini-*attTn7* do bacmídeo impede a expressão do peptídeo LacZα, então as colônias contendo o bacmídeo recombinante são brancas em um *background* de colônias azuis que permanecem com o bacmídeo inalterado.

4.5.3.1 Análise e isolamento do bacmídeo recombinante

Após 48 horas de incubação, colônias grandes, brancas e isoladas foram inoculadas em 2 mL de meio líquido LB contendo 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina e 10 µg/mL de tetraciclina. As culturas foram incubadas a 37° C *overnight*, sob agitação de 250 rpm.

Após 16 horas de incubação, 5µL de cada cultura foram analisados por PCR utilizando *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* (**Tabela 6**). As reações foram realizadas com desnaturação inicial a 93 °C por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 5 minutos, com extensão final de 7 minutos a 72 °C. Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para verificar os produtos amplificados.

Tabela 6 - *Primers* utilizados para a confirmação da transposição.

<i>Primer</i>	Sequência 5'3'
M13 <i>forward</i>	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13 <i>reverse</i>	AGCGGATAACAATTTACACAAGG

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Após a confirmação dos bacmídeos recombinantes, os mesmos foram isolados. Para isto, cerca de 2 mL das culturas consideradas positivas foram centrifugadas a 14000 G por 1 minuto. Após remoção do sobrenadante, cada *pellet* foi ressuspenso com 0,3 mL de solução I (15 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A). Foram adicionados posteriormente 0,3 mL da solução II (0.2 N NaOH, 1% SDS) e após homogeneização a reação foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. 0,3 mL de solução III 3M (acetato de potássio, pH 5.5) foram acrescentados com leve homogeneização durante a adição. As amostras foram incubadas por 10 minutos no gelo com posterior centrifugação a 10000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubos contendo 0,8 mL de isopropanol. A reação foi homogeneizada por inversão dos tubos e mantida em gelo por 10 minutos.

As amostras foram centrifugadas 15 minutos a 14000 G a temperatura ambiente. Após a retirada do sobrenadante, foram realizadas duas lavagens com 0,5 mL de etanol 70% em cada vez, com inversão dos tubos por diversas vezes para a lavagem dos *pellets* e centrifugação por 5 minutos a 14000 G e retirada do sobrenadante.

Para a total evaporação do etanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e os *pellets* foram ressuspenso em 20 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

As cepas contendo os bacmídeos recombinantes selecionados foram armazenadas em glicerol 15% a -80 °C e os bacmídeos eluídos foram armazenados em geladeira até o momento da transfecção em células de inseto.

Foi realizada nova reação de PCR com os *primers* M13 para confirmação da transposição, conforme descrito anteriormente.

Para a confirmação da sequência nucleotídica da proteína recombinante uma amostra do cultivo infectado de segunda passagem (144 horas) foi coletada. Após a extração de DNA e de RNA foram realizadas reações de PCR e RT-PCR respectivamente conforme indicado no item anterior.

As amostras de DNA resultantes das PCRs foram submetidas a reação de sequenciamento nucleotídico no Centro de Estudos do Genoma Humano, utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456, Applied Biosystems). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Foram utilizados *primers* M13 para a confirmação da transposição e da sequência da proteína rAVLO e 8-LOH.

4.5.3.2 Transfecção em célula de inseto com o baculovírus recombinante antiviral AcMNPV-AVLO e AcMNPV-8-LOH

As transfecções dos bacmídeos recombinantes eluídos em cultivos de células de inseto foram realizadas segundo as orientações do manual *Bac-to-Bac*® Baculovirus Expression System (Invitrogen).

Para a transfecção foi utilizado o reagente Cellfectin® (Invitrogen), capaz de formar lipossomas com o DNA, tornando possível a passagem pela membrana celular, uma vez que a mesma apresenta caráter lipídico como o reagente utilizado neste procedimento.

Células Sf-9 em fase *log* de crescimento cultivadas em microplaca de 6 escavações ($1,5-2,5 \times 10^6$ células por mL, viabilidade maior que 95%) foram utilizadas para o experimento, onde 500 nanogramas de baculovírus recombinante foram transfectados.

As células foram observadas diariamente até 144 horas pós-infecção para a visualização dos sinais de infecção viral. Após este período, o sobrenadante foi coletado e considerado como primeira passagem do baculovírus recombinante AcMNPV-AVLO ou AcMNPV-8-LOH. Este material foi centrifugado e o sobrenadante estocado a 6°C, para a geração do nosso estoque de vírus inicial.

O vírus obtido foi passado sequencialmente por 4 vezes (quatro passagens) em cultivo de células Sf-9. O sobrenadante de todos os cultivos da proteína recombinante antiviral foram coletados diariamente para determinação do número de células, titulação do baculovírus, consumo de nutrientes, identificação da proteína recombinante rAVLO por Western Blot, estudos de morfologia celular com fotomicrografia e cromatografia em de cada etapa.

O sobrenadante dos cultivos infectados com AcMNPV-8-LOH também foram coletados e utilizados nos testes de atividade antiviral.

4.5.3.3 Confirmação da presença do recombinante nos cultivos transfectados

Para confirmação da presença do vírus recombinante nos cultivos transfectados, amostras das culturas de segunda passagem foram obtidas no dia 7 e dia 12. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* celular coletado. Cerca de 1 mL de cultivo foi utilizado como amostra para a extração de DNA pelo kit *Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit* (Ge Healthcare), conforme as indicações do fabricante. Este DNA foi utilizado como molde para a realização de PCR com os *primers* utilizados na amplificação da sequência da proteína rAVLO e 8-LOH para a confirmação das sequências gênicas.

Também foi realizada extração de RNA com Trizol® (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante, conforme descrito anteriormente. Foi realizada reação de RT-PCR com *primers* para a amplificação das proteínas.

Para este estudo, várias transfecções foram realizadas, sendo selecionadas 3 (rAVLO) delas, as quais foram denominadas recombinante rec 10, rec 16 e rec 23.

4.5.4 Confirmação da sequência da proteína recombinante

Para a confirmação da sequência nucleotídica da proteína recombinante uma amostra do cultivo infectado de segunda passagem com 144 horas foi coletado. Após a extração de DNA e de RNA foram realizadas reações de PCR e RT-PCR respectivamente conforme indicado no item anterior.

As amostras de DNA resultantes das PCRs foram submetidas a reação de sequenciamento nucleotídico no Centro de Estudos do Genoma Humano, utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456, Applied Biosystems). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Foram utilizados nas reações de sequenciamentos os *primers forward* e *reverse* descritos na **Tabela 5** e **Tabela 6**.

4.5.5 Identificação da proteína recombinante por anticorpo anti-histidina

Com o objetivo de identificar e caracterizar a proteína recombinante, uma amostra do cultivo infectado foi purificada em um cromatógrafo AKTA purifier, utilizando uma coluna de troca iônica ResourceQ. Esta amostra foi aplicada a dois géis de eletroforese SDS-PAGE, sob condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) conforme metodologia descrita em 1970 por Laemmli. Um destes géis foi corado com Comassie Blue para verificar a presença da proteína expressa, e o outro gel foi submetido a um processo de transferência das amostras para membrana de nitrocelulose e análise por Western Blot.

Para isso, as amostras foram diluídas em 10 μ L de uma solução com mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 2%, e glicerol 10% com posterior aquecimento das mesmas por 5 minutos a 100°C. Para a realização do SDS-PAGE foram preparados dois géis de corrida de poliacrilamida a 15% (5,0 mL de solução de poliacrilamida: acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M (pH 8,8), 0,1 mL de SDS (Sigma) 10%, 0,1 mL de persulfato de amônio (Serva) 10%, 0,004 mL de Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Merk) e 2,3 mL de água destilada).

Os géis de empacotamento foram preparados a uma concentração de 4% (1,0 mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 0,75 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8), 0,06 mL de SDS (Sigma) 10%, 0,06 mL de persulfato de amônio (Serva) 10%, 0,006 mL de TEMED (Merck), e 4,1 mL de água destilada) com 0,75 mm de espessura montados em cuba vertical de eletroforese modelo Mini-protean (Bio-Rad). Foram aplicados 12 μ L de amostra, com a corrida sob voltagem de 100 Volts à temperatura ambiente, por aproximadamente 120 minutos com tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM).

Após a corrida, um dos géis foi corado com Plus One Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare). Para a solução de coloração foi utilizado inicialmente uma pastilha de Coomassie Blue, 80 mL de água destilada, 120 mL de metanol, com adição após filtração de uma parte desta solução foi a nove partes de metanol: ácido acético: água destilada (3:1:6).

Para descorar o gel, foi utilizada uma solução descorante (metanol 100 mL, ácido acético glacial 70 mL, 1000 mL de água destilada q.s.p).

Após a corrida do gel, um deles foi eletricamente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Millipore). A marcação da proteína recombinante foi realizada

com um anticorpo anti-histidina (GE Healthcare). As bandas foram reveladas após incubação da membrana com anticorpo anti IgG (camundongo) conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*) (GE Healthcare).

4.5.5.1 Microscopia eletrônica

O sobrenadante de um cultivo celular de segunda passagem foi processado pela técnica de contrastação negativa (preparo rápido) para a visualização do vírus por microscopia eletrônica. Para isto foi seguida a metodologia descrita por Brenner e Horne (1959) e Hayat e Miller (1990). Para isto, as amostras foram suspensas em tampão apropriado (fosfato 0,1M; pH 7,0) com posterior contato a grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e estabilizadas com carbono. Foi realizada drenagem das telas com papel de filtro com posterior contraste negativo com molibdato de amônio (2%; pH 5,0). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, sob tensão de 80 kV.

4.6 Procedimentos analíticos

Amostras de cultivos de todas as passagens foram coletadas para a determinação do número de células, título viral, teste de atividade antiviral, dosagem protéica, detecção e purificação da proteína.

4.6.1 Purificação da proteína recombinante

Para a determinação do perfil cromatográfico do sobrenadante dos cultivos infectados com o baculovírus expressando rAVLO e identificar a fração contendo a proteína recombinante, amostras dos cultivos infectados foram aplicados a colunas de gel filtração ou troca iônica em um cromatógrafo de alta eficiência Akta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech). Este aparelho é formado por duas bombas, um leitor de luz ultravioleta, programador – software Unicorn 4.0 e coletor de frações Frac 900 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplado.

Foram também realizadas cromatografias como controles com meio de cultura, com sobrenadante de cultivos infectados com baculovírus sem proteína recombinante.

4.6.2 Dosagem protéica de amostra da proteína recombinante

A concentração de proteína de cada fração foi determinada por um kit (BCA protein assay Kit – Pierce).

Foi realizada diluição seriada com volume inicial de 25 μ L (amostra ou controle). O mesmo volume de solução de BCA foi adicionado às amostras que foram incubadas 37°C por 30 minutos. A leitura da reação foi realizada a 570 nm e o resultado obtido comparado com os dados obtidos em uma curva padrão de BSA.

4.6.3 Concentração e viabilidade celular

A concentração celular foi determinada usando um hematocítômetro e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por azul de tripan.

4.6.4 Determinação de aminoácidos

As concentrações de aminoácidos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a análise dos aminoácidos foi usada uma coluna de fase reversa Pico-Tag® (Waters, USA) de 3,9 x 300 mm, detecção por UV, $\lambda = 254$ nm como fase estacionária (BIDLINGMEYER; COHEN; TARVIN, 1985).

Para o eluente, foram utilizadas duas fases móveis: A (acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água ultrapura e acetonitrila) e B (água e acetonitrila). Os experimentos foram realizados no cromatógrafo sob as seguintes condições: 36 °C, tempo de corrida de 45 minutos, gradiente com vazão pré-determinada e determinação dos picos no comprimento de onda 254 nm.

4.7 Procedimentos para análise da atividade antiviral

4.7.1 Teste de atividade antiviral do sobrenadante de cultivo infectado com a proteína recombinante

Para comprovar que o efeito antiviral observado fosse decorrente da proteína recombinante em questão e não por outro agente foram realizados testes em cultivos de células. Para este estudo, células L929 foram tratadas previamente com 1% v/v de hemolinfa

total, com sobrenadante de um cultivo de células infectadas com o baculovírus recombinante AcMNPV-AVLO, com a proteína rAVLO purificada e com a proteína recombinante 8-LOH. Uma hora após o tratamento, as células foram infectadas com vírus EMC (Encephalomyocarditis vírus, família *Picornaviridae*). Os cultivos foram observados por 72 horas sendo determinado o efeito citopático.

4.7.2 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral.

Para comprovar a atividade antiviral da proteína recombinante e determinar a quantidade máxima de vírus EMC que a hemolinfa total e de duas construções de recombinante antiviral conseguem bloquear foram realizados testes em células L929.

As células L929 crescidas em microplacas de 96 escavações foram tratadas previamente (1 hora) com 1% v/v de hemolinfa total, ou construções de recombinantes (rec 10 e rec 16).

Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas de vírus da encefalomiocardite (razão 10). Após 72 horas foi determinada a maior diluição da proteína capaz de inibir a replicação viral. Como a primeira diluição foi de 1:10, consideramos a última diluição do controle onde houve efeito citopático como tendo 10^5 DICT₅₀/0.1 mL de vírus.

4.7.3 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela proteína recombinante antiviral total do sobrenadante e da proteína recombinante purificada

Para a determinação da quantidade máxima de vírus EMC que pode ser neutralizada pela proteína recombinante antiviral total e purificada, o sobrenadante de cultivos de células Sf-9 infectados com as diferentes construções (rec 10, rec 16 e rec 23) foram aplicados a uma coluna de cromatografia de troca iônica, conforme descrito anteriormente. As frações obtidas nestas cromatografias foram denominadas Fr2 e Fr8, tiveram sua atividade antiviral testada frente o vírus EMC, de acordo com o protocolo citado acima.

4.7.4 Ação da proteína recombinante antiviral sobre o vírus da Herpes e da Rubéola.

O mesmo procedimento para o teste de atividade antiviral utilizado para o vírus EMC foi realizado com o vírus da Herpes e do vírus da Rubéola.

O vírus da Herpes foi propagado em células VERO (células de mamífero *Cercophitecus aethiops*) e o vírus da Rubéola foi propagado em células SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea cells*). Ambas as células foram pré-tratadas com 5% da proteína recombinante.

4.7.5 Efeito do baculovírus sobre a replicação do vírus EMC

Para eliminar a possibilidade de que o efeito observado com nosso recombinante fosse derivado do baculovírus ou da cauda de histidina, foi construído um recombinante expressando a proteína 8-LOH (VEIGA et al., 2005) usando o mesmo protocolo utilizado na expressão da proteína recombinante com atividade antiviral. Estes dois recombinantes, e um bacmídeo vazio (sem proteína recombinante) foram utilizados para tratar células Sf-9 infectadas com picornavírus EMC.

4.7.6 Determinação do tamanho e granulosidade das células infectadas com o recombinante antiviral por Citometria de fluxo

Para estudar o perfil de tamanho e granulosidade das células, amostras de células de cultivo controle, infectado com um baculovírus vazio ou com os baculovírus recombinantes AcMNPV-AVLO, foram aplicadas a um citometro de fluxo.

Células em fase exponencial foram coletadas e centrifugadas a 800 G por 5 minutos. As células foram incubadas com 1 mL de tampão de lise Vindelev (1 mg/mL citrato, 50 µg/mL de iodeto de propídio, 1 mL de NP-40 (0.1%), 700 U/mL RNase, 0,01 M NaCl). Após 10 minutos de incubação foi realizada centrifugação a 10000 G por 5 minutos, com ressuspensão das células em 1 mL de tampão de FACS.

As amostras foram aplicadas a um citômetro de fluxo (FACs - FACSort Becton Dickinson -Ar laser), a 488 nm (excitação) e 620 nm (emissão). Dez mil células foram analisadas.

4.8 Bioinformática

4.8.1 Escolha do sistema de expressão

Como descrito na revisão bibliográfica, o sucesso para a expressão heteróloga inicia-se na correta escolha do sistema. Além das modificações pós-traducionais, os custos, a facilidade na manipulação e a presença de códons raros também deve ser analisada.

A problemática gerada pelas diferenças na preferência entre os organismos em relação ao códon pode ser superada pelo planejamento racional. Em nosso trabalho, com o objetivo de definir o melhor sistema de expressão da proteína antiviral nós determinamos qual o tipo de códon predominante no gene da proteína. Esta análise foi realizada pelo software Graphical Códon Usage Analyser. Este software é uma importante ferramenta que permite a análise de frequência do uso de códons ou valores de adaptabilidade relativa (FUHRMANN et al., 2004).

4.8.2 Caracterização da proteína com atividade antiviral por bioinformática

O sequenciamento nucleotídico da proteína de *Lonomia obliqua* com atividade antiviral descrita neste estudo foi realizado com *primers* que se anelam para a região mini-TN7 proveniente do vetor de transferência pFastBacTM1 (**Tabela 5**). A análise e a tradução desta sequência foi realizada pelo programa BioEdit versão 7.0.5.3, sendo então utilizada nas análises de bioinformática.

4.8.2.1 IUPRED (Previsão de Proteínas não estruturadas intrinsecamente)

Para definirmos se a proteína com atividade antiviral apresentaria conformação não estruturada intrinsecamente ou se ela seria globular, foi realizada análise com o auxílio do programa IUPRED (DOSZTANYI et al., 2005a; 2005b).

4.8.2.2 TargetP 1.1 Server e SignalP 3.0 Server

A localização sub-celular da proteína antiviral foi prevista pelo programa TargetP 1.1, baseada na presença de sequências sinais na região N-terminal para: peptídeo de

trânsito para o cloroplasto (cTP), peptídeo com alvo mitocondrial (mTP) ou peptídeo sinal de secreção (SP) (EMANUELSSON et al., 2000).

Também foi realizada uma análise pelo programa SignalP 3.0 para verificar a presença e localização de sequência de peptídeo sinal (NIELSEN et al., 1997; BENDTSEN et al., 2004).

4.8.2.3 Predição de estrutura secundária

Por se tratar de uma sequência nova, sem identidade identificada pelo blastp (*Basic Local Alignment Search Tool* - Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico), partimos para a procura de alinhamento de estrutura secundária da proteína em questão pelo programa *QuichPhyre*. Esta metodologia permite a comparação da sequência da proteína desconhecida com as sequências de proteínas experimentalmente determinadas e também a inferência da possível estrutura secundária da proteína em questão (KELLEY; STERNBERG, 2009).

4.8.2.4 Predição de clivagem proteossômica (MAPPP)

Para que a proteína possa ser apresentada por MHC de classe I (complexo principal de histocompatibilidade de classe I), um mediador crítico de reconhecimento imunológico, ela deve ser processada por proteossomos. Este processamento leva a formação de estruturas primárias, gerando aminoácidos capazes de se ligar ao MHC (KLOETZEL; OSSENDORP, 2004; MAGALHÃES; BÖHLKE; NEUBARTH, 2004).

Para verificar se a sequência da proteína rAVLO permitiria este processamento foi realizada uma análise utilizando-se o programa MAPPP que foi desenvolvido com base em dois algoritmos. O primeiro visa previsão do potencial de clivagem proteossomal e o segundo algoritmo, que utiliza os resultados da análise local de clivagem como uma entrada, fornece previsões de grandes fragmentos proteolíticos (HOLZHUTTER; FROMMEL; KLOETZEL, 1999; HOLZHUTTER; KLOETZEL, 2000).

4.8.2.5 NetMHC 3.2 Server e NetMHCII 2.2 Server

Para determinar se a sequência expressa da proteína aviral recombinante se ligaria a MHC foram realizadas análises pelos programas NetMHC 3.2 Server e NetMHCII 2.2 Server (BUUS et al., 2003; NIELSEN et al., 2003; NIELSEN et al., 2007; NIELSEN; LUNDEGAARD; LUND, 2007; LUNDEGAARD et al., 2008).

Estes programas permitem a previsão da interação de peptídeos a inúmeros alelos de HLA utilizando redes neurais artificiais e matrizes de peso (NetMHC 3.2 Server) e a previsão de peptídeos de HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP e MHC de alelos de camundongo de classe II usando redes neurais artificiais (NetMHCII 2.2 Server) (BUUS et al., 2003; NIELSEN et al., 2003; NIELSEN et al., 2007; NIELSEN; LUNDEGAARD; LUND, 2007; LUNDEGAARD et al., 2008).

4.8.2.6 JaMBW (Gráfico de antigenicidade)

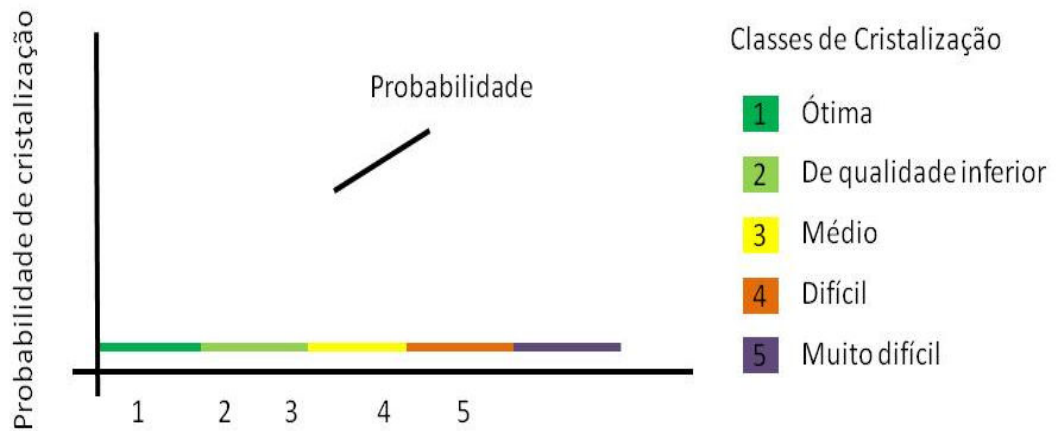
Através da análise da sequência de aminoácidos foi calculada pelo programa JaMBW (JaMBW Chapter 3.1.7) as possíveis regiões de antigenicidade ao longo da cadeia polipeptídica, como predito pelo algoritmo Hopp e Woods (1981). O programa gera um gráfico com os valores de índices antigênicos em função da posição de aminoácidos, sendo que, quanto maior o índice, maior a probabilidade destes grupos serem reconhecidos pelos anticorpos. Estas regiões permitem verificar se uma sequência tem a capacidade de estimular a formação de anticorpos (HOPP; WOODS, 1981).

4.8.2.7 Predição de dificuldade para cristalização (XtalPred)

Como um dos objetivos futuros do nosso grupo de pesquisa é a cristalização da proteína antiviral, para melhor caracterização da mesma, foram realizadas análises por bioinformática para verificar a dificuldade de cristalização da mesma (SLABINSKI, et al., 2007a; SLABINSKI, et al., 2007b).

Estas análises são realizadas por um programa com base em previsões de combinações de probabilidades individuais de cristalização em uma pontuação única de cristalização. Esta pontuação classifica a proteína em cinco diferentes classes de dificuldade de cristalização: ótimo, de qualidade inferior, médio, difícil e muito difícil (**Figura 17**).

Figura 17 - Exemplo de classificação de dificuldade de cristalização.



FONTE: XtalPred Server, 2012.

4.8.2.8 Cálculo da acessibilidade e gráfico de *buried* (interiorização).

Para calcular a acessibilidade e a interiorização das sequências da proteína antiviral foi utilizado o software PROFphd, um conjunto de programas de previsão de estrutura 1D de sequência de alinhamentos múltiplos (ROST, 1996). Este software faz parte do pacote disponível online no servidor do Predict Protein (ROST; YACHDAV; LIU, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Proteína antiviral recombinante

5.1.1 Sequência da proteína antiviral

A sequência codificadora para a proteína antiviral foi clonada integralmente, sendo que o desenho dos *primers* para amplificação foi realizado com base em sequência gentilmente cedida por Dra. Ana Beatriz Gorini da Veiga (UFCSPA-RS). Para a confirmação dos frames corretos de leitura as sequências foram traduzidas com o auxílio programa de bioinformática ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>).

5.1.2 Geração das sequências das proteínas de interesse

5.1.2.1 Extração de RNA e geração de cDNA

As sequências de RNA utilizadas para a produção dos recombinantes foram obtidas por meio de uma extração do RNA total de uma lagarta da espécie *Lonomia obliqua*, gentilmente cedida pelo pesquisador Roberto H. P. Moraes do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo SP.

Uma lagarta de quinto instar foi utilizada para a extração de RNA total, conforme descrito em material e métodos, com posterior geração do cDNA pela reação de transcriptase reversa.

5.1.2.2 Amplificação das proteínas de interesse

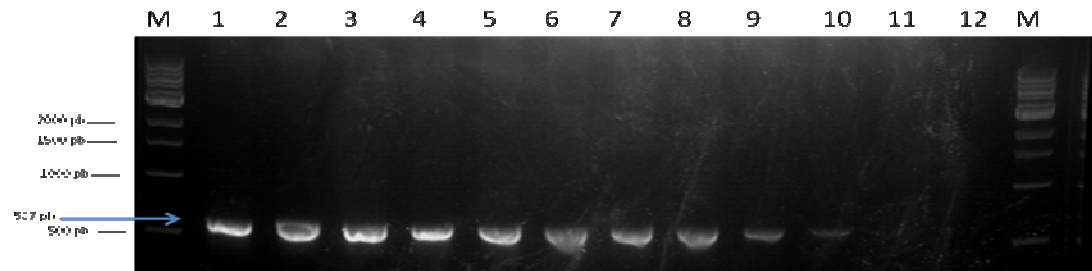
Para encontramos a temperatura de pareamento (ou *annealing*, T_a) ideal, onde ocorre o pareamento entre *primer* e *template* (fita molde), foram realizadas reações para a padronização da reação de PCR.

Para a amplificação da sequência da proteína antiviral foi realizada a padronização conforme descrito em material e métodos, nos permitindo estabelecer para a proteína antiviral (rAVLO) a seguinte ciclagem: ciclo inicial de 94° C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94° C por 1 minuto e 30 segundos, 55° C por 1 minuto e 30 segundos e 72° C

por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72° C por 10 minutos para extensão final.

A eletroforese em gel de agarose comprovou a amplificação deste domínio, o qual pode ser visualizado na **Figura 18**.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência correspondente a proteína 1 (rAVLO) (587 pb).



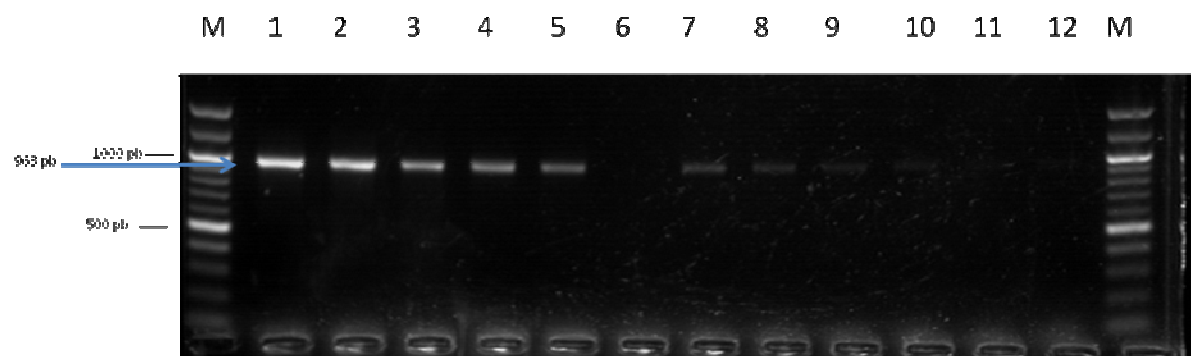
Legenda: **(M)** marcador de pares de base (1BK Ladder - Biolabs). PCR com gradiente **(1)** 55 °C; **(2)** 56 °C; **(3)** 56,9 °C; **(4)** 57,9 °C; **(5)** 58,8 °C; **(6)** 59,6 °C; **(7)** 60,4 °C; **(8)** 61,3 °C; **(9)** 62,1 °C; **(10)** 63,1 °C; **(11)** 64 °C; **(12)** 65 °C.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Para a proteína 8-LOH (Proteína 5), a padronização nos permitiu estabelecer a seguinte ciclagem: ciclo inicial 94° C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94° C por 1 minuto e 30 segundos, 48° C por 1 minuto e 30 segundos e 72° C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72° C por 10 minutos para extensão final.

Foi verificado o aparecimento das bandas esperadas 963 pb (8-LOH), o que comprovou a amplificação deste gene (**Figura 19**).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência correspondente a proteína 5 (8-LOH) (963 pb).



Legenda: **(M)** marcador de pares de base (100 pb Ladder - Biolabs). PCR com gradiente **(1)** 48 °C; **(2)** 49 °C; **(3)** 49,9 °C; **(4)** 50,9 °C; **(5)** 51,8 °C; **(6)** 52,6 °C; **(7)** 53,4 °C; **(8)** 54,3 °C; **(9)** 55,1 °C; **(10)** 56,1 °C; **(11)** 57 °C; **(12)** 58 °C.

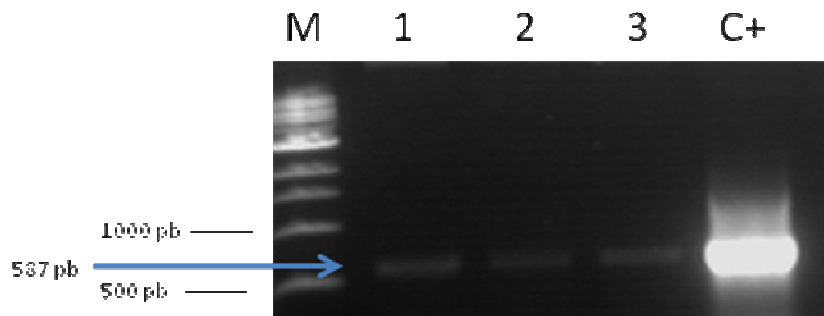
FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.1.2.3 Clonagem em pFASTBacTM1

A sequência do gene com atividade antiviral amplificado foi utilizada para a reação de clonagem em pFASTBacTM1, como descrito em material e métodos. A análise dos transformantes gerados foi realizada por PCR e restrição enzimáticas, ambas com análise em eletroforese. O mesmo procedimento foi realizado para a clonagem da proteína 8-LOH.

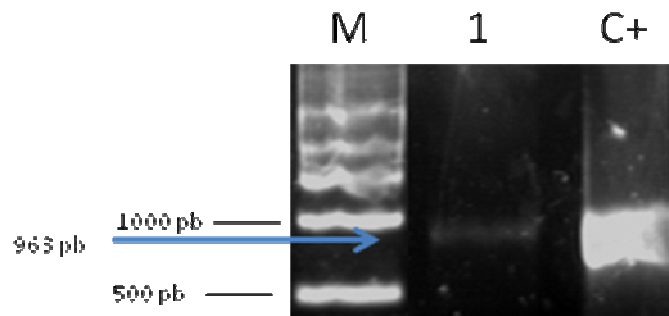
A análise das PCRs demonstrou a presença de amplificação de fragmento no tamanho esperado de 587 pb para a proteína antiviral (**Figura 20**) e de 963 pb para a proteína 8-LOH (Proteína 5) (**Figura 21**).

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1%) para confirmação da clonagem, com amplificação da sequência correspondente a proteína antiviral (Proteína 1) (587 pb).



Legenda: (M) marcador de pares de base (1BK Ladder - Biolabs); (1) clone 1; (2) clone 2; (3) clone 3; (C+) controle positivo.
FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

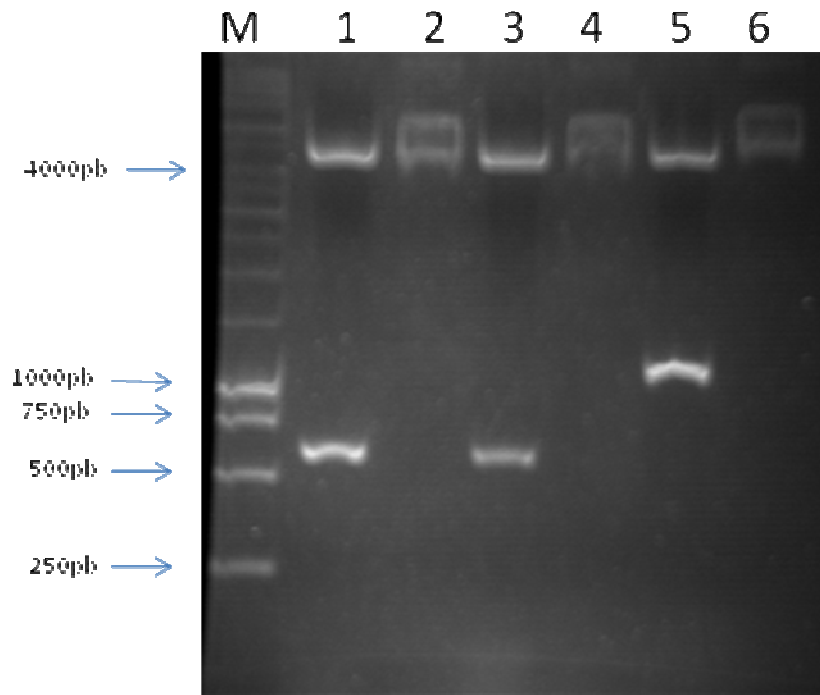
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (1%) para confirmação da clonagem, com a amplificação da sequência correspondente a proteína 5 (8-LOH) (963 pb).



Legenda: (M) marcador de pares de base (1BK Ladder - Biolabs); (1) clone 1; (C+) controle positivo.
FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

A análise das digestões enzimáticas demonstrou a presença de liberação dos insertos como demonstrado na **Figura 22** para proteína antiviral rAVLO (587pb) e proteína 8-LOH (963 pb), assim como o vetor linearizado (4775pb).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a liberação do inserto após digestão enzimática com as enzimas utilizadas para o processo de clonagem.



Legenda: **(M)** marcador de pares de base (1BK Ladder - Biolabs); **(1 e 3)** clone de rAVLO digerido com BamHI/HindIII; **(2 e 4)** controle negativo da reação de restrição enzimática; **(5)** clone da proteína 8-LOH digerido com BamHI/EcoRI; **(6)** controle negativo da reação de digestão.
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.1.2.4 Sequenciamento nucleotídico da proteína antiviral

Para a confirmação da clonagem foram realizadas reações de seqüenciamento. A análise destes resultados demonstraram a presença de 7 mutações pontuais, sendo que destas, 2 foram responsáveis pela troca de aminoácidos e 5 foram silenciosas.

A primeira mutação de base G → A ocorreu no nucleotídeo na posição 27, contando-se como nucleotídeo 1 a adenina do códon inicial. A segunda mutação foi encontrada na posição 33, com a troca T → C. Estas duas mutações foram silenciosas, pois não ocorreu alteração do aminoácido a ser expresso.

A terceira mutação encontrada foi na posição 49, com a troca A → G, ocasionando a troca do Ácido glutâmico (E) por uma Lisina (K).

A quarta mutação encontrada foi a troca de um C → A na posição 156.

A quinta provocou a mudança de A → T, com a mudança de aminoácidos de ácido aspártico (D) para valina (V) na posição 218.

A sexta e a sétima mutação foram silenciosas nas posições 444 e 446, com mudanças T → C e A → G respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da proteína com atividade antiviral hipotética e clonada demonstrando as mutações pontuais estão apresentadas na **Figura 23**.

Figura 23 - Sequências nucleotídicas e de aminoácidos da proteína com atividade antiviral nativa e clonada demonstrando as mutações pontuais.

Tradução no frame de leitura do Vektor pFASTBAC1® da Proteína 1

ATGTTGAAGTTTATAATTC TGCATT CTGTG GCAGTTGCTCAGGCG AAGAAAATGAATTAATTGGATCAGGT
 CATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAAACATCTCGTAGCATGTAGTGCCTTTTCTCTATACAAAGTCAA
 GGAGT CAATGCACCTGTGGCGATAAAAACCGATGTGCCTTTGCTTGTAAATCAAATACCAATCACC GG CAAACCG
 CAATCGAGCGACTCTGCCAAGAATTCATGGCAAGTGTAAATGGTTAAAAC TTACGAAGAAGTAAAGGAAACGGTG
 AATATCAAAAACATGC AAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACGAGTATTCTGTCTACAGAGAAATAAATGATAAT
 TTCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAACGGACCTGAAATCGCATT TATCTCCGTGGAAAC TT GCCT
 ACAAAGACTGTTTTCGAGAATACGAT TAAAAGTATACCGAAT TGGAAGTAGATCCGACTACGAG CTGTTATGC
 GATTTGAGT GAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACCATCACTAAA

5'3' Frame 1 (tanto pelo vetor quanto pelo inserto)

Met LKFIILSLLCAVAQA E ENELIGSGHLIATFPRLQKHLVACSAFSLYKVKGVQCT
 CGDKTDVPLLVIKYQSP V KPKQSSDSAQEF **Met** ASV **Met** VKTYEEVKETVNIKTCKC
 GKDETEYEYSVYREINDNFGIISAPQSPNGPEIAFISVETLPTKTVFENTIKSIPE
 LASRSDYELLCDLSENLYFQGH HHHHHH **Stop** KL

Tradução no frame de leitura do Vektor pFASTBAC1® da Proteína 1 – Sequência Clonada a partir do cDNA

1 27 33 49
 ATGTTGAAGTTTATAATTC TGCATT CTGTG GCAGTTGCTCAGGCG AAGAAAATGAATTAATTGGAT
 CAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAAACATCTCGTAGCATGTAGTGCCTTTTCTCTATA
 156
 CAAAGTCAAAGGAGT CAATGCACCTGTGGCGATAAAAACCGATGTGCCTTTGCTTGTAAATCAAATACCA
 218
 TCACCG CAAACCGCAATCGAGCGACTCTGCCAAGAATTCATGGCAAGTGTAAATGGTTAAAAC TTACG
 AAGAAGTAAAGGAAACGGTGAATATCAAACATGC AAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACGAGTATTC
 TGTCTACAGAGAAATAAATGATAATTTTCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAACGGACCTGAA
 444 446
 ATCGCATT TATCTCCGTGGAAAC TT CCTACAAAGACTGTTTTCGAGAATACGAT TAAAAGTATACCG
 AATTGGCAAGTAGATCCGACTACGAG CTGTTATGCGATTTGAGT GAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCA
 CCATCACCATCACTAA

5'3' Frame 1 (tanto pelo vetor quanto pelo inserto)

Met LKFIILSLLCAVAQA K ENELIGSGHLIATFPRLQKHLVACSAFSLYKVKGVQCT
 CGDKTDVPLLVIKYQSP D KPKQSSDSAQEF **Met** ASV **Met** VKTYEEVKETVNIKTCKC
 GKDETEYEYSVYREINDNFGIISAPQSPNGPEIAFISVETLPTKTVFENTIKSIPE
 LASRSDYELLCDLSENLYFQGH HHHHHH **Stop**

■ Mutação silenciosa

■ Mutação com mudança de aa

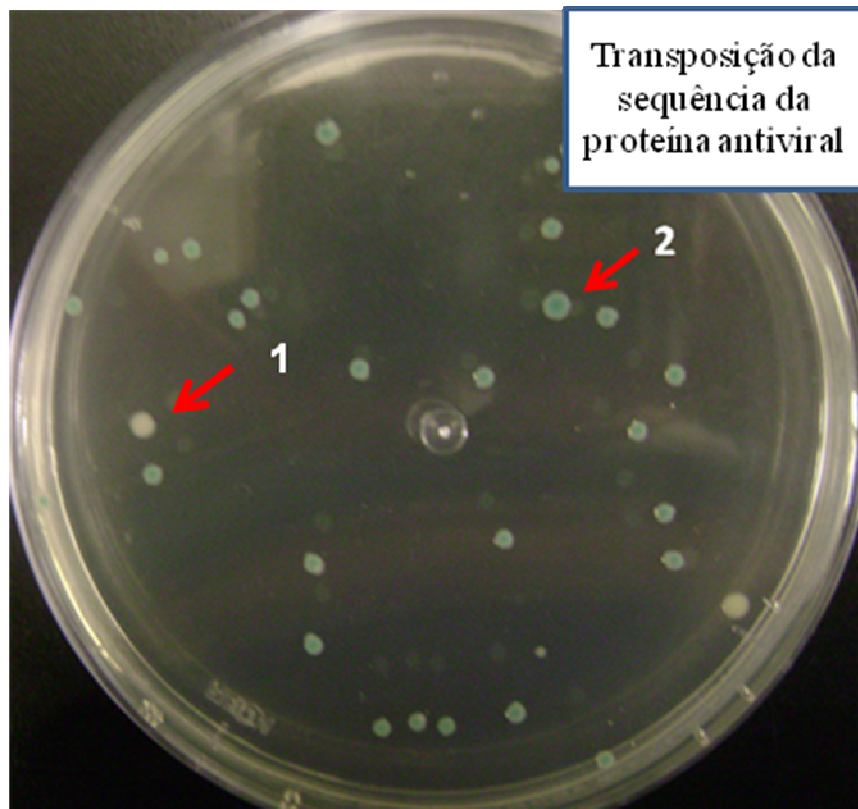
■ Primer para amplificação

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012

5.2 Geração dos bacmídeos recombinantes

Após a transformação bacteriana com os plasmídeos recombinantes pFastBac1 + rAVLO e pFastBac1+8-LOH previamente triados, foram encontradas colônias brancas e azuis nas placas. Como colônias brancas são um indicativo de que a transposição ocorreu com sucesso e colônias azuis indicam que o bacmídeo permaneceu sem alteração, pode-se verificar que possivelmente a transposição do gene da proteína antiviral para o bacmídeo (**Figura 24**).

Figura 24 - Placa com colônias de *E. coli* DH10Bac™ após transposição para geração de bacmídeo contendo a sequência para expressão da proteína antiviral.



Legenda: **(1)** Colônias brancas com o bacmídeo recombinante; **(2)** colônias azuis com bacmídeo inalterado, ou seja, sem transposição.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Estas colônias brancas são indicativas de clones transpostos com o gene de interesse, uma vez que, a interrupção da expressão do gene da β -Galactosidase em meio contendo o indutor IPTG (*isopropil- β -D-thiogalactoside*), impede a degradação do substrato cromógeno X-Gal ou Bluo-Gal, que confere fenótipo azul as colônias. O IPTG se liga ao se ligar à proteína repressora Lac inativando-a, permitindo a transcrição das sequências *downstream* ao promotor (manual Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System Invitrogen;

The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins).

Foi realizado então um repique das colônias brancas em meio LB-ágar contendo os antibióticos como descrito na etapa de transposição para um melhor isolamento de colônias e confirmação dos fenótipos.

Após 24 horas de incubação a 37 °C foi observada a presença de colônias brancas e isoladas que foram inoculadas em meio LB líquido com os antibióticos canamicina, tetraciclina e gentamicina nas concentrações descritas anteriormente. Estes cultivos foram mantidos a 37 °C *overnight* sob agitação de 250 rpm.

5.2.1 Análise e isolamento do bacmídeo recombinante

A confirmação da geração do bacmídeo recombinante codificante para a proteína antiviral foi realizada inicialmente por PCR seguida de eletroforese. Esta metodologia é utilizada, pois o bacmídeo é um DNA recombinante de alto peso molecular (135kb), dificultando a análise por restrição enzimática. Foram utilizados os *primers* M13 *foward* e *reverse* (**Tabela 6**), e sítios flanqueadores da região de transposição (LUCKOW et al., 1993).

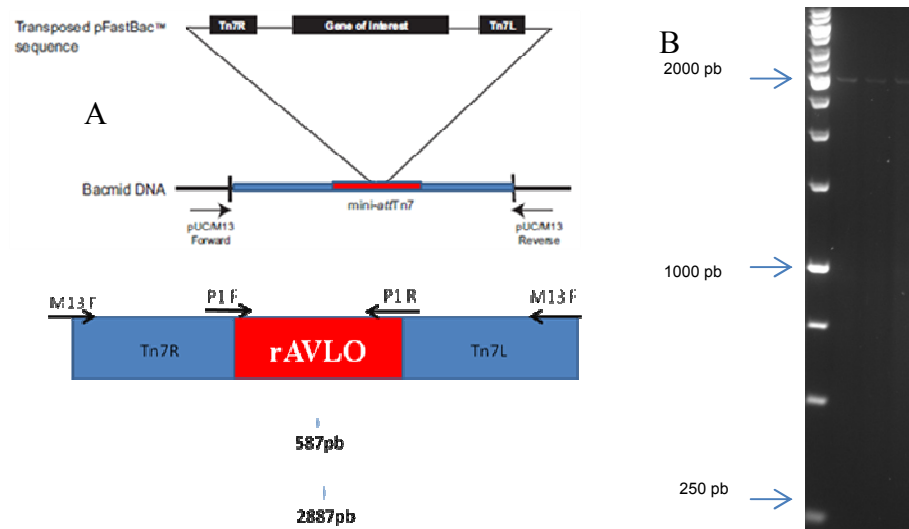
Foi possível a detecção da banda do tamanho esperado para a proteína antiviral rAVLO (Proteína 1) (**Tabela 7 e Figura 25B**) e proteína 8-LOH (Proteína 5) (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Tamanho esperado dos fragmentos gerados por PCR resultantes do processo de transposição.

Amostra	Tamanho do produto de PCR
Bacmídeo sozinho	~ 300pb
Bacmídeo transposto com pFastBac™ 1-Prot1	2300pb (bacmídeo)+587pb (Prot1) = 2887pb
Bacmídeo transposto com pFastBac™ 1-Prot5	2300pb (bacmídeo)+963pb (Prot5) = 3263pb

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Figura 25 - Região de transposição do baculovírus com rAVLO e confirmação em gel de agarose (1%).



Legenda: (A) desenho esquemático mostrando a região de transposição do baculovírus com rAVLO (2300 pb + 587pb da proteína rAVLO = 2887pb); (B) eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação da sequência para a verificação da transposição em baculovírus (2300 pb + 546pb da rAVLO = 2846pb). (M) marcador de pares de base (1BK Ladder - BioLabs New England); (1 a 3) clones com transposição positiva.

FONTE: (A) Adaptado do manual Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System (Invitrogen); (B) Carmo, A. C. V., 2012.

Os bacmídeos obtidos foram utilizados para a transfecção em células Sf-9. Transcorridos 6 dias após a infecção (144 horas), o sobrenadante foi coletado e utilizado para novas infecções.

5.2.1.1 Confirmação da presença da partícula viral nos cultivos transfectados

Como os vírus recombinantes não produzem poliedros, a ausência dessas estruturas dificulta este processo de reconhecimento, sendo muitas vezes necessária a aplicação de outras metodologias para a confirmação da infecção (HITCHMAN; POSSEE; KING, 2009).

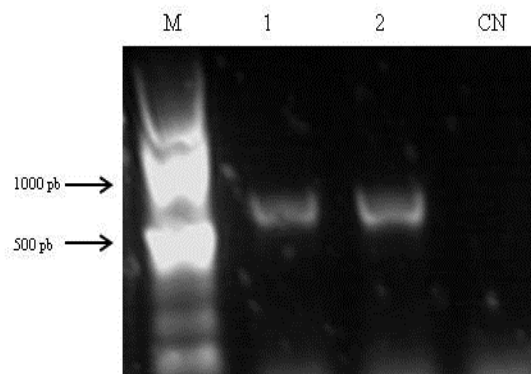
A partícula viral presente nas amostras transfectadas com o reagente Cellfectin® II (Invitrogen) foi detectada inicialmente por microscopia eletrônica (dados não apresentados).

5.2.1.2 Confirmação da presença do recombinante nos cultivos transfectados

Para confirmação da presença do recombinante nos cultivos transfectados, o DNA dos *budded virus*, BV (partículas virais infecciosas), foi utilizado como molde para a PCR com os *primers* utilizados na amplificação da sequência da proteína rAVLO.

Amostras das culturas de segunda passagem foram obtidas no dia 7 e dia 12 e após centrifugação, o *pellet* celular foi coletado. Foi utilizado 1 mL de cultivo como amostra para a extração de DNA conforme as indicações do item 4.5.3.3. Este DNA foi utilizado como molde para a realização de PCR com os *primers* utilizados na amplificação da sequência da proteína rAVLO. Após as análises em eletroforese (**Figura 26**) foi verificada a presença de bandas correspondentes a amplificação da sequência da proteína antiviral para os tempos coletados.

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a presença do DNA da proteína recombinante AcMNPV-AVLO em célula Sf-9.

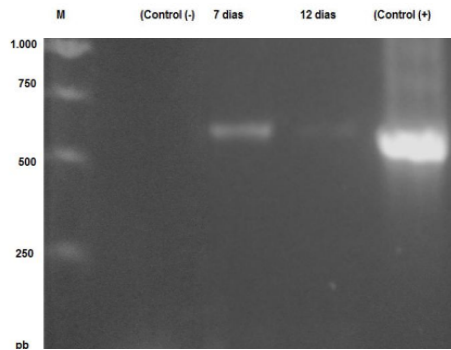


Amostras do cultivo foram coletadas nos dias 7 e 12 e realizado uma PCR. Legenda: **(M)** marcador de pares de base (100pb Ladder - BioLabs New England), 1: amostra dia 7, 2: amostra dia 12, CN: controle negativo.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Foi realizada também a extração de RNA dos cultivos com Trizol® (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante, conforme descrito anteriormente. Após a realização de reação de RT-PCR com *primers* para a amplificação da proteína antiviral, os amplificados analisados por eletroforese demonstraram a presença de banda com 587pb, ou seja, o tamanho da proteína antiviral. A banda de DNA foi mais intensa na amostra do dia 7 em relação ao do dia 12, o que provavelmente pode ter sido ocasionado por uma maior expressão da proteína antiviral pelo sistema no dia 7 e também pela troca de meio (**Figura 27**).

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a presença da transcrição da sequência da proteína recombinante AcMNPV-AVLO em célula Sf-9.



Amostras do cultivo foram coletadas nos dias 7 e 12 e realizado um RT-PCR. Legenda: **(M)** marcador de pares de base (1BK Ladder - BioLabs New England).
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.2.1.3 Confirmação da sequência da proteína recombinante

A análise dos resultados obtidos após o sequenciamento nucleotídico demonstrou, como observado na **Figura 28**, que a sequência da proteína recombinante obtida foi idêntica a sequência clonada. Estes resultados demonstram que o processo de transfecção foi eficiente e que o sistema baculovírus/células Sf-9 está produzindo a proteína, uma vez que foi observado a transcrição pela presença da positividade da sequência para a rAVLO resultante da extração do RNA.

Figura 28 - Sequência do cDNA da proteína recombinante rAVLO.

```

score = 965 bits (522), Expect = 0.0 Identities = 522/522
(100%), Gaps = 0/522 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 55  AATGAATTAAATGGATCAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCCGCTTCAAAAACATCTC 114
Sbjct 1    AATGAATTAAATGGATCAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCCGCTTCAAAAACATCTC 60

Query 115 GTAGCATGTAGTGGCTTTTCTCTATACAAAGTCAAAAGGAGTCCAATGCACCTGTGGCGAT 174
Sbjct 61  GTAGCATGTAGTGGCTTTTCTCTATACAAAGTCAAAAGGAGTCCAATGCACCTGTGGCGAT 120

Query 175  AAAACCGATCTGCCCTTGGCTTGTAAATCAAATACCAATCACCGGACAAAACCGCAATCGAGC 234
Sbjct 121  AAAACCGATCTGCCCTTGGCTTGTAAATCAAATACCAATCACCGGACAAAACCGCAATCGAGC 180

Query 235  GACTCTGCCCAAGAAATTCATGGCAAGTGTAAATGGTTAAAACITACGAAGAACTAAAAGGA 294
Sbjct 181  GACTCTGCCCAAGAAATTCATGGCAAGTGTAAATGGTTAAAACITACGAAGAACTAAAAGGA 240

Query 295  ACGGTGAATATCAAACATGCAAAATGTGCTAAGATGAAACGGAAATACGAGTATTCGTGTC 354
Sbjct 241  ACGGTGAATATCAAACATGCAAAATGTGCTAAGATGAAACGGAAATACGAGTATTCGTGTC 300

Query 355  TACAGAGAAATAAATGATAATTCGGCATTAATTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAAACGG 414
Sbjct 301  TACAGAGAAATAAATGATAATTCGGCATTAATTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAAACGG 360

Query 415  CCTGAAATCGCATTTATCTCCGTGGAAACITTACCTACAAAACGACTGTTTTCGAGAAATACG 474
Sbjct 361  CCTGAAATCGCATTTATCTCCGTGGAAACITTACCTACAAAACGACTGTTTTCGAGAAATACG 420

Query 475  ATTAAAAGTATACCGGAATGGCAAGTAGATCCGACTACGAGCCTTATGCGATTGAGT 534
Sbjct 421  ATTAAAAGTATACCGGAATGGCAAGTAGATCCGACTACGAGCCTTATGCGATTGAGT 480

Query 535  GAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACATAA 576
Sbjct 481  GAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACATAA 522
  
```

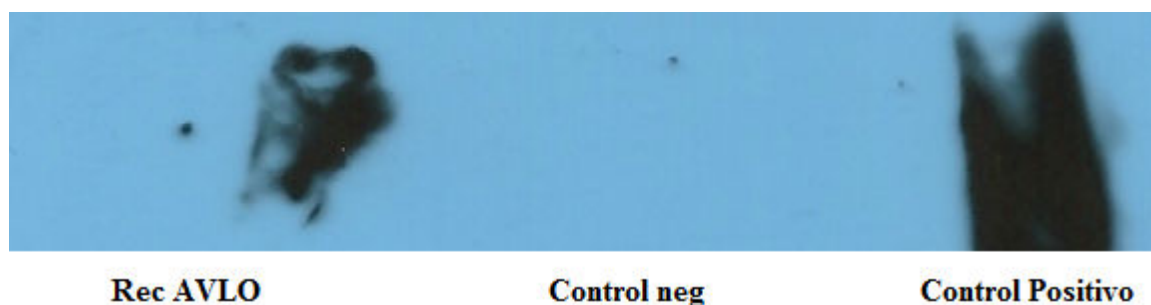
Sequência obtida do sobrenadante de um cultivo (dia 7) de células Sf-9 infectada com o baculovírus AcMNPV-AVLO. Legenda: **(Query)** sequência clonada; **(Sbjct)** sequência encontrada.
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012

5.2.1.4 Identificação da proteína recombinante por anticorpo anti-histidina

Para facilitar as etapas de purificação, na montagem do recombinante foi incluído uma sequência para a expressão de cauda de histidina na região C-terminal da proteína rAVLO (SCHMITT; HESS; STUNNENBERG, 1993).

Para determinar se os cultivos de células Sf-9 infectados com o AcMNPV-AVLO estavam produzindo a proteína recombinante rAVLO, uma amostra de um cultivo infectado (dia 7), foi obtida e aplicada a um gel de SDS-PAGE. Após a eletroforese, foi realizada uma transferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então marcada com anticorpo anti-histidina para confirmar a presença da proteína. O resultado está apresentado na **Figura 29**. Como pode ser observado, foi verificada a presença de uma banda com forte marcação com o anticorpo, comprovando a presença da proteína.

Figura 29 - Western Blot da proteína antiviral.



Western Blot de amostras de fração do AKTA (troca iônica) mostrando a presença da proteína antiviral. As proteínas presentes na membrana de nitrocelulose foram reveladas com um anticorpo anti-histidina. Legenda: (**Rec AVLO**) proteína recombinante com atividade antiviral; (**Control neg**) controle negativo; (**Control Positivo**) controle positivo.
 FONTE: Carmo et al., 2011.

5.2.1.5 Purificação da proteína recombinante antiviral rAVLO

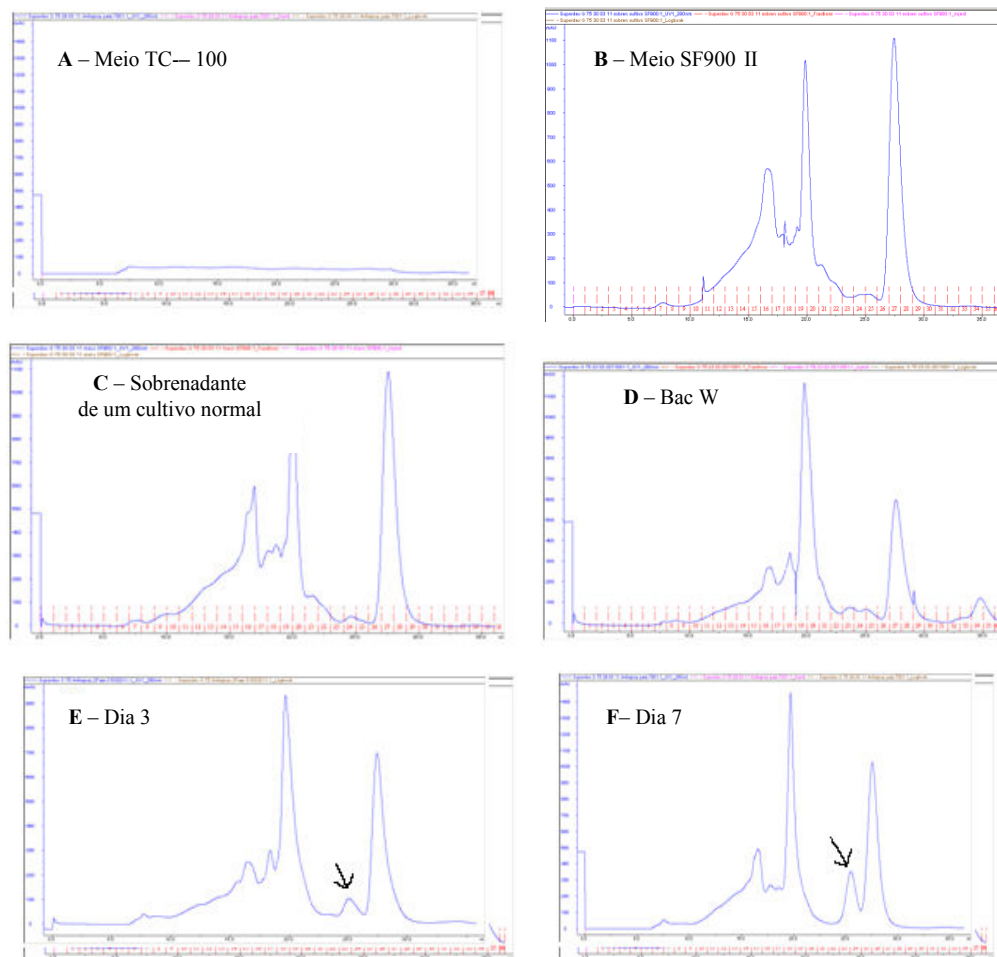
Para a obtenção da proteína recombinante purificada, amostras de cultivos infectados com o baculovírus AcMNPV-AVLO foram submetidas a cromatografia em coluna de gel filtração. Os resultados dos perfis cromatográficos são apresentados na **Figura 30**. Como controle foi realizado em paralelo cromatografias apenas com meios de cultivo (Tc-100 ou SF-900), com o sobrenadante de cultivos de células não infectados, infectados com um baculovírus selvagem (**BAC-W**) ou com o baculovírus contendo a sequência para a proteína recombinante obtida no dia 3 ou 7 pós-infecção.

Como pode ser observado, com um meio básico (TC-100) não foi visualizado nenhum pico protéico. No entanto, quando a cromatografia foi realizada com meio Sf-900,

utilizado nos cultivos de células Sf-9, vários picos protéicos foram observados. Este é um meio sintético e formulado para a produção de proteínas recombinantes, onde teoricamente não deveria conter a presença de proteínas. Esta observação sugere que este meio contém proteínas em sua composição, provavelmente alguns fatores de crescimento.

Os perfis cromatográficos obtidos do sobrenadante de cultivo realizado em meio Sf-900 e do infectado com baculovírus selvagem foram similares. Quando a cromatografia foi realizada com o sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus rAVLO um pico protéico de baixo peso molecular foi observado (**Figura 30 E e F**).

Figura 30 - Cromatografias em coluna de gel filtração.



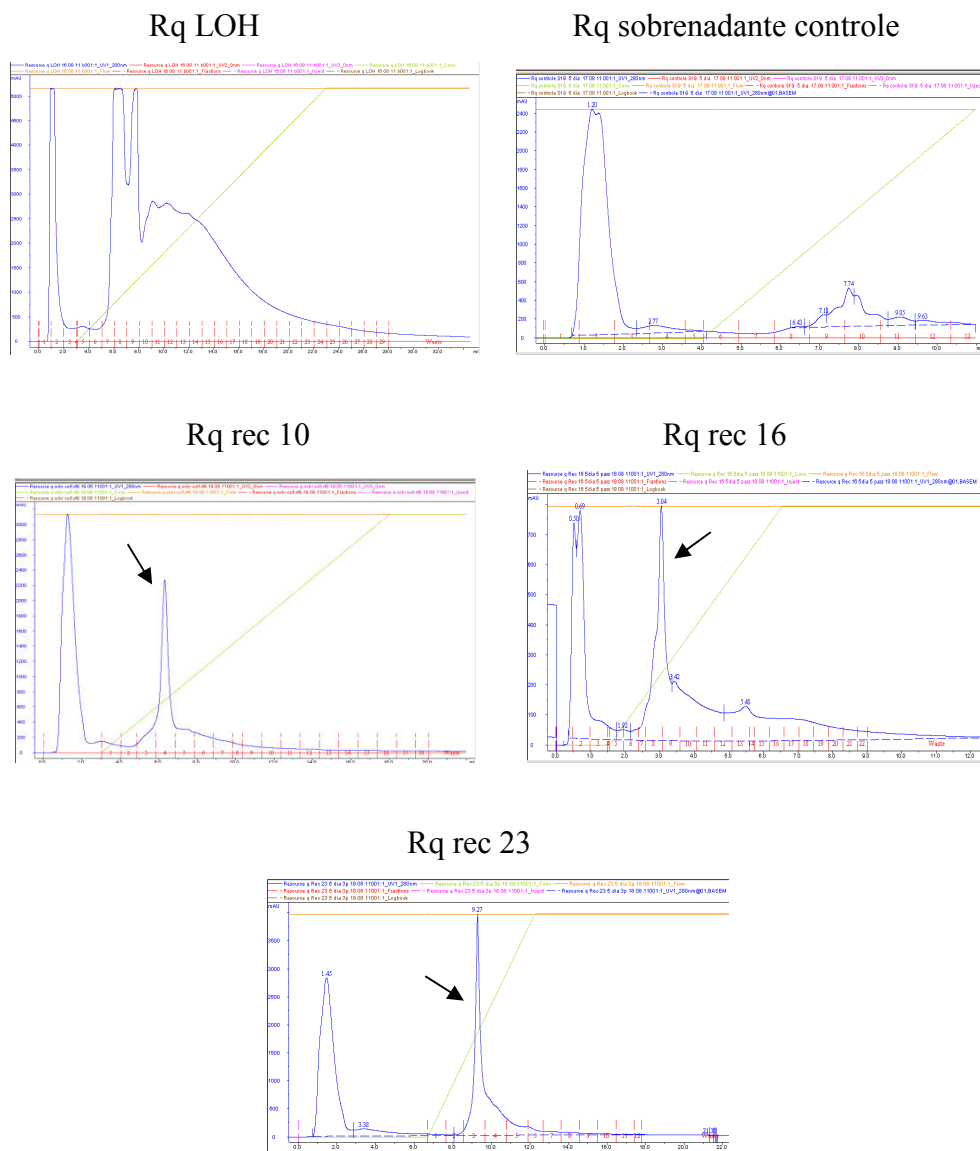
Cromatografia de alta eficiência com coluna de gel filtração (Akta purifier) de amostras de cultivos de células. Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados e controles (somente meio de cultivo) obtidos por cromatografias. Legenda: **(A)** Meio básico TC-100 utilizado nos cultivos de UFLAG; **(B)** Meio Sf-900, utilizado nos cultivos de células Sf-9; **(C)** sobrenadante de cultivo normal, sem infecção; **(D)** Sobrenadante de cultivo infectado com baculovírus selvagem; **(E e F)** Sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus AcMNPV-AVLO com 3 e 7 dias de infecção. As setas indicam a possível proteína recombinante produzida.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

As frações contendo a atividade antiviral desejada de três distintas clonagens (rec 10, rec 16 e rec 23) foram então aplicadas a uma coluna de troca iônica para separar as demais proteínas presentes nestas frações.

Na **Figura 31** estão apresentados os perfis cromatográficos obtidos em coluna de troca iônica. Frações de 1 mL destas cromatografias foram obtidas e uma amostra de cada uma delas foram testadas buscando identificar qual mantinha a atividade biológica.

Figura 31 - Cromatografias em coluna de troca iônica.



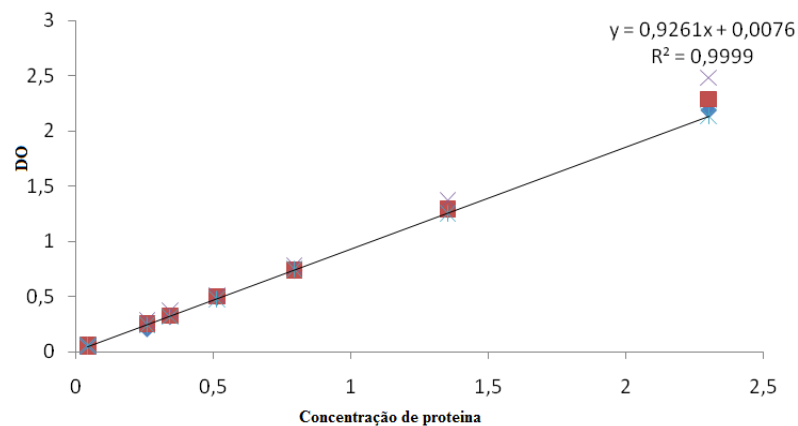
Legenda: Perfil cromatográfico em colunas de troca iônica de (A) hemolinfa total de *Lonomia obliqua*; (B) sobrenadante de cultivo não infectado; e (C, D e E) sobrenadante de cultivo infectado com 3 diferentes construções de AcMNPV-AVLO (rec 10, rec 16 e rec 23). Cultivos de 3 passagem (Rec 10 e rec 23) e 5 passagem (rec 16). Todas as amostras foram obtidas no 5º dia pós-infecção. Setas indicam a possível proteína recombinante produzida.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.2.2 Dosagem protéica de amostra da proteína recombinante

A quantidade de proteínas presentes nas amostras das frações obtidas nas cromatografias foi determinada como descrito no item 4.6.2. Na **Figura 32** é apresentada a curva padrão utilizada no experimento, e a **Tabela 8** mostra os resultados obtidos com a hemolinfa total e com as frações obtidas nas cromatografias realizadas com o sobrenadante dos cultivos infectados com os recombinantes.

Figura 32 - Curva padrão de BSA utilizada para quantificação de proteínas.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Tabela 8 - Determinação da quantidade de proteínas presentes na hemolinfa e nas frações purificadas dos recombinantes rAVLO

Amostra	Rq		
	Hb	rec10	rec 23
DO	3,375	0,56	1,845

Valores da dosagem de proteínas presentes na hemolinfa total de *Lonomia obliqua* (Hb) e nas frações purificadas em coluna de troca iônica dos recombinantes rAVLO (rec 10, rec 16 e rec 23). Os valores estão expressos em densidade ótica (DO).

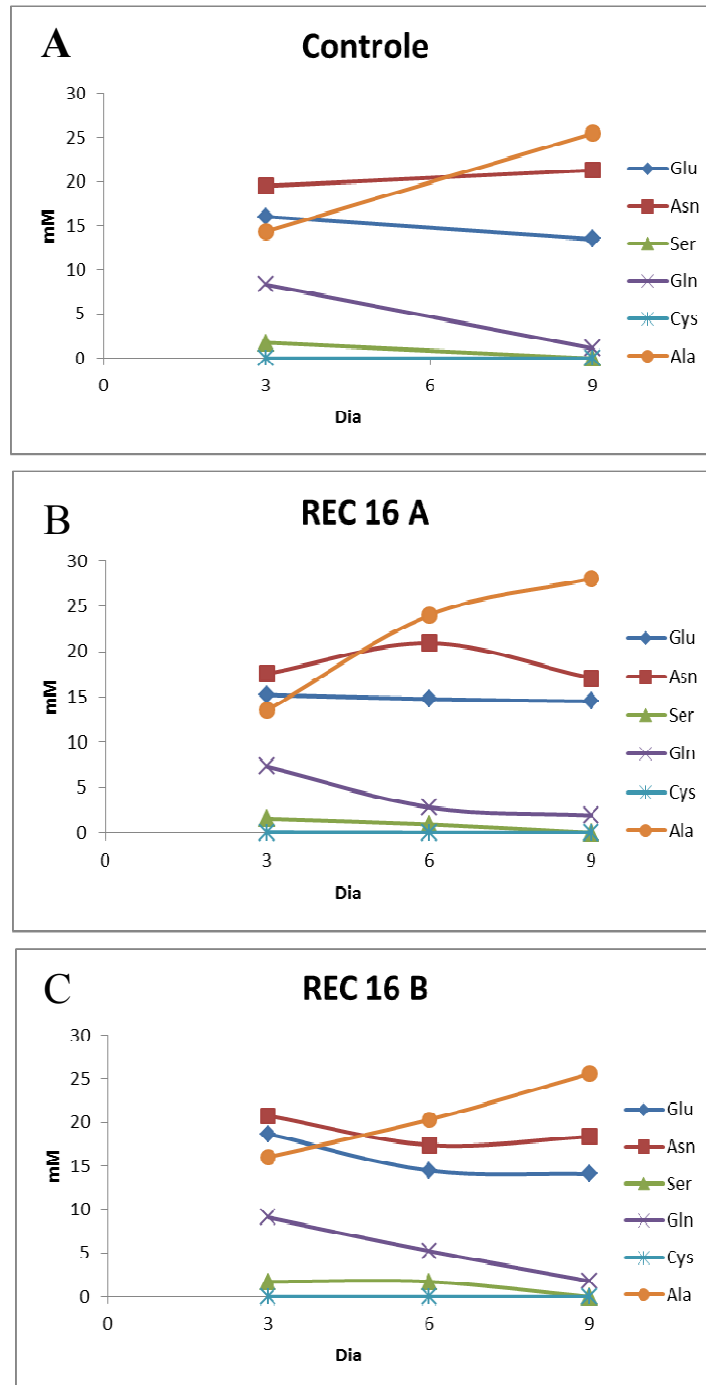
FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.2.3 Determinação de aminoácidos

Com o objetivo de determinar qual efeito da infecção no consumo de aminoácidos dos cultivos, amostra de um cultivo controle e infectado foi obtida diariamente e a quantidade de aminoácidos foi determinada como pode ser observado.

Nenhuma alteração no consumo de aminoácidos dos cultivos infectados foi observada em relação ao controle. Isso sugere não haver nenhum aminoácido que seja essencial para a produção da proteína antiviral recombinante nas condições utilizadas (**Figura 33**).

Figura 33 - Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9.



Legenda: **(A)** Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9 – controle; **(B)** Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus recombinante - rec16A; **(C)** Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus recombinante - rec16B.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

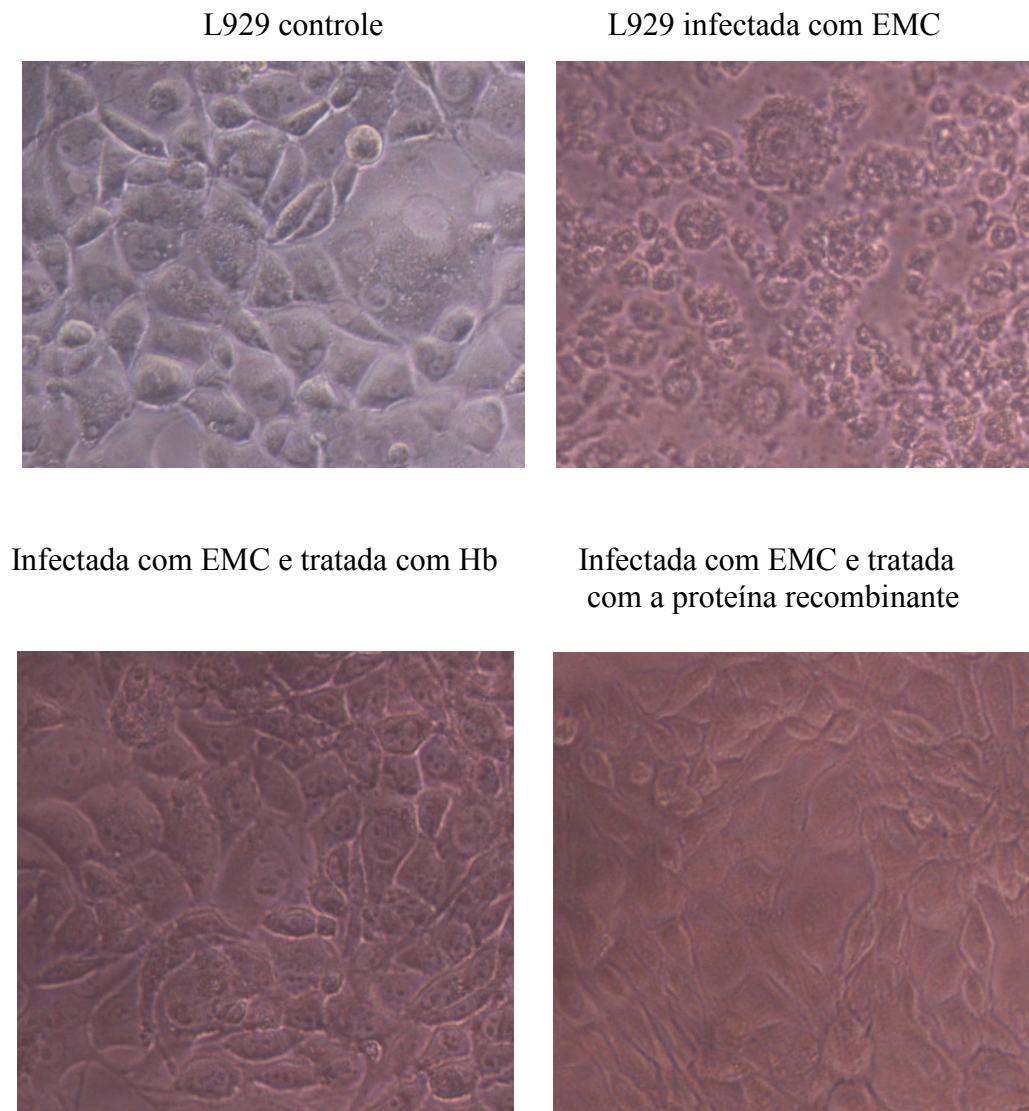
5.3 Atividade da proteína antiviral recombinante

5.3.1 Teste de atividade antiviral do sobrenadante do cultivo infectado com baculovírus recombinante e da proteína recombinante purificada

Para o estudo do efeito antiviral da proteína recombinante, células L929 foram tratadas previamente com 1%v/v de hemolinfa total de *Lonomia obliqua* ou com 10% v/v de sobrenadante filtrado de um cultivo de células Sf-9 infectadas com o baculovírus recombinante com as proteínas rAVLO ou 8-LOH.

Após 72 horas de infecção com vírus EMC, foram observados em microscopia óptica para a determinação dos efeitos citopáticos. Como pode ser visualizado na **Figura 34 e Tabela 9**, um intenso efeito citopático foi observado no controle infectado contrarimaneto ao observado nos cultivos infectados e tratados, tanto a hemolinfa total, quanto o sobrenadante de cultivo contendo a proteína recombinante, que foram capazes de neutralizar a replicação do vírus EMC.

Figura 34 - Efeito antiviral da proteína recombinante em células L929 infectadas com o vírus EMC.



As células foram tratadas previamente com 1%v/v de hemolinfa total de *Lonomia obliqua* ou com 10% v/v de sobrenadante filtrado de um cultivo de células Sf-9 infectadas com o baculovírus recombinante. Uma hora após o tratamento, as células foram infectadas com vírus EMC. Os cultivos foram observados por 72 horas sendo determinado o efeito citopático. Após este período o meio de cultivo foi retirado e as células coradas com cristal violeta 0,25% e observadas em microscópio invertido com aumento de 20x.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Tabela 9 - Produção de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929.

	Título do picornavírus (EMC) 72 horas após infecção (TCID₅₀ mL⁻¹)	Redução
Cultivo controle infectado	3,1 x10 ⁹ ± 1,3x10 ⁹	-
Hb	3,4 x 10 ⁹ ± 2,1x10 ⁸ *	91x
rAVLO (sobrenadante)	2,9 x10 ⁶ ± 3.63x10 ⁵ *	1069x
rAVLO (purificado)	3,2 x10 ⁵ ± 3.56x10 ⁴ *	9687x
Rec 8-LOH	4,3 x10 ⁹ ± 1,14x10 ⁹	-

Os cultivos células L929 foram tratados ou não tratados com hemolinfa total (1%), sobrenadante de cultivo infectado com baculovírus recombinante e proteína recombinante antiviral purificada (rAVLO) ou baculovírus expressando a proteína recombinante Rec 8-LOH, que foi utilizada como controle negativo. As células foram tratadas 1 hora antes da infecção. Os títulos virais estão expressos em TCID₅₀/mL. (TCID₅₀: *Tissue culture infectious dose 50%*). Os valores representam a média de 3 experimentos.

* indica valores de p <0.05.

FONTE: Carmo et al., 2012.

A atividade antiviral da proteína rAVLO foi determinada contra vírus pertencentes a famílias virais *Picornaviridae*, *Herpesviridae* e *Togaviridae*.

A família *Picornaviridae*, formada pelos gêneros: *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Rinovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus*, apresenta vírus não envelopados, formados por um RNA fita simples (ssRNA) de polaridade positiva. O genoma, formado por uma única ORF (matriz aberta de leitura), é poliadenilado na região 3' e apresenta na região 5' uma pequena proteína covalentemente ligado a sua extremidade (MARTIN; FLINT, 1997; WITWER et al., 2001; FIELDS, 2007).

As infecções causadas pelo vírus EMC (vírus da encefalomiocardite), são clássicas em camundongos, porém relatos de doenças em humanos já foram descritos em literatura (DREXLER et al., 2008). Estes vírus também foram relacionados ao desenvolvimento de diabetes insulino-dependentes, resultante da destruição das células beta pancreáticas em animais, servindo como modelo para o estudo da associação do vírus ao diabetes em humanos (TONIOLO et al., 1980; YOON; RAY, 1985).

Esta família de vírus é conhecida por apresentar patógenos que afetam os seres humanos e animais como o vírus causador da hepatite A, o poliovírus responsável pela

poliomielite e os rinovírus responsáveis pelo resfriado. Desta forma, a busca por novos medicamentos para o tratamento de infecções causadas pelos picornavírus é de fundamental importância (KNIPE et al., 2007).

Por serem agentes etiológicos de diversas doenças, os rinovírus são alvo de inúmeras pesquisas. Como a vacinação para a prevenção de doenças ocasionadas por estes tipos virais é improvável, os antivirais permanecem como sendo a única alternativa terapêutica /profilática. O desenvolvimento de antivirais contra a pólio, assim como de outras ferramentas adicionais, é um pedido da OMS (Organização Mundial da Saúde), para a erradicação poliomielite principalmente na África e Ásia (NORDER et al., 2011).

5.3.1.1 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral

A escolha da linhagem L929 para os testes iniciais de atividade antiviral foi realizada com base nos relatos em trabalhos que demonstraram que, apesar destes vírus terem a capacidade de transdução e de atuação como mediador na expressão de genes heterólogos nestas células, não havia correlação entre a expressão de um transgene e a produção de interferon α e β (IFN α/β) (CHENG et al., 2004; LIANG et al., 2006). Desta forma, pode-se concluir indiretamente que o efeito de atividade antiviral é decorrente da expressão da proteína heteróloga de *Lonomia obliqua* e não derivado do baculovírus AcMNPV.

Diversos estudos com antivirais para estes tipos celulares já foram relatados. Interferons foram utilizados por Weck et al (1982), adição de sais de amônio a células previamente tratadas com interferon (COMMOY-CHEVALIER; ROBERT-GALLIOT; CHANY, 1978), tratamento com isoprinosina e interferon (CHANY; CERUTTI, 1977).

Interferons, glicoproteínas e diversos indutores não virais, foram aprovados cientificamente para o uso terapêutico, porém, o vírus EMC foi capaz de se replicar em células tratadas com IFN, fazendo-se necessário a investigação de outros compostos antivirais (FRANCO et al., 1999; BRANDÃO et al., 2010).

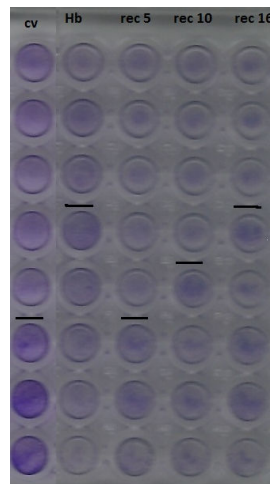
A quantidade máxima de vírus encefalomiocardite (EMC) que a hemolinfa total ou duas construções de recombinante antiviral (Rec 10 e Rec 16) consegue bloquear foi determinada. Células L929 cultivadas em microplacas de 96 escavações e tratadas previamente (1 hora) com 10 μ L de hemolinfa total (Hb) ou com 10 μ L do sobrenadante filtrado de cultivos de células Sf-9 infectadas com duas construções de AcMNPV-AVLO (rec 10 e rec 16) foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas de vírus EMC (razão 10).

Após 72 horas foi determinado a maior diluição viral que a suspensão contendo a proteína recombinante rAVLO foi capaz de inibir. Como a primeira diluição viral foi de 1:10, consideramos a última diluição do controle onde houve efeito citopático como tendo 10^5 DICT₅₀/0.1mL de vírus EMC.

No cultivo tratado com hemolinfa total a última diluição do vírus que induziu efeito citopático foi 10^3 indicando que a hemolinfa reduziu em 100 vezes a replicação viral. O mesmo resultado foi observado com a construção rec 16. A construção Rec 10 reduziu apenas 10 vezes o título do vírus, provavelmente pela menor quantidade de proteína expressa por este recombinante, como foi demonstrado na **Tabela 10**.

Um experimento controle foi realizado com o sobrenadante de um cultivo infectado com um baculovírus vazio, sem presença de recombinante (rec 5). Neste caso, o título viral foi idêntico ao do título obtido no controle positivo (10^5 DICT₅₀/0.1mL). Os resultados estão apresentados na **Figura 35 e Tabela 10**.

Figura 35 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela hemolinfa total ou o recombinante antiviral.



Células L929, cultivadas em microplacas de 96 escavações, foram tratadas previamente (1 hora) com 10 μ L de hemolinfa total (Hb), bacmídeo sem transposição (rec 5) ou construções de recombinantes antiviral (rec 10 e rec 16). Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas de vírus da encefalomiocardite (razão 10). Após 72 horas foi determinada a maior diluição da proteína capaz de inibir a replicação viral.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Tabela 10 - Redução do título viral de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929.

Recombinante	Concentração de proteína	Redução título viral
Rec 10	0,56	10x
Rec 16	1,85	100x
Rec 5	0,74	-
Hb	-	100x

Os cultivos células L929 foram tratados com hemolinfa total (1%), sobrenadante de cultivo infectado com baculovírus recombinante antiviral de clones 10 e 16 ou purificada (rAVLO) ou baculovírus sem transposição, para controle negativo. As células foram tratadas 1 hora antes da infecção. Os valores representam a média de 3 experimentos.

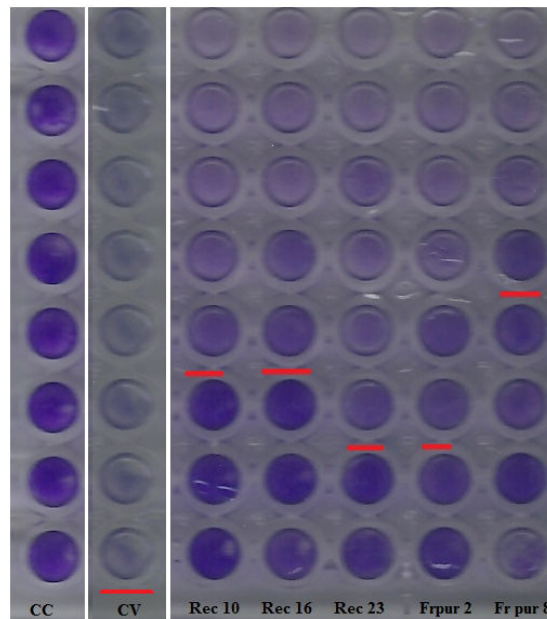
FONTE: Carmo et al., 2012.

5.3.1.2 Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pela proteína recombinante antiviral purificada

O sobrenadante de cultivos de células Sf-9 infectados com as diferentes construções (rec 10, rec 16 e rec 23) foram aplicados a uma coluna de cromatografia de troca iônica, conforme descrito na **Figura 31**. O perfil cromatográfico obtido foi idêntico para as 3 amostras. Das frações obtidas nestas cromatografias, 2 frações (Fr2 e Fr8), tiveram sua atividade antiviral testada frente o vírus EMC, de acordo com o protocolo citado acima.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 36**. Como pode ser observado, tanto os recombinantes originais, quanto a fração 8 da cromatografia de troca iônica, foram capazes de reduzir a replicação viral de 2 log (rec 23 ou Fr 2) a 4 log (fração purificada 8), demonstrando que a proteína antiviral está na fração purificada 8.

Figura 36 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pelos recombinantes antiviral rec 10, rec 16 e rec 23 e por suas frações purificadas.



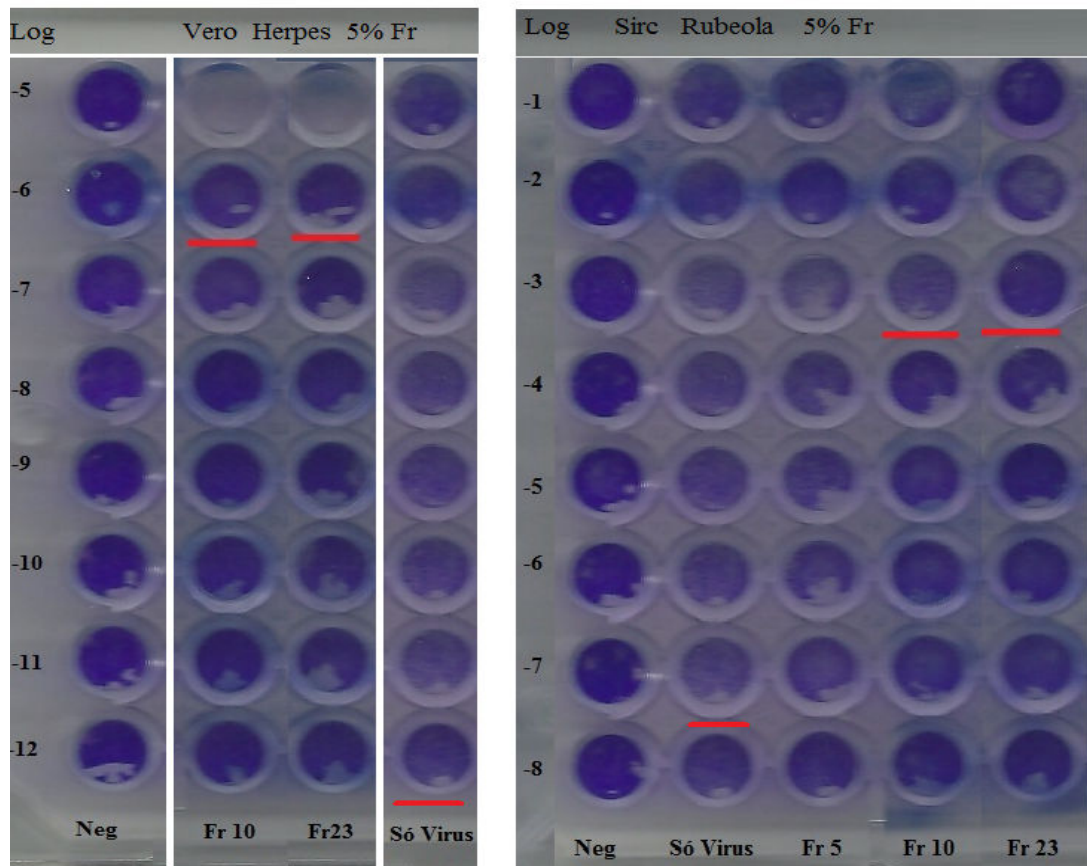
As células foram tratadas previamente (1 hora) com 10 μ L das diferentes construções ou a das frações purificadas 2 e 8. Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas de vírus da encefalomiocardite (razão 10). Após 72 horas foi determinada a maior diluição da proteína capaz de inibir a replicação viral.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

O mesmo procedimento para o teste de atividade antiviral utilizado para o vírus EMC foi realizado com o vírus da Herpes, propagados em células VERO e do vírus da Rubéola, propagados em células SIRC. Em ambos os casos, as células foram cultivadas em microplacas de 96 escavações e foram pré-tratadas com 5 μ L da proteína recombinante rAVLO (não purificada) ou com o sobrenadante de cultivos infectados apenas com baculovírus sem transposição.

As leituras das microplacas foram realizadas 7 dias após a infecção. Em ambos os casos, os sobrenadantes dos cultivos infectados com baculovírus recombinante com a proteína antiviral foi capaz de reduzir os vírus testados em 6 log (1.000.000 de vezes) para o Herpes e de 4 log (10.000 de vezes) para a Rubéola (**Figura37 e Tabela 11**).

Figura 37 - Determinação da quantidade máxima de vírus que pode ser neutralizada pelos recombinantes antiviral rec 10 e rec 23 e por uma construção sem proteína recombinante (Fr5).



As células foram tratadas previamente (1 hora) com 5 μ L das diferentes construções. Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas (razão 10) de vírus da Herpes (células VERO) ou vírus da Rubéola (células SIRC). Após 7 dias foi determinado a maior diluição da proteína capaz de inibir a replicação viral.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Tabela 11 - Produção do vírus da Herpes (células VERO) e do vírus da Rubéola (células SIRC).

	Título Viral (TCID ₅₀ /0.1mL)	Redução
(Herpes)		
Cultivo controle	10 ¹²	-
Fr 10 e Fr 23	10 ⁶	1.000.000x
Rubéola		
Cultivo controle	10 ⁷	-
Fr 5	10 ⁷	-
Fr 10 e Fr 23	10 ³	10.000x

FONTE: Carmo et al., 2012.

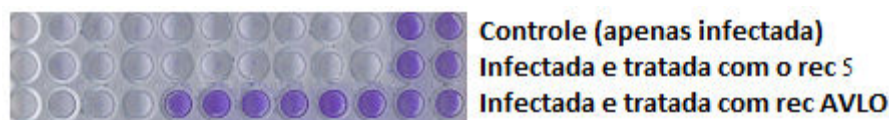
5.4 Efeito do baculovírus sobre a replicação do vírus EMC

Relatos presentes na literatura demonstraram a capacidade dos baculovírus em estimular a resposta imune inata em células de mamíferos (GRONOWSKI et al., 1999). Para verificar se o efeito antiviral observado é devido a proteína em estudo e não ao baculovírus, foram realizados estudos para eliminar esta possibilidade.

Para isso, cultivos de células L929 infectadas co EMC, foram co-infectadas baculovírus sem proteína heteróloga (bacmídeo sem transposição, ou seja, sem nenhum gene heterólogo) (rec 5).

Os resultados obtidos demonstram que apenas o bacmídeo vazio não foi eficaz na inibição da replicação do vírus EMC, apresentando resultados semelhantes ao controle de células infectadas e não tratadas. Conforme indicado na Figura 42, apenas o cultivo infectado e tratado com a proteína antiviral recombinante foi capaz de inibir a replicação viral, com uma redução de 64 vezes no título do vírus em comparação ao controle (**Figura 38**).

Figura 38 - Efeito do baculovírus recombinante AcMNPV-AVLO e do baculovírus sem presença de proteína recombinante (rec5), na inibição da replicação do vírus EMC.



Células Sf-9 foram tratadas previamente (1 hora) com proteína antiviral ou baculovírus não transposto. Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com 100 μ L de diluições seriadas (razão 2) do vírus EMC. Após 72 horas o efeito citopático foi observado em microscópio óptico e as placas coradas com 20 μ L de uma solução de violeta de genciana 0.25%.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.4.1 Determinação do tamanho e granulosidade das células infectadas por Citometria de fluxo

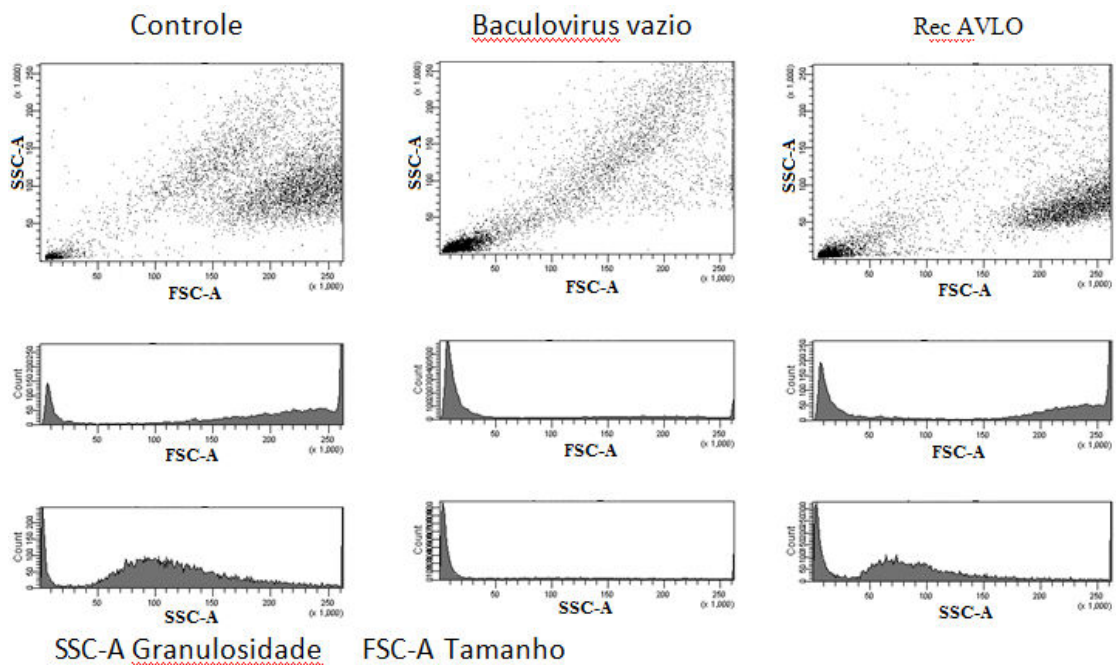
Para a confirmação da presença da partícula viral nos cultivos infectados, é sugerido pelo manual Bac to Bac o acompanhamento do aspecto visual da morfologia celular, uma vez que, estas células apresentam núcleos hipertróficos e aspecto granuloso que podem ser visualizados em microscopia óptica (LLOYD et al., 2000), sendo que, segundo Pedroza e Ramirez (2001), o diâmetro celular tem relação direta com a produção de proteína.

Para estudar o perfil de tamanho e granulosidade das células, uma amostra de células de cultivo controle, infectado com um baculovírus vazio (Rec 5) e com um

baculovírus expressando a proteína antiviral, foi aplicada a um citometro de fluxo. O perfil obtido está apresentado na **Figura 39**. Como pode ser observado, no cultivo infectado com o baculovírus recombinante expressando a proteína antiviral rAVLO, existe uma população de grande tamanho (FSC-A), que eventualmente são as células expressando o recombinante.

Uma característica observada após a infecção de células por baculovírus é o aumento no volume celular (núcleo). Isto ocorreria pelo acúmulo de partículas virais e proteínas dentro do núcleo (BLISSARD; ROHRMANN, 1990; HONG; BRAUNAGEL; SUMMERS, 1994).

Figura 39 - Citometria de fluxo de duas amostras de cultivos infectados com baculovírus, uma infectada com o AcMNPV-AVLO e outra contendo um baculovírus vazio, sem proteína recombinante.



As amostras foram obtidas de cultivos de células Sf-9 infectadas, 5 dias após a infecção. As amostras foram aplicadas a um citometro de fluxo e adquirido 10.000 eventos.

FONTA: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5 Bioinformática (Análise *in silico*)

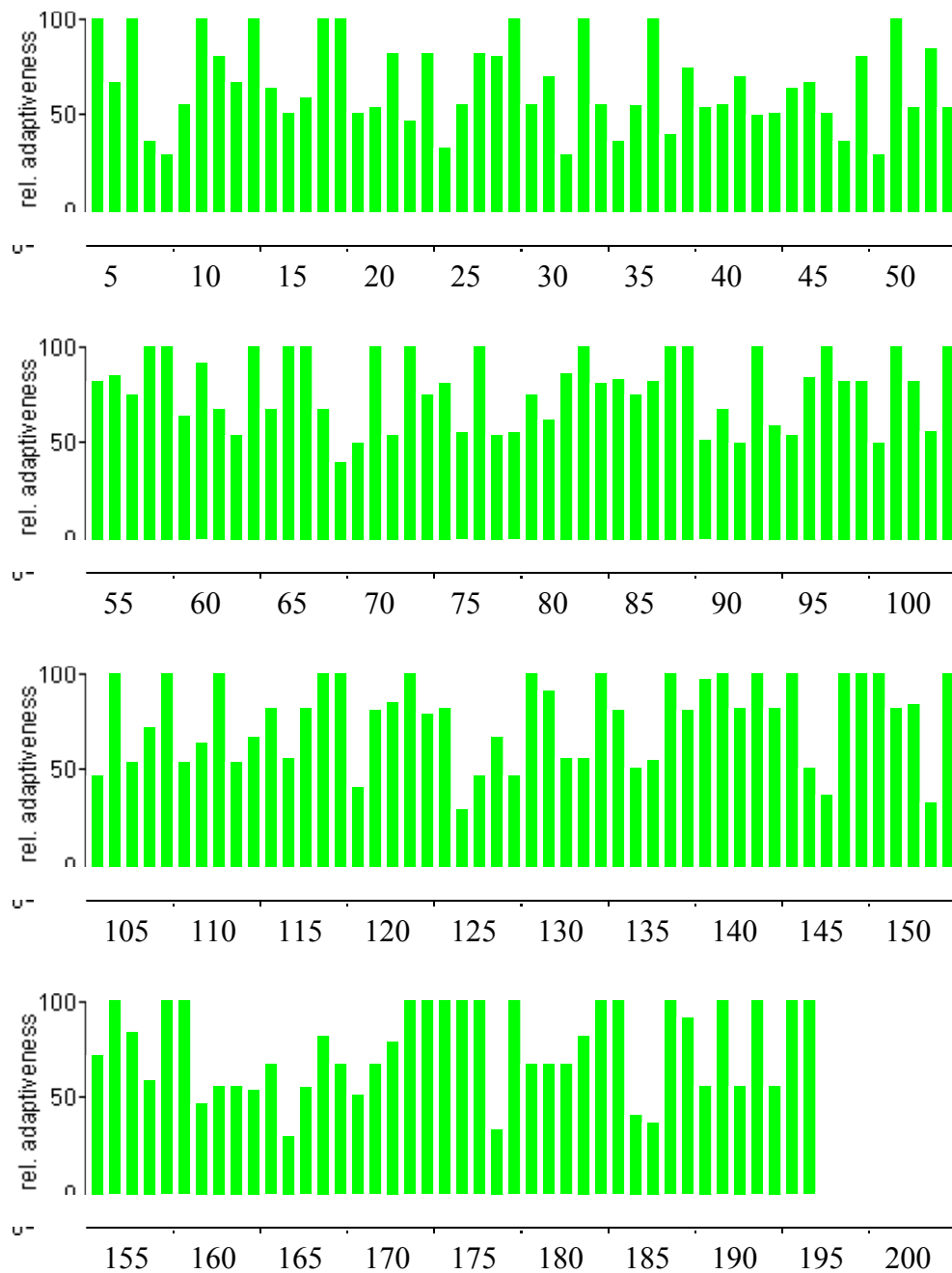
5.5.1 Escolha do sistema de expressão

Nos organismos vivos são encontrados dois tipos de códons: os códons principais, que são mais frequentes, e os raros, que requerem tRNAs não abundantes na célula. Estes tipos de códons influenciam a cinética de tradução, uma vez que os códons principais são traduzidos de forma mais rápida (KANE, 2002).

Os códons raros também prejudicam o padrão de expressão uma vez, ao se deparar com os mesmos, os ribossomos são capazes de realizar uma pausa no processo de tradução, permitindo o desligamento do RNA mensageiro (mRNA), diminuindo então, a produtividade da proteína. Várias cepas bacterianas foram desenhadas para evitar este problema, porém estas bactérias podem apresentar dobramentos incorretos da proteína e problemas de solubilização. O trabalho realizado por Rosano e Ceccarelli (2009) corrobora com esta hipótese uma vez que mesmo com o controle destas pausas na tradução, a expressão é prejudicada pelos problemas de solubilidade, agregação e dobramento incorreto, o que pode levar a proteínas biologicamente inativas.

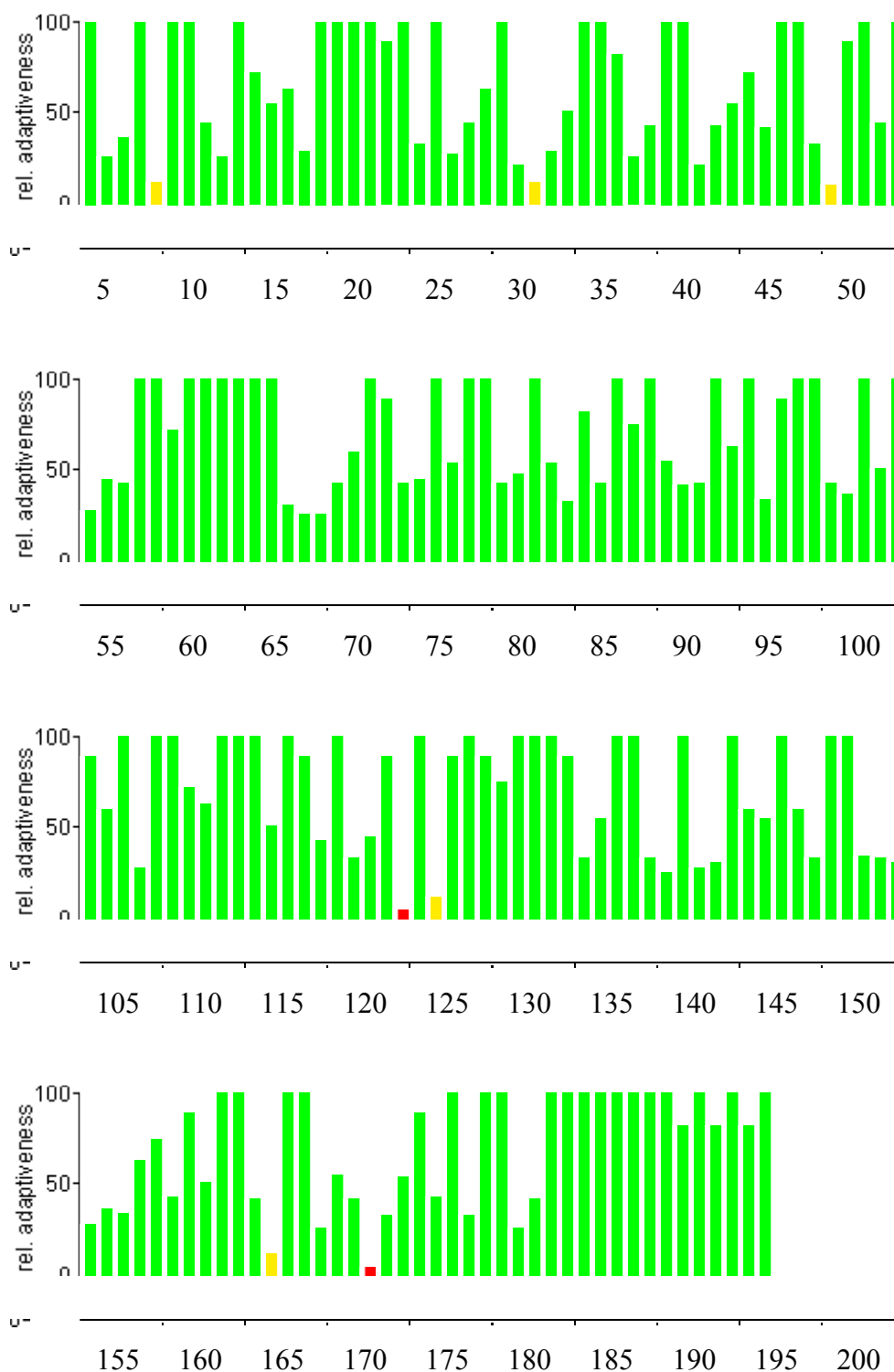
Em nosso trabalho, de forma a minimizar os problemas decorrentes de códons raros, foi realizada a análise de códons da proteína antiviral pelo Software: *Graphical Códon Usage Analyser*, cujas análises nos permitiram escolher o sistema baculovírus/ célula de inseto para a expressão heteróloga. Os dados demonstraram que, ao utilizarmos a linhagem de células de inseto Sf-9 como hospedeira, não foram encontrados códons raros (em verde – acima de 20%) (**Figura 40**). Já na utilização da cepa bacteriana *E. coli* K12 para a expressão da sequência antiviral, foram observados códons raros (barras amarelas e vermelhas), ou seja, com frequência de menos de 20% que poderiam prejudicar a expressão da proteína antiviral (**Figura 41**).

Figura 40 - Presença de códons raros na linhagem de células Sf-9.



Codontable: *Spodoptera frugiperda* (Sf-9). Legenda: Frequência de códons; (**verde**) acima de 20%.
 Software: Graphical Códon Usage Analyser.
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Figura 41 - Presença de códons raros na cepa bacteriana *E. coli* K12.



Codontable: *Escherichia coli* K12. Legenda: Frequência de códons; **(verde)** acima de 20%; **(amarelo)** entre 10 e 20%; **(vermelho)** abaixo de 10%. Software: Graphical Códon Usage Analyser. FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

A escolha por este sistema também foi realizada com base nas possíveis modificações pós traducionais necessárias para que a proteína antiviral recombinante fosse biologicamente ativa (KLENK, 1996; SCHMIDT, 2004). Desta forma, pode-se garantir que o sistema escolhido, apesar de mais laborioso, nos garantiria uma produção de proteína com dobramento adequado e com as modificações pós-traducionais necessárias.

5.5.2 Caracterização da proteína com atividade antiviral por bioinformática

5.5.2.1 Determinação da sequência da proteína antiviral

Um estudo de bioinformática foi realizado baseado na sequência gênica da proteína antiviral. Com a sequência nucleotídica da rAVLO (apresentada acima em 5.1.2.4) foi possível determinar a sequência protéica da proteína antiviral utilizando o programa ExPASy (**Figura 42**).

Figura 42 - Sequência da proteína antiviral gerada pelo programa ExPASy.

```

MLKFIIILSLLCAVAQAKENELIGSGHLIATFPRLQKHLV
ACSAFSLYKVKGVQCTCGDKTDVPLLVIKYQSPDKPQS
SDSAQEFMASVtVKTYEEVKETVNIKTCKCGKDETEYE
YSVYREINDNFGIIYSAPQSPNGPEIAFISVETLPTKTVF
ENTIKSIPELASRSDYELLCDLS ENLYFQGHHHHH Stop

```

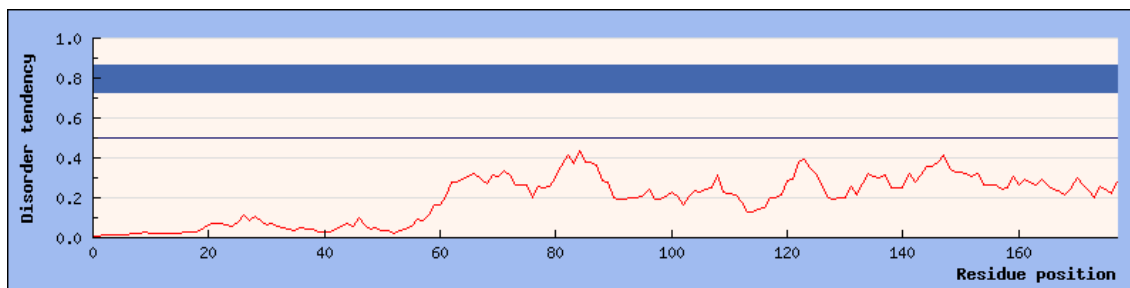
Legenda: **(Preto)** sequência de aminoácidos da proteína antiviral utilizada nas análises de bioinformática; **(amarelo)** sítio de reconhecimento TEV; **(vermelho)** cauda de histidina; **(Stop)** Códon de terminação.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5.2.2 Determinação da estrutura da proteína antiviral

Após a determinação da sequência da proteína antiviral gerada foram realizadas análises de bioinformática. A primeira delas, realizada pelo programa IUPRED, demonstrou que a estrutura da proteína é estruturada, ou seja, globular, uma vez que o gráfico gerado (**Figura 43**) mostra que todos os aminoácidos da sequência protéica possuem baixa tendência a desordem.

Figura 43 - Gráfico demonstrando a baixa tendência a desordem dos aminoácidos formadores da proteína antiviral.



Os valores de tendência a desordem encontrados para todos os aminoácidos não foram superiores a 0.6.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Para o reconhecimento de regiões ordenadas e desordenadas de uma proteína, este programa realiza uma estimativa da capacidade de formação de pontos de contatos de estabilização pelos polipeptídeos, com base nas interações entre os resíduos (DOSZTANYI et al., 2005b).

Proteínas globulares possuem um grande número de interações entre os resíduos, o que não ocorre em sequências desordenadas, uma vez que elas não são capazes de realizar estas interações de forma satisfatória para superar a perda de entropia durante o dobramento da proteína (GARBUZYNSKIY; FINKELSTEIN; GALZITSKAYA, 2004).

O cálculo da estimativa das energias de interação entre os aminoácidos das proteínas analisadas por este programa considera a contribuição de cada aminoácido para ordem ou desordem com base em sua natureza química e nas interações entre eles (DOSZTANYI et al., 2005b).

5.5.2.3 Determinação da probabilidade de secreção e possível região de clivagem da proteína rAVLO

Para verificar a possibilidade da proteína antiviral ser secretada ou não, foi realizada análise da sequência protéica pelo programa TargetP 1.1 Server e SignalP 3.0 Server.

Pela análise gerada pelo programa, pode-se inferir que, com probabilidade de 0,923 e classe de confiabilidade 1, ou seja, perto de 100%, que a proteína rAVLO é uma proteína secretada pelas células por apresentar uma região de peptídeo sinal (SP) (**Figura44**).

Figura 44 - Análise para predição de localização celular realizada pelo programa TargetP 1.1 Server.

```

### targetp v1.1 prediction results
#####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using NON-PLANT networks.

```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	184	0.023	0.936	0.133	S	1
cutoff		0.000	0.000	0.000		

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Pode-se inferir que, com probabilidade de 1.000 (**Figura5**), a proteína antiviral apresenta um peptídeo sinal. Tipicamente, trata-se de uma sequência peptídica N-terminal, conforme demonstrado acima, sendo formada por 15 a 40 aminoácidos composto por três regiões: uma região “n” carregada positivamente, uma região composta de aminoácidos hidrofóbicos denominada região “h” e uma c-região terminal formada por pelo menos 6 resíduos, até o sítio de clivagem do peptídeo sinal (NIELSEN, KROG, 1998; NIELSEN et al., 1997; EMANUELSSON et al., 2000).

Figura 45 - Análise para predição de localização celular pelo programa pelo programa SignalP 3.0 Server.

```

>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.988 between pos. 16 and 17

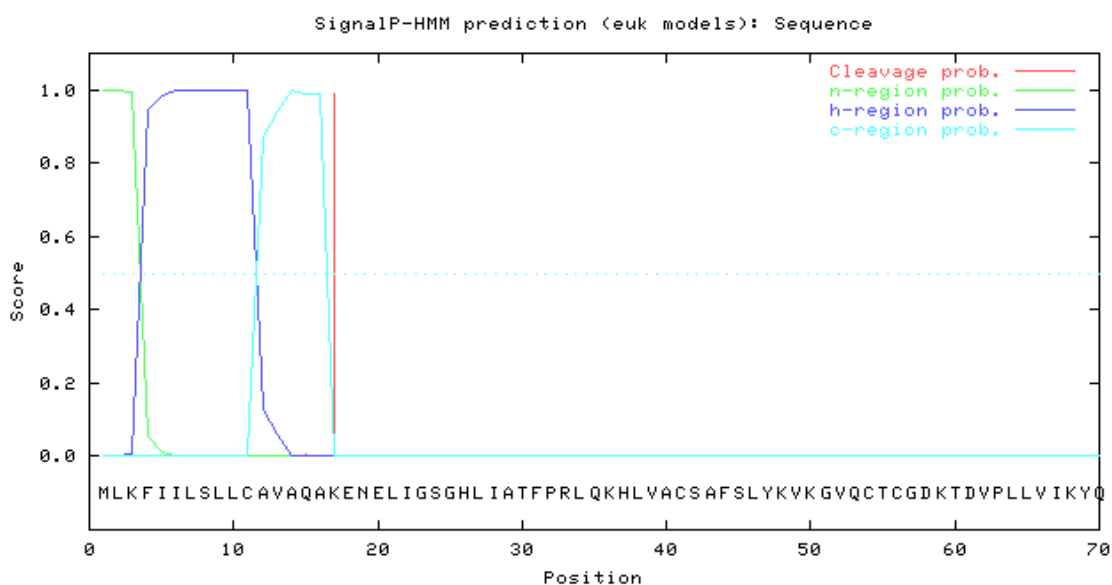
```

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

As análises de bioinformática para a localização sub-celular da proteína e da presença de peptídeo sinal condizem com a localização celular da proteína antiviral que *in vivo*, que deve é secretada e encontrada na hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* (GRECO et al., 2009).

Uma vez que foi demonstrada pelas análises a presença de um peptídeo sinal, pode-se inferir também, pela análise dos dados do gráfico abaixo, com probabilidade de 0.988, que o sítio de clivagem da proteína estaria entre os aminoácidos 16 e 17. O gráfico gerado pelo programa SignalP 3.0 Server demonstra a possível região do peptídeo sinal com suas sub-regiões: n (verde), h (azul escuro) e c (azul claro) (**Figura 46**).

Figura 46 - Gráfico gerado pelo programa SignalP 3.0, determinando provável sítio de clivagem da proteína.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Como mencionado, um peptídeo sinal é formado por três regiões compostas por 15 a 40 aminoácidos composto. No caso da proteína antiviral foi determinado que esta sequência apresenta 16 aminoácidos, sendo que as três regiões: “n”, “h” e “c” foram determinadas (NIELSEN; KROG, 1998; NIELSEN et al., 1997; EMANUELSSON et al., 2000).

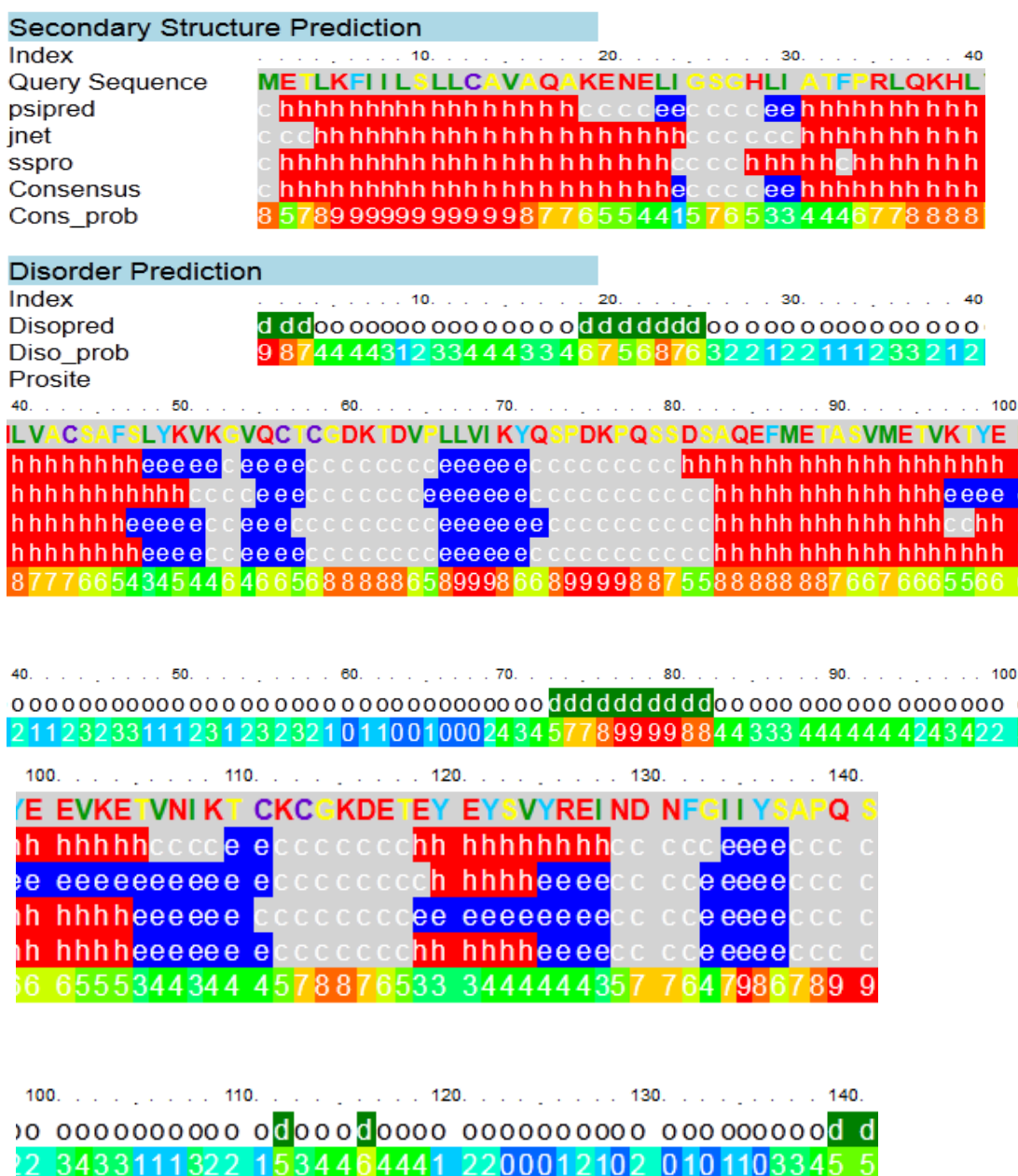
5.5.2.4 Predição de estrutura secundária

A análise gerada pelo programa QuichPhyre demonstra a possível estrutura secundária. Por esta metodologia são geradas 3 predições de forma independente pelos programas Psi-Pred, SSPro e Jnet e uma previsão de consenso.

Os resultados apresentados podem ser visualizados da seguinte forma na **Figura 47**, as alfa-hélices (α -hélices) são marcadas de vermelho e grafadas com a letra “h”. As folhas beta (folhas β) são marcadas com azul e grafadas pela letra “e”, e as espirais são

marcadas com cinza e grafadas com a letra “c”. Abaixo do consenso pode-se verificar a confiança na previsão em cada posição com valores variando entre 0 (baixo nível de confiança) a 9 (alta confiança). Da mesma forma, o nível de desordem também pode ser analisado, com as posições marcadas como “d” para desordenada e “o” de ordenado, também com probabilidade variando entre 0 (baixo) e 9 (alto) (KELLEY; STERNBERG, 2009).

Figura 47 - Possível estrutura secundária da proteína antiviral de *Lonomia obliqua* gerada pelo programa QuichPhyre.





Legenda: (H) *helix*; (E) *sheet*; (folha); (C) *coil* (espiral).
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

O servidor Phyre, previu a composição como 40% da hélice, 24,86% da folha e 35,14% de espirais. A sequência de predita pelo servidor PredictProtein aponta como resultado 37,08% hélice, 29,21% da folha e 33,71% de espirais.


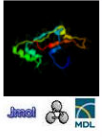


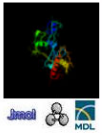


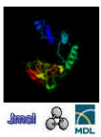

Estas análises demonstram uma grande presença de α -hélices na região N-terminal e nos permitiu classificar a proteína antiviral como sendo $\alpha \beta$, segundo os critérios descritos por Levitt e Chotia (1976) uma vez que foi verificada a presença de mais de 30% de α -hélices e mais de 20% de folhas β encontradas separadamente ao longo da cadeia protéica.

A análise estatística entre os resultados gerados pelas duas análises não demonstrou diferença significativa ($0,4 < p < 0,9$), o que no permite inferir que esta seja possivelmente a estrutura secundária da proteína antiviral de *L. obliqua*.

Na análise de BLAST da sequência de cDNA da proteína antiviral, nenhuma sequência com similaridade no Genbank foi encontrada. Os resultados indentificaram apenas uma região baixa similaridade (41%) com *carnitina acetil-transferase* (CAT) (números de acesso no Genbank: EGC43300.1; EEH08271.1; EER39656.1), entre os resíduos 97 até 138 da proteína consulta com resíduos 552 a 597 das sequências de referência.

Buscando-se identificar a qual classe pertence esta proteínas, foi realizada a análise de bioinformática pelo programa QuichPhyre, através do alinhamento de *fold*. A análise dos resultados demonstra que, com uma precisão de apenas 20%, a proteína antiviral de *Lonomia obliqua* possa pertencer a classe transferase. Os outros resultados apresentaram valores de precisão menores que 10% (**Figura 48**). Isso nos leva a concluir que esta proteína possa pertencer a uma classe protéica ainda não descrita, o que deverá ser comprovado com estudos posteriores.

Figura 48 - Resultado obtido a partir de alinhamento de *fold* pelo programa QuichPhyre.

Fold Recognition								
View Alignments	SCOP Code	View Model	E-value	Estimated Precision	BioText	Fold/PDB descriptor	Superfamily	Family
	c1yaxC (length:153) 14% i.d.	 	10	20 %	n/a	PDB header: transferase, signaling protein	Chain: C; PDB Molecule: virulence sensor protein phoq, sensor domain;	PDB Title: crystal structure analysis of s typhimurium phoq sensor domain with2 calcium
	c2bn4A (length:682) 12% i.d.	 	28	5 %	n/a	PDB header: oxidoreductase	Chain: A; PDB Molecule: nadph cytochrome p450 reductase;	PDB Title: a second frn-binding site in yeast nadph-cytochrome p4502 reductase suggests a novel mechanism of electron transfer3 by diflavin reductase
	d1yqva2 (length:286) 20% i.d.	 	44	0 %	n/a	ADP-ribosylation	ADP-ribosylation	ADP-ribosylating toxins

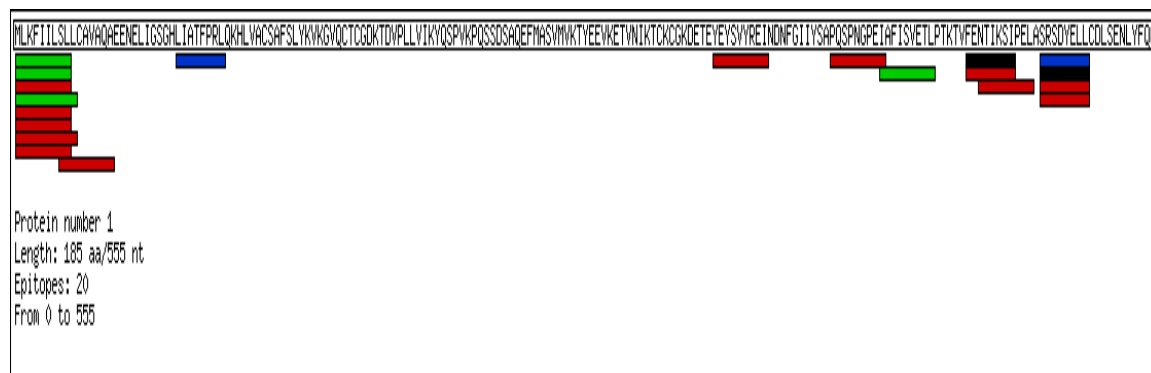
FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5.2.5 Predição de clivagem proteossômica (MAPPP)

A análise dos resultados permitiu inferir também que, a sequência da proteína antiviral possui regiões que provavelmente são clivadas por proteossoma, o que garantiria que esta proteína poderia ser apresentada por MHC de classe I (**Figura 49**). Os proteossomas são formados por complexos multiprotéicos citoplasmáticos que possuem a capacidade biológica de degradação proteolítica de algumas proteínas citoplasmáticas (MAGALHÃES; BÖHLKE; NEUBARTH, 2004).

Isto é bastante significativo, pois temos observado em resultados preliminares que a proteína antiviral atua sobre o mecanismo imune inespecífico, inclusive com ativação de macrófagos (dados não apresentados).

Figura 49 - Predição de clivagem proteossômica.



Legenda: **(verde)** o epítipo ligado MHC evoluíram a partir de um fragmento proteossomal clivado com exatamente o mesmo tamanho; **(azul)** o fragmento proteossomal clivado foi cortado no lado N-terminal para obter o epítipo (com um mecanismo já conhecido por ser inexistente); **(vermelho)** o fragmento teria que ser cortado no lado C-terminal (para o qual nenhum mecanismo é conhecido até o momento); **(cinza / preto)** o fragmento teria que ser cortado em ambos os lados.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Proteínas virais possuem a capacidade de ligação a MHC de classe I. Para que isto ocorra, proteínas antigênicas são lisadas por proteossomos, liberando no citoplasma peptídeos antigênicos. Estes peptídeos são transportados para o retículo endoplasmático (RE) onde se associam a dímeros recém-formados da classe I do MHC, estabilizando estas moléculas. Após a formação de uma vesícula, este complexo migrará pelo complexo de Golgi até a membrana celular, onde será exteriorizado permitindo o seu reconhecimento pelas células T CD8+ citotóxicas (MAGALHÃES; BÖHLKE; NEUBARTH, 2004).

5.5.2.6 Ligação da proteína antiviral com sítios de HLA

A análise de bioinformática da sequência protéica pelos os programas NetMHC 3.2 Server e NetMHCII 2.2 Server permitiu a predição de que existem na proteína vários sítios de ligação forte e fraca com diversos bancos de HLA (**Figuras 50 e 51**).

Figura 50 - Previsões geradas utilizando Redes Neurais Artificiais pelo programa NetMHC versão 3.2 com o alelo HLA-A0202.

CENTERFOR BIOLOGICAL SEQUENTIAL ANALYSIS CBS

NetMHC 3.2 Server - prediction results

Technical University of Denmark - DTU

Monday January 2 2012 15:23
[Download output sheet](#)

NetMHC version 3.2. 9mer predictions using Artificial Neural Networks. Allele HLA-A0202.
 Strong binder threshold 50 nM. Weak binder threshold score 500 nM
[Download output sheet](#)

pos	peptide	logscore	affinity(nM)	Bind Level	Protein Name	Allele
83	FMASVMVKT	0.835	5	SB	Sequence	HLA-A0202
0	MLKFIIISL	0.723	20	SB	Sequence	HLA-A0202
37	LVACSAFSL	0.716	21	SB	Sequence	HLA-A0202
87	VMVKTYEEV	0.712	22	SB	Sequence	HLA-A0202
25	HLIATFFRL	0.690	28	SB	Sequence	HLA-A0202
36	HLVACSAFS	0.618	62	WB	Sequence	HLA-A0202
4	IISLLCAV	0.596	79	WB	Sequence	HLA-A0202
5	IISLLCAVA	0.595	80	WB	Sequence	HLA-A0202
7	SLLCAVAQA	0.547	134	WB	Sequence	HLA-A0202
79	SAQEFMASV	0.545	137	WB	Sequence	HLA-A0202
13	AQAKENELI	0.522	175	WB	Sequence	HLA-A0202
142	FISVETLPT	0.520	179	WB	Sequence	HLA-A0202
19	ELIGSGHLI	0.509	203	WB	Sequence	HLA-A0202
3	FIISLLCA	0.494	238	WB	Sequence	HLA-A0202
40	CSAFSLYKV	0.491	247	WB	Sequence	HLA-A0202
1	LKFIIISLL	0.443	413	WB	Sequence	HLA-A0202
164	LASRSDYEL	0.425	502		Sequence	HLA-A0202
140	IAFISVETL	0.368	932		Sequence	HLA-A0202
157	TIKSIPELA	0.326	1469		Sequence	HLA-A0202
156	NTIKSIPEL	0.304	1961		Sequence	HLA-A0202
43	FSLYKVKGV	0.291	2152		Sequence	HLA-A0202
139	ETAFISVET	0.274	2582		Sequence	HLA-A0202

Legenda: (**verde**) regiões com interação forte; (**vermelho**) regiões com interação fraca.
 Limiar para ligante forte: 50 nM. Limiar para ligante fraco: 500 nM. Ligante fraco.
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

Figura 51 - Previsões geradas utilizando Redes Neurais Artificiais pelo programa NetMHC versão 3.2 com o alelo HLA-A0201, HLA-A0203 e HLA-A0250.

NetMHC version 3.2. 9mer predictions using Artificial Neural Networks. Allele HLA-A0201.
 Strong binder threshold 50 nM. Weak binder threshold score 500 nM
[Download output sheet](#)

pos	peptide	logscore	affinity(nM)	Bind Level	Protein Name	Allele
4	IISLLCAV	0.728	18	SB	Sequence	HLA-A0201
25	HLIATFFRL	0.684	30	SB	Sequence	HLA-A0201
83	FMASVMVKT	0.684	30	SB	Sequence	HLA-A0201
7	SLLCAVAQA	0.624	58	WB	Sequence	HLA-A0201
0	MLKFIIISL	0.622	59	WB	Sequence	HLA-A0201
79	SAQEFMASV	0.584	89	WB	Sequence	HLA-A0201
87	VMVKTYEEV	0.574	99	WB	Sequence	HLA-A0201

NetMHC version 3.2. 9mer predictions using Artificial Neural Networks. Allele HLA-A0203.
 Strong binder threshold 50 nM. Weak binder threshold score 500 nM
[Download output sheet](#)

pos	peptide	logscore	affinity(nM)	Bind Level	Protein Name	Allele
83	FMASVMVKT	0.806	8	SB	Sequence	HLA-A0203
0	MLKFIIISL	0.785	10	SB	Sequence	HLA-A0203
7	SLLCAVAQA	0.749	15	SB	Sequence	HLA-A0203
87	VMVKTYEEV	0.730	18	SB	Sequence	HLA-A0203
4	IISLLCAV	0.660	39	SB	Sequence	HLA-A0203
25	HLIATFFRL	0.636	51	WB	Sequence	HLA-A0203
79	SAQEFMASV	0.632	53	WB	Sequence	HLA-A0203

NetMHC version 3.2. 9mer predictions using Artificial Neural Networks. Allele HLA-A0250.
 Strong binder threshold 50 nM. Weak binder threshold score 500 nM
[Download output sheet](#)

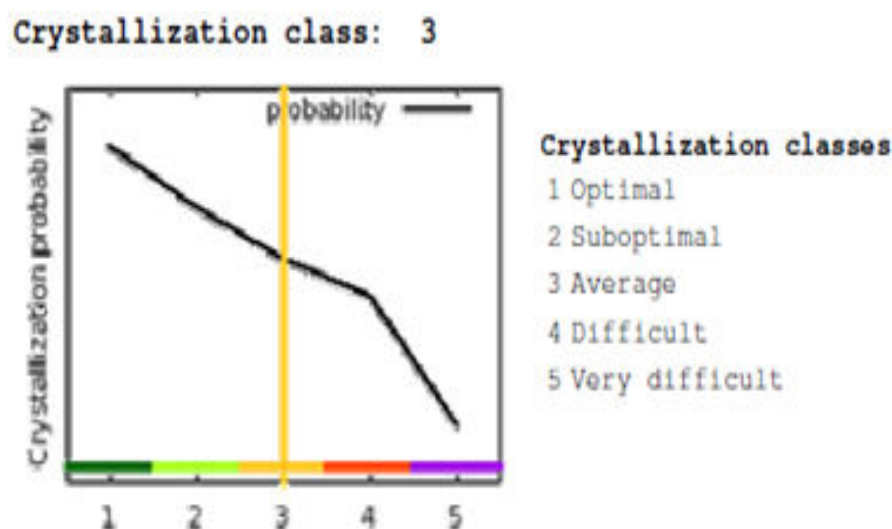
pos	peptide	logscore	affinity(nM)	Bind Level	Protein Name	Allele
87	VMVKTYEEV	0.882	3	SB	Sequence	HLA-A0250
0	MLKFIIISL	0.863	4	SB	Sequence	HLA-A0250
4	IISLLCAV	0.859	4	SB	Sequence	HLA-A0250
25	HLIATFFRL	0.836	5	SB	Sequence	HLA-A0250
7	SLLCAVAQA	0.817	7	SB	Sequence	HLA-A0250
83	FMASVMVKT	0.732	18	SB	Sequence	HLA-A0250
19	ELIGSGHLI	0.718	21	SB	Sequence	HLA-A0250
79	SAQEFMASV	0.694	27	SB	Sequence	HLA-A0250

Apresenta diversas regiões de interação forte de regiões da proteína antiviral com os bancos de MHC analisados.
 FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5.2.7 Probabilidade de cristalização da proteína

A análise gerada pelo programa XtalPred permitiu classificar a sequência da proteína antiviral em 3 (Average), o que significa dificuldade média em ser cristalizada de acordo com parâmetros calculados (**Figura 52**).

Figura 52 - Classificação de cristalização da proteína antiviral.



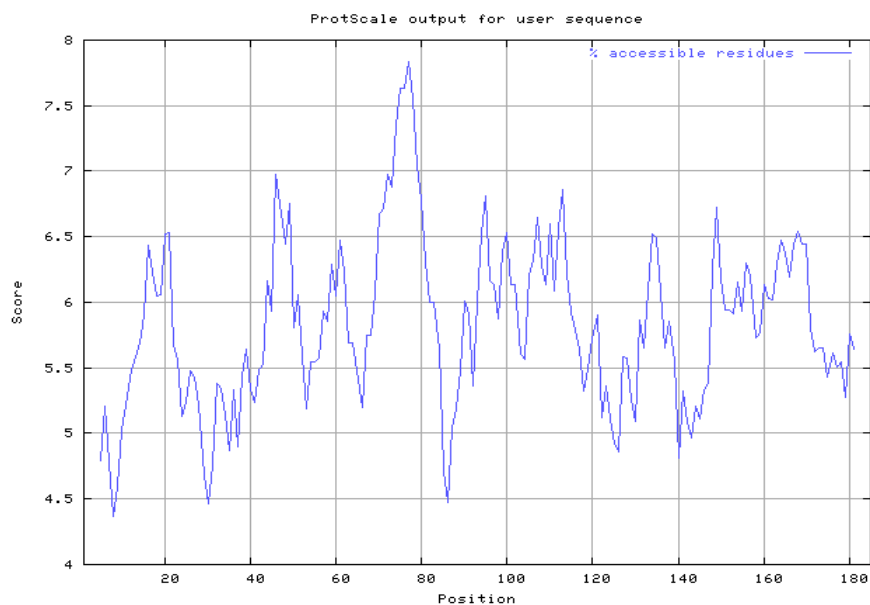
A proteína antiviral apresentou classificação 3, o que significa dificuldade média, de acordo com parâmetros calculados.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5.2.8 Gráfico de acessibilidade e gráfico de *buried* (interiorização)

A análise destes resultados (**Figura 53**) nos permite inferir que a mesma região de possível antigenicidade (aminoácidos 70 a 110) também possui alta acessibilidade, ou seja, são provavelmente resíduos que ficam na superfície da proteína, uma vez que são observados os maiores picos nesta região.

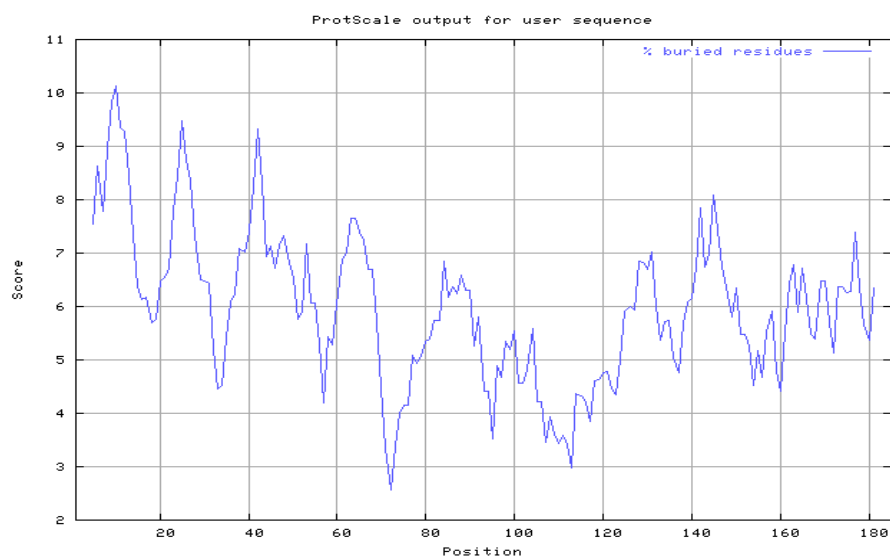
Figura 53 - Gráfico de acessibilidade demonstrando as possíveis regiões protéicas de maior acessibilidade.



FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

A análise do gráfico apresentado na **Figura 54**, demonstra que, a região compreendida entre os aminoácidos 70 e 110 é a que possui menor probabilidade de estar no interior da proteína, uma vez que são observados os menores picos nesta região.

Figura 54 - Gráfico de interiorização demonstrando as possíveis regiões protéicas de maior probabilidade de serem interiorizadas.

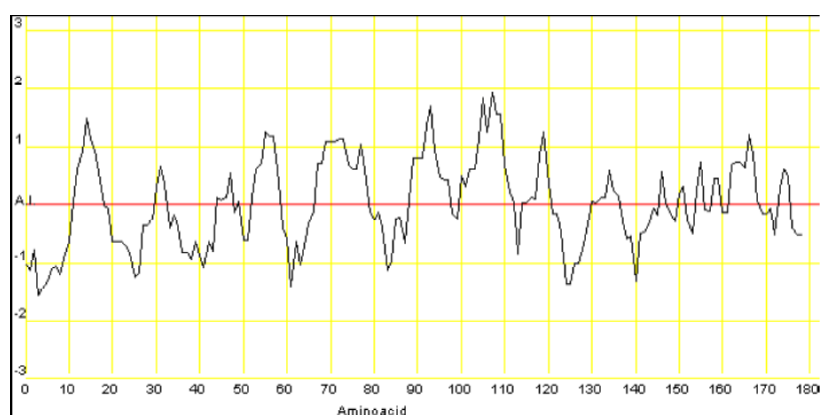


FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

5.5.2.9 Determinação da região de atividade antigênica

A análise de propriedades físico-químicas da proteína através do programa (JaMBW) permitiu montar um gráfico de antigenicidade (**Figura 55**). Na análise deste gráfico pode ser observada uma concentração de picos altos entre as regiões dos aminoácidos 70 a 110, o que nos permite inferir que a região antigênica estaria localizada entre os aminoácidos 70 e 110.

Figura 55 - Gráfico de antigenicidade.



Altos picos localizados entre os aminoácidos 70 e 110 sendo, portanto, considerada uma região de possível atividade antigênica.

FONTE: Carmo, A. C. V., 2012.

6 CONCLUSÕES

O sistema baculovírus/célula de inseto é eficaz para expressar a proteína antiviral obtida da hemolinfa da *Lonomia obliqua*.

A presença da partícula viral (bacmídeo), bem como da proteína recombinante foi identificada por diferentes técnicas: microscopia eletrônica, eletroforese em gel de agarose do DNA viral, efeito no crescimento celular e por titulação viral, western blott utilizando para isso, anticorpo anti-histidina.

A proteína antiviral recombinante obtida (rAVLO) manteve a atividade da proteína nativa, sendo capaz de bloquear a replicação de diferentes cepas virais, em especial a do Herpes (em 1.000.000 vezes).

Indiretamente também foi possível inferir a atividade da proteína, baseando-se no efeito desta na replicação viral. Por esse motivo, a infecção das células com diferentes multiplicidades de infecção de vírus não apresentou o efeito esperado.

Estudos de bioinformática da proteína sugerem que esta proteína é globular, secretável, com o sítio de clivagem da proteína estaria entre os aminoácidos 16 e 17.

Os estudos nos permite também inferir que esta proteína antiviral possui a capacidade de ligação a MHC de classe I. Foi verificado que existem vários sítios na proteína de ligação forte e fraca com diversos bancos de HLA.

As análises de bioinformática demonstram também uma grande presença de α -hélices na região N-terminal e nos permitiu classificar a proteína antiviral como sendo $\alpha \beta$, uma vez que foi verificada a presença de mais de 30% de α -hélices e mais de 20% de folhas β encontradas separadamente ao longo da cadeia protéica.

Na análise de BLAST da sequência de cDNA da proteína antiviral, nenhuma sequência com similaridade no Genbank foi encontrada.

Pode ser inferido pelas análises que a região de possível antigenicidade estaria entre os aminoácidos 70 a 110, e com alta acessibilidade, ou seja, são provavelmente resíduos que ficam na superfície da proteína.

REFERÊNCIAS

- ARANTES, M. K. **Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células Sf9/baculovírus recombinante para a produção de Canacistatina**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- AYRES, M. D. et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virol.**, v. 202, p. 586-605, 1994.
- BARBER, G. N.; CLEGG, J. C. S.; LLOYD, G. Expression of the lassa virus nucleocapsid protein in insect cells infected with a recombinant baculovirus - application to diagnostic assays for lassa virus-infection. **J. Virol.**, v. 71, p. 19-28, 1990.
- BATISTA, F. R. X. et al. Evaluation of concentrated milk whey as a supplement for Sf9 *Spodoptera frugiperda* cells in culture. **Electronic J. Biotechnol.**, v. 9, n.5, p.522-532, 2006.
- BELJELARSKAYA, S. N. Baculovirus Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in Insect and Mammalian Cells. **J. Mol. Biol.**, v. 45, n. 1, p. 123–138, 2011.
- BENDTSEN, J. D. et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, v. 340, n. 4, p.783-795, 2004.
- BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, v. 336, n.1, Dec 7, p.93-104, 1984.
- BIXBY-BROSI, A. J.; POTTER, D. A. Evaluating a Naturally Occurring Baculovirus for Extended Biological Control of the Black Cutworm (Lepidoptera: *Noctuidae*) in Golf Course Habitats. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, n. 5, p.1555-1563, 2010.
- BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 35, p. 127-155, 1990.
- BÖGLI, N. C.; RIES, C.; BAUER, I.; ADAMS, T.; GRELLER, G.; EIBL, R.; EIBL, D. Bag-based rapid and safe seed-train expansion method for *Trichoplusia ni* suspension cells. **BMC Proceed.**, v. 5, n. 8, p. 124, 2011.

BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH. **Protein Factories**. Disponível em: <[http://www.bti.cornell.edu/index.php?page= Technology Transfer & section=BTI-TN5B1](http://www.bti.cornell.edu/index.php?page=Technology%20Transfer%20§ion=BTI-TN5B1)>. Acesso em: 10 jan. 2012.

BRENNER, S.; HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 34, p. 103-110, 1959.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, n. 3, p. 283-291, 2005.

BUUS, S. et al. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 5, p.378-384, 2003.

CARMO, A. C. V. et al. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Res.**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.12.010>>. Acesso em: Dezembro, 2011.

CARMO, A. C. V. Expressão de proteína antiviral de *Lonomia obliqua* em sistema baculovírus/célula de inseto, 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

CARRIJO-CARVALHO, L. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview. **Toxicon.**, v. 49, n. 6, p. 741-757, 2007.

CARRINGTON, J. C. et al. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. **Embo. J.**, v. 8, n. 2, p. 365-370, 1989.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 10, p. 3391-3395, 1988.

CASTRO, M. E. B. D. et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, p.1733-1761, 1999.

CHA, H. J. et al. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochem. Eng. J.**, v. 24, n. 3, p. 225-233, 2005.

CHANY, C.; CERUTTI, I. Enhancement of antiviral protection against encephalomyocarditis virus by a combination of isoprinosine and interferon. **Arch. Virol.**, v. 55, n. 3, p. 225-231, 1977.

CHEN, L. C. L.; REID, S.; NIELSEN, L. K. Baculovirus virus kinetics in insect cell culture. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology**. MC Flickinger: John Wiley & Sons, 2010.

CHENG, T. et al. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, n. 11, p. 1612-1618, 2004.

CHERNYSH, S. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 20, p. 12628-12632, 2002.

COMMOY-CHEVALIER, M. J.; ROBERT-GALLIOT, B.; CHANY C. Effect of ammonium salts on the interferon-induced antiviral state in mouse L cells. **J. Gen. Virol.**, v. 41, n. 3, p. 541-547, 1978.

COTTER, S. C.; WILSON, K. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. **Hered.**, v. 88, n. 4, p. 229-234, 2002.

CUETO, A. P. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarréia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, 2011.

DELCROIX, M.; RILEY, L. W. Cell-Penetrating Peptides for Antiviral Drug Development. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 448-470, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DREXLER, J. F. et al. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold coronavirus in humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 9, p. 1398-1405, 2008.

DOSZTANYI, Z. et al. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3433-3434, 2005a.

DOSZTANYI, Z. et al. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 347, n. 4, p.827-839, 2005b.

DREES, B. **Fall Armyworm**. Disponível em: <<http://insects.tamu.edu/ffa/senior/taxalist3/bug109.html>>. Acesso em: 15 jan.2012.

DUARTE, A. C. et al. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. **J. Bras. Nefrol.**, v. 12, p. 184-187, 1990.

EMANUELSSON, O. et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **J. Mol. Biol.**, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microb. Cell Fact.**, v. 24, p. 8-17, 2009.

FIORE, A. E. et al. Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza. **MMWR Recomm. Rep.**, v. 60, n. 1, 2011.

FLORES, M. P. A. et al. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: Its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, n. 4, p. 1216–1223, 2006.

FOTONATURA.ORG. **Larva de *Trichoplusia ni***. Disponível em: <<http://www.fotonatura.org/galerias/fotos/199882/>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

FUHRMANN, M. et al. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. **Plant Mol. Biol.**, v. 55, n. 6, p. 869-881, 2004.

GARBUZYNSKIY, S. O.; FINKELSTEIN, A. V.; GALZITSKAYA, O. V. Outlining folding nuclei in globular proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 336, n. 2, p. 509-525, 2004.

GIORIA, V. V.; BECCARÍA, A. J.; CLAUS, J. D. Crecimiento, metabolismo y producción de baculovirus en cultivos en suspensión de una línea celular del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatalis*. **Quím.Viva**, v. 1, n. 5, p. 27-45, 2006.

GRANADOS, R.; LI, G.; BLISSARD, G. Insect cell culture and biotechnology. **Virol. Sinica**, v. 22, n. 2, p. 83-93, 2007.

GRECO, K. N. et al. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Res.**, v. 84, n. 1, p. 84-90, 2009.

GRONOWSKI, A. M. et al. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. **J. Virol.**, v. 73, n. 12, p. 9944-9951, 1999.

HAWTIN, R. E. et al. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, v. 238, n. 2, p. 243-253, 1997.

HAYAT, M. A.; MILLER, S. E. **Negative staining**. New York: McGraw Hill, 1990.

HEALTHCARE, G. E. **2-D. Electrophoresis: principles and methods**, 2004.

HEINEN, T. E.; VEIGA, A. B. G. Arthropod venoms and cancer. **Toxicon**, v. 57, p. 497–511, 2011.

HERNIOU, E. A. et al. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 48, p. 211-234, 2003.

HIRAKI, A. et al. Antiviral substance from silkworm faeces: purification and its chemical characterization. **Biol. Pharm. Bull.** v. 20, n. 5, p. 547-555, 1997.

HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. **Recent Pat. Biotechnol.**, v. 3, n. 1, p. 46-54, 2009.

HITCHMAN, R. B. et al. Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. **J. Invert. Pathol.**, v. 107, p. 49-58, 2011.

HOLZHUTTER, H. G.; FROMMEL, C.; KLOETZEL, P. M. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. **J. Mol. Biol.**, v. 286, n. 4, p. 1251-1265, 1999.

HOLZHUTTER, H. G.; KLOETZEL, P. M. A kinetic model of vertebrate 20S proteasome accounting for the generation of major proteolytic fragments from oligomeric peptide substrates. **Biophys. J.**, v. 79, n. 3, p. 1196-1205, 2000.

HONG, T.; BRAUNAGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 204, p. 210-222, 1994.

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 6, p. 3824-3828, 1981.

HORITA, S. et al. Isolation, cDNA cloning, and structure-based functional characterization of oryctin, a hemolymph protein from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, as a novel serine protease inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 39, p. 30150-30158, 2010.

HUANG, T.; MCDONALD, K. A. Molecular Farming Using Bioreactor-Based Plant Cell Suspension Cultures for Recombinant Protein Production. **Mol. Farm. Plants**, p.37-67, 2012.

HULTMARK, D. et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur. J. Biochem.**, v. 106, n. 1, p. 7-16, 1980.

INCEOGLU, A. B. et al. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest. Manag. Sci.**, v. 57, n. 10, p. 981-987, 2001.

INVITROGENTM. Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System - User Manual. In: INVITROGENTM. **An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant protein**, 2009, p.70.

JEHLE, J. A. et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, 2006.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opin. Biotechnol.**, v. 6, n. 5, p. 494-500, 1995.

KAO, R. Y. et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 600-605, 2010.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat. Protocols**, v. 4 n. 3, p. 363 - 371, 2009.

KITTS, P. A.; AYRES, M. D.; POSSEE, R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 19, p. 5667-5672, 1990.

KITTS, P. A.; POSSEE, R. D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. **Biotechniques**, v. 14, p. 810–817, 1993.

KLENK, H. Post-translational modifications in insect cells. **Cytotechnol.**, v. 20, n. 1-3, p. 139-144, 1996.

KLOETZEL, P. M.; OSSENDORP, F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p.76-81, 2004.

KNIPE, D. M. et al. In: **Field's Virology**. USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2007.

KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochim. Bioph. Acta**. v. 1550, n. 1, p. 70–80, 2001.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 5, p. 567-575, 2005.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 2-3, p.135-142, 2002.

KUYSTERMANS, D. et al. Using cell engineering and omic tools for the improvement of cell culture processes. **Cytotechnol.**, v. 53, n. 1-3, p. 3-22, 2007.

LAEMMLI, U. R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, S. Y. et al. Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 8, p. 1049-1052, 1995.

LEE, Y. J. et al. Structure and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, n. 1, p. 6-11, 1996.

LEE, Y. et al. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. **Biochem. Mol. Biol. Internat.**, v. 47, n. 3, p. 369-376, 1999.

LEE, D. et al. A Baculovirus Superinfection System: Efficient Vehicle for Gene Transfer into *Drosophila* S2 Cells. **Virology**, v. 74, n. 24, p. 11873–11880, 2000.

LEVITT, M.; CHOTHIA, C. Structural patterns in globular proteins. **Nature**, v. 261, n. 5561, p. 552-558, 1976.

LIANG, C. et al. Group I but not Group II NPV induces antiviral effects in mammalian cells. **Sci. China C. Life Sci.**, v. 49, n. 5, p. 467-472, 2006.

LIMA, A. A. **Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LLOYD, D. R. et al. Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. **Cytotechnology**, v. 34, p. 59, 2000.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: LOHNER, K. **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. England: Horizon Scientific Press, 2001.

LORINI, L. M.; CORSEUIL, E. Aspectos morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 30, n. 3, p. 373-378, 2001.

LUCKOW, V. A. et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. Virology**, v. 67, n. 8, p. 4566-4579, 1993.

LUNDEGAARD, C. et al. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p.509-512, 2008.

MAGALHÃES, P. S. C.; BÖHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. **Rev. Med. UCPEL**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2004.

MALIK, Z. A.; AMIR, S. An Apolipoprotein III Protein from the Hemolymph of Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 165, n. 7-8, p.1779-1788, 2011.

MARANGA, L. et al. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, n. 1, p. 58-63, 2003.

MAREK, M. et al. Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals. **Biotechnol Bioeng.**, v. 108, n. 5, p. 1056-1067, 2011.

MARTIN, D. R.; FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 699-723, 1997.

MAŠEK, J. et al. Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. **J. Control Release**, v. 151, n. 2, p.193-201, 2011.

MCCARTHY, C. B.; ROMANOWSKI, V. A simplified method for the extraction of baculoviral DNA for PCR analysis: a practical application. **J. Virol. Methods**. v. 148, p. 286–290, 2008.

MENDONÇA, R. Z. et al. Study of kinetic parameters for the production of recombinant rabies virus glycoprotein. **Cytotechnol.**, v. 60, n. 1-3, p. 143-151, 2009.

MORAES, R.H.P. Lagartas urticantes. **Biológico**, v. 59, n. 2, p. 21-25, 1997.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Editora Roca, 2007.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MYSTERY RAYS. **Invertebrate memory, or wishful thinking?** Disponível em: <<http://www.iayork.com/MysteryRays/2007/10/25/invertebrate-memory-or-wishful-thinking/>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

NETTLESHIP, J. E.; ASSENBERG, R.; DIPROSE, J. M.; RAHMAN-HUQ, N.; OWENS, R. J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. **J. Struct. Biol.**, v. 172, n. 1, p. 55-65, 2010.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Eng.**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1997.

NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In: PROCEEDINGS OF THE SIXTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY. AAAI Press California, 1998, p. 122-130.

NIELSEN, M. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. **Protein Sci.**, v. 12, n. 5, p.1007-1017, 2003.

NIELSEN, M. et al. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. **PLoS One**, v. 2, n. 8, p. 796, 2007.

NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. **BMC Bioinform.**, v. 8, p. 238, 2007.

NORDER, H. et al. Picornavirus non-structural proteins as targets for new anti-virals with broad activity. **Antiviral Res.**, v. 89, p. 204–218, 2011.

OKANO, K. et al. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 77-87, 2006.

OLICARD, C. et al. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Antiviral Res.**, v. 66, n. 2-3, p. 147-152, 2005.

OURTH, D. D. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 in vitro by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 320, n. 1, p. 190-196, 2004.

PAN, J. et al. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. **Antiviral Res.**, v. 48, n. 1, p. 39-47, 2000.

PAUL, A. et al. A nanobiohybrid complex of recombinant baculovirus and Tat/DNA nanoparticles for delivery of Ang-1 transgene in myocardial infarction therapy. **Biomaterials**, p. 1-15, 2011.

PENNOCK, G. D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 3, p. 399-406, 1984.

POPHAM, H. J. et al. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 85, n. 8, p. 2255-2561, 2004.

PUSHKO, P. et al. Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. **Vaccine**, v. 28, n. 30, p. 4771-4776, 2010.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Epidemiol.**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REIS, C. V. et al. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure–function insights. **Biochem. J.**, v. 398, p. 295–302, 2006.

REIS, C. V. et al. A Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom (Lopap): Biochemical Characterization Original Research Article. **Thromb. Res.**, v. 102, n. 5, p. 427-436, 2001.

REYES-RUIZ, J. M.; BARRERA-SALDAÑA, H. A. Proteins in a DNA world: expression systems for their study. **Rev. Invest. Clin.**, v. 58, n. 1, p. 47 - 55, 2006.

RIVERA-GONZALEZ, G. C. et al. Baculoviruses as gene therapy vectors for human prostate cancer. **J. Invert. Pathol.**, v. 107, p. 59-70, 2011.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. **Microb. Cell Fact.**, v. 8, p. 41, 2009.

ROST, B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. **Methods Enzymol.**, v. 266, p. 525-539, 1996.

ROST, B.; YACHDAV, G.; LIU, J. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research Methods Enzymol.*, v. 266, p. 525-539, 2004.

SAFDAR, A.; FIDSA, F.; COX, M. M. Baculovirus-expressed influenza vaccine. *Exp. Op. Invest. Drugs*, v. 16, n. 7, p. 927-934, 2007.

SCHMITT, J.; HESS, H.; STUNNENBERG, H. G. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Reports*, v. 18, n. 3, p. 223-230, 1993.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 65, n. 4, 363-372, 2004.

SCHNEIDER, E. H.; SEIFERT, R. Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.*, v.128, n. 3, p. 387-418, 2010.

SRIDHAR, P. et al. Baculovirus mediated expression of heterologous genes in insect cells. *J. Biosciences*, v. 19, p. 603-614, 1994.

SLABINSKI, L. et al. The challenge of protein structure determination--lessons from structural genomics. *Protein Sci.*, v. 16, n. 11, p. 2472-2482, 2007a.

SLABINSKI, L.; JAROSZEWSKI, L.; RYCHLEWSKI, L.; WILSON, I. A.; LESLEY, S. A.; GODZIK, A. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinform.*, v. 23, n. 24, p. 3403-3405, 2007b.

SMITH, G. E.; FRASER, M. J.; SUMMERS, M. D. Molecular Engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J. Virol.*, v. 46, n. 2, p. 584-593, 1983.

SMITH, G. E. et al. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 82, n. 24, p. 8404-8408, 1985.

SOUZA, A. P. B. et al. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol. Prog.*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 2005.

SZEWCZYK, B. et al. Baculovirus biopesticides - a safe alternative to chemical protection of plants. *J. Biopestic.*, v. 2, n. 2, p. 209-216, 2009.

TAMI, C. et al. Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces. **Vaccine**, v. 23, n. 6, p. 840–845, 2004.

TONIOLO, A. et al. Induction of diabetes by cumulative environmental insults from viruses and chemicals. **Nature**, v. 288, p. 383 - 385, 1980.

TROWITZSCH, S. et al. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. **J. Struc. Biol.**, v. 172, p. 45–54, 2010.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. **Baculovirus Expression Services**. Disponível em: <<http://www.bioc.cam.ac.uk/baculovirus/info/Baculovirusssystem.php>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

VAN OERS, M. M. Baculoviruses in Human and Veterinary Medicine: Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. **J. Invert. Pathol.**, v. 107, p 3-15, 2011.

VEIGA, A. B. G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J. A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1343-1351, 2001.

VEIGA, A. B. et al. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. **Gene**, v. 355, p. 11-27, 2005.

VIARURAL, AGRO E CONSTRUÇÃO. ***Anticarsia gemmatalis*/Lagarta da soja**. Disponível em: <<http://br.viarural.com/agricultura/plagas/insetos/anticarsia-gemmatalis-01.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

VIEIRA, H. L. et al. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. **Cytotechnol.**, v. 62, n. 6, p. 547-555, 2010.

WANG, H., NG, T. B.; Isolation of cicadin, a novel and potent antifungal peptide from dried juvenile cicadas. **Peptides**, v. 23, n. 1, p. 7–11, 2002.

WECK, P. K. et al. Antiviral activity of bacteria-derived human alpha interferons against encephalomyocarditis virus infection of mice. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 2, p. 660-665, 1982.

WEBER, W. et al. Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. **Cytotechnol.**, v. 38, n. 1-3, p. 77-85, 2002.

WESTWOOD, J. A.; JONES, I. M.; BISHOP, D. H. Analyses of alternative poly(A) signals for use in baculovirus expression vectors. **Virology**, v. 195, n. 1, p. 90-99, 1993.

WITWER, C. et al. Conserved RNA secondary structures in *Picornaviridae* genomes. **Nucl. Acids Res.**, v. 29, n. 24, p. 5079-5089, 2001.

WOLFF, J. L. C. et al. Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **J. Invert. Pathol.**, v. 79, p. 137-145, 2002.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat. Biotech.**, v. 22, n. 11, 2004.

YANG, S.; MILLER, L. K. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. **Virology**, v. 248, n. 1, p. 131-138, 1998.

YAO, H.; WU, X.; GOKULAMMA, K. Antiviral activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. **J. Zhejiang Univ. Science**, v. 7, p. 350-356, 2006.

YOON, J. W.; RAY, U. R. Perspectives on the role of viruses in insulin-dependent diabetes. **Diabetes Care**, v. 8, n. 1, p. 39-44, 1985.

XTALPRED SERVER. Disponível em: <<http://ffas.burnham.org/XtalPred/help.html# 3>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

ZHANG, J. et al. Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cell (Bm5) suspension culture. **Biotechnol. Prog.**, v. 10, n. 6, p. 636-643, 1994.

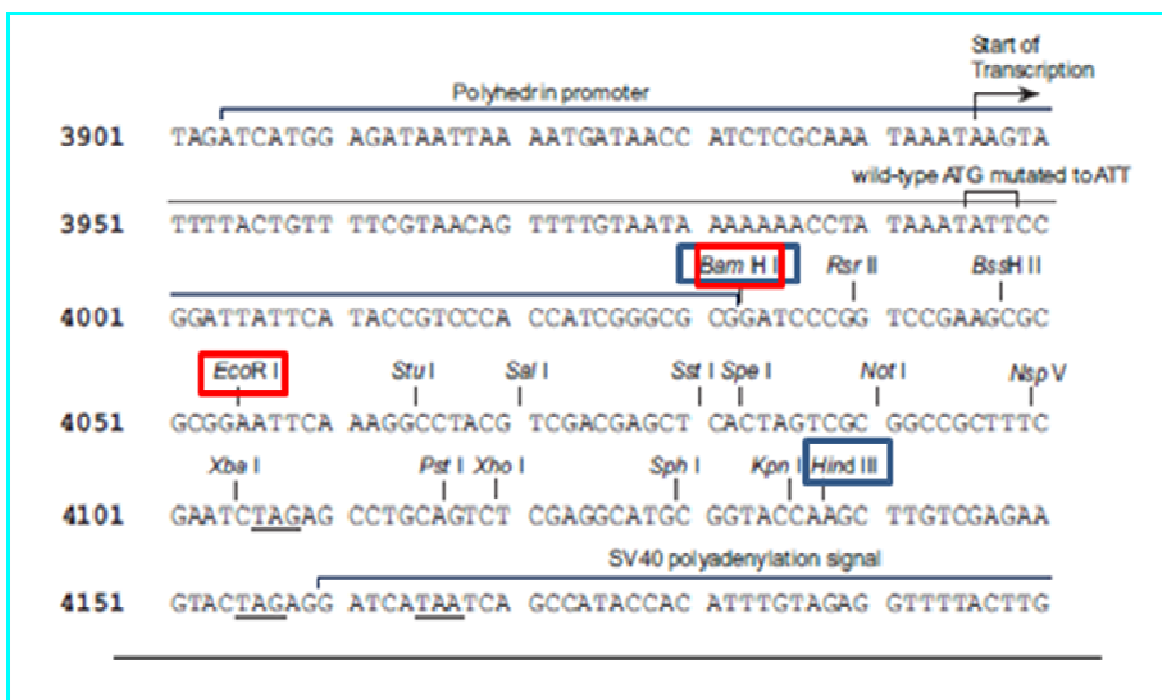
ZHANG, Q. et al. Universal primers for HBV genome DNA amplification across subtypes: a case study for designing more effective viral primers. **Viol. J.**, v. 31, n. 4, p.119, 2007.

ZHANG, R. et al. Apoptosis Induced by Actinomycin D in *Spodoptera litura* Cells and the Effect of Two Insect Hemolymph on Apoptosis. **Bioinform. Biomed. Engineer.**, p. 1-4, 2011.

ZWART, M. P. et al. Mixed-genotype infections of *Trichoplusia ni* larvae with *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus: Speed of action and persistence of a recombinant in serial passage. **Biol. Control**, v. 52, n. 1, p. 77–83, 2010.

APÊNDICE A – Sítio de múltipla clonagem do vetor pFastBacTM1.

Figura 56 - Sequência da região de múltipla clonagem do vetor de expressão pFastBacTM1.

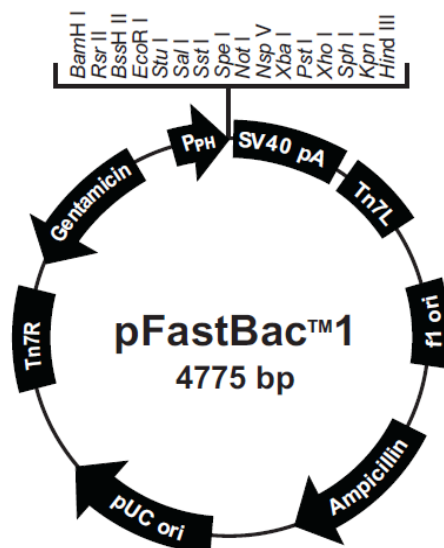


Destaque para os sítios das enzimas utilizadas nas clonagens: BamHI/EcoRI (em vermelho, para P5) e BamHI/HindIII (em azul para P1).

FONTE: Protocolo *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*, 2004 (Invitrogen).

APÊNDICE B - Mapa do vetor doador pFastBac™1

Figura 57 - Mapa com a descrição do vetor doador pFastBac™1.



Origem f1: bases 2-457

Gene de resistência a ampicilina: bases 589-1449

Origem pUC: bases 1594-2267

Tn7R: bases 2511-2735

Gene de resistência a gentamicina: bases 2802-3335 (fita complementar)

Promotor da poliedrina (P_{PH}): bases: 3904-4032

Sítio de múltipla clonagem: bases 4037-4142

Sinal de poliadenilação SV40: bases 4160-4400

Tn7L: bases 4429-4594

FONTE: Manual *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*, 2004, Invitrogen.

APÊNDICE C - Código de abreviatura dos aminoácidos.

Código de 3 letras	Código de 1 letra	Aminoácido
ALA	A	Alanina
ARG	R	Arginina
ASN	N	Asparagina
ASP	D	Ácido aspártico
CYS	C	Cisteína
GLN	Q	Glutamina
GLU	E	Ácido glutâmico
GLY	G	Glicina
HIS	H	Histidina
ISO	I	Isoleucina
LEU	L	Leucina
LYS	K	Lisina
MET	M	Metionina
PHE	F	Fenilalanina
PRO	P	Prolina
SER	S	Serina
THR	T	Treonina
TRP	W	Triptofano
TYR	Y	Tirosina
VAL	V	Valina

ANEXO - Artigo apresentado na íntegra

ARTICLE IN PRESS

Antiviral Research xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system

A.C.V. Carmo^{a,b,d}, D.N.S. Giovanni^{b,d}, T.P. Corrêa^a, L.M. Martins^d, R.C. Stocco^b, C.A.T. Suazo^a, R.H.P. Moraes^d, A.B.G. Veiga^c, R.Z. Mendonça^{d,*}

^aLaboratório de Tecnologia de Cultivo Celular, Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil

^bLaboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^cDepartamento de Ciências Básicas da Saúde, UFSCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

^dLaboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2011

Revised 17 November 2011

Accepted 13 December 2011

Available online xxx

Keywords:

Antiviral

Insect cells

Baculovirus

Antiviral protein

Hemolymph

Lonomia obliqua

ABSTRACT

The control of viral infections, mainly those caused by influenza viruses, is of great interest in Public Health. Several studies have shown the presence of active properties in the hemolymph of arthropods, some of which are of interest for the development of new pharmacological drugs. Recently, we have demonstrated the existence of a potent antiviral property in the hemolymph of *Lonomia obliqua* caterpillars. The aim of this study was to produce an antiviral protein in a baculovirus/Sf9 cell system. The resulting bacmid contains the sequence coding for the antiviral protein previously described by our group. Total RNA from *L. obliqua* caterpillars was extracted with Trizol and used in the reverse transcription assay with oligo(d)T primer followed by polymerase chain reactions (RT-PCR) with specific primers for the cDNA coding for the antiviral protein, based on the sequence deposited in the GenBank database. Restriction sites were inserted in the cDNA for ligation in the donor plasmid pFastBac1™. The recombinant plasmid was selected in *Escherichia coli* DH5α and subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac for the construction of the recombinant bacmid. This bacmid was used for the expression of the antiviral protein in the baculovirus/Sf9 cell system. After identifying the protein by western blot, activity tests were performed, showing that the purified recombinant protein was able to significantly reduce viral replication (about 4 logs). Studies on the optimization of the expression system for the production of this antiviral protein in insect cells are in progress.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first licensed human therapeutic protein using the recombinant DNA technology was insulin, produced in 1982 on a large scale in *Escherichia coli*. However, due to the impossibility to express complex proteins with post-translational modifications in bacteria, animal cells have become a more attractive alternative for industrial purposes (Butler, 2005). Animal cell cultures were developed in the last decade of the 19th century with the first attempts to hold pieces of fabric in plasma or biological fluids for several days or weeks. Since then, Technology of Animal Cell Cultures has achieved great progress, and is currently one of the most successful tools in biotechnology (Kretzmer, 2002).

Animal cell cultures require a complex medium, often supplemented with expensive bovine serum which provides essential proteins, such as growth factors, that have to be removed during downstream processing (Reyes-Ruiz and Barrera-Saldana, 2006). An attractive alternative is the use of the expression in the baculovirus/insect cell system described by Smith et al. (1983). This system is widely used as a tool for the production of recombinant proteins that require complex post-translational modifications (Carpentier et al., 2001). Glycosylation, which is the addition of carbohydrates (glycans) to proteins synthesized by animal cells, is one of the examples of post-translational modification. The parameters of cell culture – such as nutrients, oxygen, toxic metabolites, concentration, pH and temperature – may have significant effects on the glycan structure distribution in recombinant proteins, and therefore require efficient control (Butler, 2005).

Several proteins are also targets of the biotechnology industry due to their large commercial interest. In this context, the caterpillar *Lonomia obliqua* gained great prominence in biotechnology in Brazil, owing to the active properties identified in its venom and in its hemolymph (Veiga et al., 2005), which can interfere in blood

* Corresponding author. Address: Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3726 7222x2281; fax: +55 11 3726 1505.

E-mail addresses: zucattelli@uol.com.br, zucattelli@butantan.gov.br (R.Z. Mendonça).

0166-3542/\$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.010

Please cite this article in press as: Carmo, A.C.V., et al. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. *Antiviral Res.* (2012), doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.010

coagulation and fibrinolysis (Veiga et al., 2003), enhance cell growth (Maranga et al., 2003), act as anti-apoptotic agent (Souza et al., 2005) improve recombinant protein production (Mendonca et al., 2009, 2008; Vieira et al., 2010) and demonstrate antiviral effect (Greco et al., 2009).

The present study describes a system for the protein expression in Sf9/baculovirus cells using the recombinant DNA to obtain a protein from the *L. obliqua* caterpillar that displays a potent antiviral action (Greco et al., 2009). This protein is found in the hemolymph of *L. obliqua* caterpillars, and its encoding cDNA sequence is the basic element for the construction of the expression system. The large protein expression allows the analysis of its function and biochemical characterization. This is the preliminary description of the baculovirus/Sf9 cell system used for the expression of this antiviral protein from the hemolymph of *L. obliqua* caterpillar.

2. Materials and methods

2.1. Determination of protein and cDNA sequences and construction of the recombinant protein

2.1.1. Sequence determination and primer design

The design of primers specific for the amplification of the cDNA coding for the putative antiviral protein was based on the protein and cDNA sequences. For identification of the protein sequence, *L. obliqua* hemolymph was purified and the fraction containing the antiviral property was analyzed by SDS-PAGE; the N-terminal sequence of the antiviral protein was determined by MALDI-Q-ToF mass spectrometry (Wattenberg et al., 2002). In order to identify the cDNA coding for the protein of interest, the N-terminal sequence was analyzed against cDNA libraries of *L. obliqua* tegument and spicules (Veiga et al., 2005), using all possible translation frames of each cDNA. The sequence of the respective cDNA was used for primer design and further cDNA amplification by PCR. Restriction sites were also included in the primer sequence for further ligation in the plasmid pFastBac1™ (Invitrogen), as well as a His-tag sequence.

Antiviral response of the baculovirus has been reported in the literature (Gronowski et al., 1999) and the histidine tag can stimulate the immune system response (Masek et al., 2011). Therefore, we also amplified and cloned sequences of two other proteins (LOH-19-AY829833 and 8-LOH) that have molecular weights similar to the protein with the histidine sequence, to confirm that the protective effects observed in the results would be due to the action of the antiviral protein from *L. obliqua* (20-LOH-JN807330) and not a response of the immune system to the His-tag sequence (Masek et al., 2011; Veiga et al., 2005).

2.1.2. RNA extraction and RT-PCR

A *L. obliqua* caterpillar specimen was cross-sectioned in the middle, the extremities were cut off and RNA was extracted from the remaining portion with Trizol (Invitrogen) according to the Manufacturer's instructions. The RNA was stored at -80°C until use.

The first-strand cDNA was synthesized using Oligo(dT)₁₈ Primer (Fermentas) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen).

For amplification of the sequence of interest, PCRs consisting of 12.5 μl PCR Master Mix (Promega), 200 ng of cDNA and 10 μM of each specific primer were carried out in a thermocycler under the following reaction conditions: initial cycle at 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min and 30 s, a temperature gradient ranging from 45°C to 55°C for 1 min and 30 s, and 72°C for 1 min and 30 s; final extension at 72°C for 10 min.

Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.1.3. Cloning in pFastBac1

The pFastBac1™ donor vector (Invitrogen™) was used in a first cloning step. For cloning reactions, both the vector and the amplified cDNAs were digested with BamHI and HindIII restriction enzymes.

After overnight incubation at 16°C , the ligation reaction was employed in the transformation of *E. coli* DH5 α (Invitrogen™). Bacteria were grown on plates containing LB medium and ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Twenty colonies were selected for growth in liquid Luria-Bertani (LB) containing ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). For selection of colonies containing the recombinant donor plasmid, cultures were analyzed by PCR using the primers specific for the cDNA of the antiviral protein and other proteins. Agarose gel electrophoresis (1%) was performed to verify the amplified products.

To confirm that the insert was appropriately ligated into the cloning vector, clones screened by PCR and restriction enzyme digestion were also subjected to sequence analyses with primers Seq Forward pFastBac1™ (5'-AAATGATAACCATCTCGC-3') and Seq Reverse pFastBac1™ (5'-CAAGCAGTGATCAGATCCAGACAT-3'). The cycle sequencing reactions were performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (code 4337456, Applied Biosystems). Capillary electrophoresis and sequence analyses were performed in an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), using 36 cm capillaries loaded with the POP7 polymer. Sequences were analyzed in the Sequencing Analysis 5.3.1 software.

2.1.4. Recombinant bacmid

After the generation of the pFastBac1™ construct (with the cDNA of the antiviral protein and of the other proteins), the purified plasmid DNAs were transformed into DH10Bac™ *E. coli* for transposition into the bacmid. Identification of the colonies containing the recombinant bacmid was based on blue/white colony selection.

2.1.5. Isolation and analysis of the recombinant bacmid

Extraction of bacmids was performed according to the Manufacturer's protocol (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). To verify the presence of the gene of interest after transposition, PCRs with M13 primers were used. The obtained amplicons were further sequenced using the pFastBac1™ primers for confirmation of the presence of the gene of interest in the bacmid after transposition.

2.1.6. Transfection of insect cells

Transfection of insect cells with the recombinant bacmid was performed according to the Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen™). Sf9 cells in the log phase ($1.5\text{--}2.5 \times 10^6$ cells/ml, greater than 95% viability) were used in the experiment, using 500 ng of the recombinant baculovirus for transfection. Cell morphology was observed daily post infection for signs of viral infection. After 144 h, the supernatant was collected and considered as the first passage of the recombinant baculovirus.

To confirm the nucleotide sequence of the recombinant protein, a sample from a culture infected with a second pass was collected after 72 h. After extraction of DNA and RNA, PCR and RT-PCR were carried out respectively, as previously indicated.

DNA samples resulting from the PCR were subjected to nucleotide sequencing with the forward and reverse primers used for the amplification of the cDNAs.

The supernatant of all crops was collected daily for the determination of cell number, nutrient, titration of baculovirus and recombinant protein identification (data not shown). Western blot with anti-His antibody (GE Healthcare) and studies of cell morphology with photomicrographs were performed after each step.

2.2. Analytical procedures

2.2.1. L929 cell cultures

L929 cells were grown in plastic T-flasks or on multiwell plates using Leibovitz-15 (L15) medium containing 0.9 g L^{-1} of D-galactose, 0.3 g L^{-1} of L-glutamine and supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Viable cell counts were performed on Neubauer chambers using the Trypan blue (0.05%) exclusion method.

2.2.2. Determination of the virus infectious dose

In order to determine the amount of virus produced in cultures infected with the EMC virus that can be blocked by the antiviral recombinant protein (rAVLO), L929 was treated or not treated with 1% v/v of rAVLO, 1 h prior to culture infection. Then, cells were infected with the EMC virus at different dilutions (rates of 10). The microwell plates containing EMC-infected cells were then incubated at 37°C for 3 days as described by Griffiths and Thornton (1982). The titers of virus produced in infected cells (treated or not treated with rAVLO) were determined by monitoring the cytopathic effect (CPE) in an endpoint dilution assay and the results were expressed as the highest dilution of virus able to induce CPE in 50% of cells.

3. Results

The protein responsible for the antiviral effect of *L. obliqua* hemolymph was isolated and purified by gel filtration chromatography using a Superdex 75 column (Greco et al., 2009). Then, the semi-purified fraction containing the antiviral activity was applied onto an ion-exchange Resource-Q column. As previously demonstrated by our group (Greco et al., 2009), the antiviral protein purified by this procedure decreased the production of measles virus (from $3.3 \pm 1.25 \times 10^7$ to $2.1 \pm 1.5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml) by 157 times the production of poliovirus ($2.8 \pm 1.08 \times 10^9$ to $4.58 \pm 1.42 \times 10^7$ TCID₅₀/ml) by 61 times. These differences were significant at $p < 0.05$. The mass spectrometry was used to determine the N-terminal of the protein. Further, the N-terminal sequence was analyzed against previously constructed *L. obliqua* cDNA libraries (Veiga et al., 2005).

3.1. Generation of sequences of proteins of interest

RNA was extracted and the cDNA was generated as described in Section 2. The samples were analyzed on 1% agarose gels, in which a band of 587 bp was observed, confirming the amplification of the cDNA that codes for the antiviral protein (Fig. 1A). The sequences of the cDNA coding for the other proteins (LOH-19-AY829833,

663 pb, and 8-LOH, 963 pb) were also confirmed by agarose gel electrophoresis (Fig. 1B).

3.2. Cloning in pFastBac1™

The amplified cDNA coding for the antiviral protein was cloned in the pFASTBac1™ donor plasmid. As observed by agarose gel electrophoresis in Fig. 1A, the cloned cDNA had an expected size of 587 bp for the antiviral protein, 663 bp for LOH-19-AY829833 and 963 bp for 8-LOH (Fig. 1B).

E. coli DH5 α cells were transformed to the recombinant donor plasmid, plasmid-containing colonies were selected and the purified plasmid was subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac™ for the construction of the recombinant bacmids. These bacmids, containing the sequence of a protein with antiviral activity and other proteins, were further used for the expression of this protein in the baculovirus/Sf9 cells system (as shown below).

3.3. Generation of the recombinant bacmid

After bacterial transformation with the recombinant plasmids rAVLO-pFastBac1™, LOH-19-pFastBac1™ and 8-LOH-pFastBac1™, white and blue colonies were observed in the plates. White colonies were indicative that successful transposition occurred, while blue colonies indicated that the bacmid remained unchanged.

3.4. Confirmation of the recombinant bacmid

Colonies with recombinant bacmids were analyzed by PCR followed by 1% agarose gel electrophoresis, in which baculovirus transposition was confirmed by the appearance of DNA bands 2887 for antiviral protein (Fig. 2), 2963 for LOH-19 protein and 3263 for 8-LOH protein (data not shown).

3.5. Transfection of insect cells

The recombinant plasmids were selected in *E. coli* DH5 α and subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac for the construction of recombinant bacmids. These bacmids, containing the sequence of the protein with antiviral activity and other chosen proteins, were used for the expression of the proteins in a baculovirus/Sf9 cells system. Three passages of the recombinant virus were performed in Sf9 cell cultures so far. At the moment, titers of the baculovirus obtained in the different passages as well as the antiviral activity of the recombinant protein produced in this system were determined.

To eliminate the possibility that the observed effect is due to characteristics of the construct other than the antiviral activity

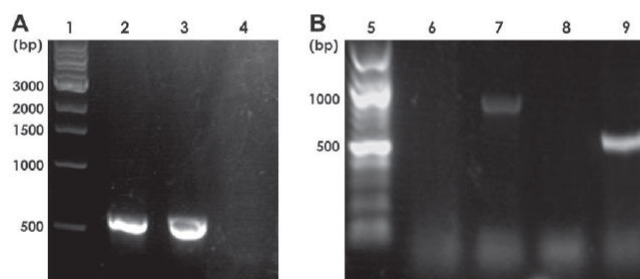


Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis (1%) confirming amplification of the cDNA that codes for the antiviral protein (line 2 and 3). (B) Agarose gel electrophoresis (1%) confirming amplification of the cDNA that codes for other proteins (line 7 for 8-LOH and line 9 for LOH-19-AY829833), M: molecular marker (1 kb Ladder, New England Biolabs).

Please cite this article in press as: Carmo, A.C.V., et al. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. Antiviral Res. (2012), doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.010

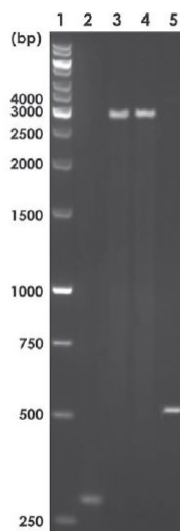


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis (1%) confirming baculovirus transposition with amplification of the respective products. (Line 1 M: molecular marker (1 kb Ladder, New England Biolabs), line 2 baculovirus without transposition, line 3 and 4 rAVLO 2300 bp + 591 bp protein = 2891 bp and line 5 amplification of sequence of rAVLO with amplification primers.)

itself, we used the same approach and procedures to construct recombinant bacmids expressing other *L. obliqua* proteins, namely LOH-19 and 8-LOH (Veiga et al., 2005). These two recombinant bacmids, as well as an empty bacmid were used to treat Sf-9 cells infected with a picornavirus. The results showed that the empty bacmid or those expressing the other recombinant proteins were not effective in inhibiting the replication of EMC virus, presenting results similar to those of the control of infected cells and of the untreated cells. On the other hand, when infected cultures were treated with the recombinant antiviral, there was a reduction of about 3 logs in the viral titers in comparison to that of controls. Therefore, when the purified antiviral protein was used, the reduction in virus produced was around 4 logs, showing that the recombinant antiviral protein remained fully active (Table 1). We are currently testing the effect of the antiviral purified recombinant protein on enveloped viruses (measles, rubella and herpes simplex). Preliminary data have shown that the purified recombinant protein is able to reduce by at least 4 logs the replication of the rubella virus and by about 6 logs the replication of the herpes simplex virus (data not shown).

To facilitate purification, a His-tag sequence was included in the C-terminal region of the proteins rAVLO, LOH-19-AY829833 and 8-LOH. The protein was separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Sambrook and Russell, 2001). After transfer, the membrane was marked with the anti-histidine antibody to confirm the presence of the protein. The result is shown in Fig. 3. As can be seen, there was the presence of a band with strong labeling with the antibody, demonstrating the expression of the antiviral protein.

4. Discussion

Viral diseases affect hundreds of millions of people worldwide every year. Even though some antiviral drugs are under clinical

Table 1

Production of the picornavirus (EMC), in L929 cell cultures treated or not treated with whole hemolymph (1%), whole or purified antiviral recombinant protein (rAVLO) or other baculovirus recombinant protein (Rec 8-LOH). The cells were treated 1 h before infection. The virus titers are expressed as CCID₅₀/ml.

	Poliovirus titers 72 h after infection (TCID ₅₀ /ml)	Reduction
Control infected culture	$3.1 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	
Hb	$3.4 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^8^a$	91×
rAVLO (whole)	$2.9 \times 10^6 \pm 3.63 \times 10^{5a}$	1069×
rAVLO (purified)	$3.2 \times 10^5 \pm 3.56 \times 10^{4a}$	9687×
Rec 8-LOH	$4.3 \times 10^9 \pm 1.14 \times 10^9$	

CCID₅₀: cell culture infectious dose 50%.

The values represent the average of three experiments.

^a Indicates values at $p < 0.05$.



Fig. 3. Western blot of samples of a portion of AKTA (ion exchange) showing the presence of the antiviral protein. The proteins present in the nitrocellulose membrane were revealed with an antibody anti histidine. rAVLO: recombinant protein with antiviral activity, negative control and positive control.

trials, 50% of them are directed toward the treatment of HIV. Therefore, there is a need for the development of antiviral agents specific for emerging newly-recognized human pathogens (such as SARS coronavirus and influenza viruses H5N1 and H1N1) (Delcroix and Riley, 2011). Recently, various studies have reported the antiviral properties in products obtained from arthropods. Popham et al. (2004) have reported significant reduction in the titers of the baculovirus HzSNPV due to the action of an antiviral protein present in the hemolymph of *H. virescens* larvae. Chemysh et al. (2002) have isolated two peptides, alloferon 1 and 2, from the hemolymph of *Calliphora vicina*, which control viral infection when added before infection. Olicard et al. (2005) observed that the addition of the hemolymph of *Crassostrea gigas* to VERO cell cultures inhibits HSV-1. Extracts of crustacean tissues have also shown a broad spectrum antiviral activity against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses, probably through multiple inhibitors contained in the extracts (Pan et al., 2000). Hultmark et al. (1980) have reported some antimicrobial properties of a protein of 15 kDa isolated from *Hyalophora cecropia* caterpillars. Alloferon, a 12.65 kDa protein purified from the hemolymph of the fly *C. vicina*, effectively inhibited the reproduction of influenza A and B viruses by triggering intracellular responses when added before virus infection similar to the interferons of vertebrates (Chemysh et al., 2002). An antiviral peptide of 916 Da, isolated from *H. virescens* hemolymph, provided protection against virus infection (Ourth, 2004). Recently, our group has purified an antiviral protein of approximately 20 kDa from the hemolymph of *L. obliqua*; when added to cultures 1 h before infection, this protein was able to inhibit the replication of all viruses tested in the respective study (Greco et al., 2009).

In the present study, we cloned and expressed a recombinant antiviral protein of *L. obliqua* caterpillar, named rAVLO. Furthermore, our results confirmed that the recombinant protein displayed the antiviral effect observed in the native protein present in the hemolymph. As a matter of fact, the recombinant protein was able to inhibit the replication of picornavirus. It was also observed that the hemolymph did not display any virucidal effect,

suggesting that it may act on different stages of virus replication, similar to alloferon, or on the late stages of virus infection, as demonstrated by Popham et al. (2004) with a peptide extracted from *H. virescens*.

In this study, the antiviral activity of *L. obliqua* hemolymph against human viruses was determined *in vitro* and the protein was characterized by mass spectrometry. The protocols used for the amplification of the cDNA of the proteins and its cloning in pFastBac1™ were shown to be efficient. The obtained bacmids, containing the sequence of a protein with antiviral activity, were used for the expression of this protein in Sf9 cell cultures. As shown, rAVLO was able to block the replication of the encephalomyocarditis virus, a non-enveloped virus, indicating that rAVLO kept the antiviral activity of the native protein from the hemolymph. Based on these results, we propose that a protein present in the hemolymph of the caterpillar *L. obliqua* displays the antiviral activity and plays a putative role in insect immunity. Studies on the activity of the recombinant protein with enveloped virus (rubella virus, herpes simplex virus and measles virus) were performed. In this case, the virus replication was inhibited by about 4 logs for the rubella virus and about 6 logs for the herpes simplex virus (data not shown).

The production of this protein is being optimizing both in Sf9 and in UFLAG insect cells; we are also determining the stability of rAVLO, as well as defining the effective dose of the protein.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of FAPESP (2008/57263-5) and CAPES.

References

- Butler, M., 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 283–291.
- Carpentier, E., Lebesgue, D., Kamen, A.A., Hogue, M., Bouvier, M., Durocher, Y., 2001. Increased production of active human beta(2)-adrenergic/G(alphas) fusion receptor in Sf-9 cells using nutrient limiting conditions. *Protein Expr. Purif.* 23, 66–74.
- Chernysh, S., Kim, S.I., Bekker, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G., Bulet, P., 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 12628–12632.
- Delcroix, M., Riley, L.W., 2011. Cell-penetrating peptides for antiviral drug development. *Pharmaceuticals* 3, 448–470.
- Greco, K.N., Mendonca, R.M., Moraes, R.H., Mancini, D.A., Mendonca, R.Z., 2009. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Antiviral Res.* 84, 84–90.
- Griffiths, B., Thornton, B., 1982. Use of microcarrier culture for the production of herpes simplex virus (type 2) in MRC-5 cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32, 324–329.
- Gronowski, A.M., Hilbert, D.M., Sheehan, K.C., Garotta, G., Schreiber, R.D., 1999. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J. Virol.* 73, 9944–9951.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980. Insect immunity, purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106, 7–16.
- Kretzmer, G., 2002. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 135–142.
- Maranga, L., Mendonca, R.Z., Bengala, A., Peixoto, C.C., Moraes, R.H., Pereira, C.A., Carrondo, M.J., 2003. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. *Biotechnol. Prog.* 19, 58–63.
- Masek, J., Bartheldyova, E., Turanek-Knotigova, P., Skrabalova, M., Korvasova, Z., Plockova, J., Koudelka, S., Skodova, P., Kulich, P., Krupka, M., Zachova, K., Czernekova, L., Horynova, M., Kratochvilova, I., Miller, A.D., Zyka, D., Michalek, J., Vrbkova, J., Sebel, M., Ledvina, M., Raska, M., Turanek, J., 2011. Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *J. Control. Release* 151, 193–201.
- Mendonca, R.Z., Greco, K.N., Moraes, R.H., Astray, R.M., Barral, M., 2009. Study of kinetic parameters for the production of recombinant rabies virus glycoprotein. *Cytotechnology* 60, 143–151.
- Mendonca, R.Z., Greco, K.N., Sousa, A.P., Moraes, R.H., Astray, R.M., Pereira, C.A., 2008. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. *Cytotechnology* 57, 83–91.
- Ollcard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., Bourgoignon, N., 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.* 66, 147–152.
- Ourth, D.D., 2004. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 *in vitro* by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 190–196.
- Pan, J., Kurosky, A., Xu, B., Chopra, A.K., Coppenhaver, D.H., Singh, I.P., Baron, S., 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res.* 48, 39–47.
- Popham, H.J., Shelby, K.S., Brandt, S.L., Coudron, T.A., 2004. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 85, 2255–2261.
- Reyes-Ruiz, J.M., Barrera-Saldana, H.A., 2006. Proteins in a DNA world: expression systems for their study. *Rev. Invest. Clin.* 58, 47–55.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D., 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46, 584–593.
- Souza, A.P., Peixoto, C.C., Maranga, L., Carvalhal, A.V., Moraes, R.H., Mendonca, R.M., Pereira, C.A., Carrondo, M.J., Mendonca, R.Z., 2005. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol. Prog.* 21, 99–105.
- Veiga, A.B.G., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 111, 95–101.
- Veiga, A.B., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Francischetti, I.M., 2005. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene* 355, 11–27.
- Vieira, H.L., Pereira, A.C., Peixoto, C.C., Moraes, R.H., Alves, P.M., Mendonca, R.Z., 2010. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. *Cytotechnology* 62, 547–555.
- Wattenberg, A., Organ, A.J., Schneider, K., Tyldesley, R., Bordoli, R., Bateman, R.H., 2002. Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 772–783.