

KELLY BARRETO RODRIGUES

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DA CAPA DO CITRUS SUDDEN
DEATH-ASSOCIATED VIRUS UTILIZANDO SISTEMA DE BACULOVÍRUS E
PRODUÇÃO DE ANTICORPO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Co-orientador: Dr. Bergmann M. Ribeiro

**Brasília
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

R696e Rodrigues, Kelly Barreto.

Expressão de proteína recombinante da capa do citrus sudden death-associated virus utilizando sistema de baculovírus e produção de anticorpo / Kelly Barreto Rodrigues. – 2010.

74 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2010.
Orientação: Tatsuya Nagata

Co-orientação: Bergmann M. Ribeiro



Dissertação de autoria de Kelly Barreto Rodrigues, intitulada “EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DA CAPA DO CITRUS SUDDEN DEATH-ASSOCIATED VIRUS UTILIZANDO SISTEMA DE BACULOVÍRUS E PRODUÇÃO DE ANTICORPO”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 01 de março de 2010, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Orientador

Universidade Católica de Brasília – UCB

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Examinador externo

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Paula Andreia Silva

Examinadora interna

Universidade Católica de Brasília – UCB

Brasília
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida maravilhosa que me deu, permitindo que eu realizasse esse sonho há muito sonhado...

Aos meus amados pais José e Valdeci, por todo amor e carinho que sempre me deram, por me ensinarem a lutar pelo que quero e pelo apoio e dedicação incondicionais para que conseguisse realizar esse sonho.

Ao meu orientador Dr. Tatsuya Nagata, por ter aceitado correr o risco e ter me dado essa oportunidade, por ter confiado na minha capacidade e por todo o aprendizado. Muito obrigada por ter ajudado a transformar esse sonho em realidade! Agradeço muito a Deus por você ter sido o meu orientador.

Ao meu co-orientador Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por todas as vezes que se propôs a me ajudar durante esse trabalho e pelo aprendizado.

As minhas queridas amigas Fran, por tudo que me ensinou, pela paciência e ajuda incondicional, e Raquel, por fazer com que o trabalho na bancada se tornasse bem mais divertido. Vocês são especiais!!!

À querida Érica Caldas, por toda a ajuda nas disciplinas e por ter me aconselhado e me encorajado desde o começo. Muito obrigada todos os meus colegas de laboratório, que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

À minha amiga Bruna Caroline, que me recebeu de braços abertos na UnB e me ajudou, de forma solícita e paciente, sempre que precisei. Obrigada por sua amizade e dedicação!

A todo o pessoal do laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, especialmente a Maria, por ter se disposto a me ensinar tantas coisas, sem as quais eu não teria realizado esse sonho. Muito obrigada pela paciência e presteza! Agradeço a todos pela convivência harmoniosa e amigável: Juliana, Carol, Roberto, Daniel, Aline, Clara, Greice e Anabele.

Ao Dr. Jaime Santana, pela colaboração e a todos do laboratório de Patologia Molecular da UnB, por me ajudarem a vencer o maior desafio desse trabalho. Obrigada Isabel, Keila, Paula, Márcio, Tiago e a todos que de alguma forma contribuíram.

A minha querida avozinha Kika, pelas orações e pelo carinho. A toda minha família, em especial tia Cy e tio Adail, pelo meu 'cantinho' no rancho e por nunca se esquecerem de mim! Às minhas queridas irmãs, Thaíze e Franci, por me oferecerem seus ouvidos e ombros para eu descarregar minhas angústias e ter onde me apoiar. E ao meu querido irmão Gutim, pela compreensão e ajuda durante todos esses anos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, e à Fundecitrus pela parceria e apoio.

A todos que de alguma forma me ajudaram e que sempre torceram pela minha vitória!

“Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado. Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou. A outra, vendo seu amiguinho preso, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo, por fim, quebrá-lo e libertar o amigo. Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

-Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com as mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

-Eu sei como ele conseguiu.

Todos perguntaram: -Pode nos dizer como?

-É simples, respondeu o velho. -Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.”

Albert Einstein

“Se vi mais longe do que os outros, é porque estava apoiado nos ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Referência: RODRIGUES, Kelly. **Expressão de proteína recombinante da capa do Citrus Sudden Death-associated Virus utilizando sistema de baculovírus e produção de anticorpo**. 2010. 74 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

A morte súbita do citros (MSC) é uma doença que afeta laranjeiras doces (*Citrus sinensis*) e tangerineiras (*Citrus reticulata*) enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) e vem causando, desde sua detecção em 2001, grande prejuízo econômico nos estados brasileiros de Minas Gerais e São Paulo. Esses estados plantam cerca de 200 milhões de laranjeiras, principalmente para o processamento de suco de laranja. Até o momento, mais de 4 milhões de laranjeiras foram afetadas por essa doença e a maioria delas foi erradicada ou sofreu severo declínio. Não há nenhuma estratégia efetiva no controle dessa doença, visto que o período de incubação do vírus pode chegar a dois anos até o aparecimento dos sintomas. O agente etiológico dessa doença ainda não está confirmado, mas foi sugerida a associação de um novo vírus da família *Tymoviridae*, gênero *Marafivirus*, com a MSC, chamado Citrus sudden death-associated virus (CSDaV). O objetivo desse trabalho foi produzir um anticorpo capaz de detectar o vírus no início da infecção, e sua presença em plantas assintomáticas. Com este intuito, a proteína do capsídeo (CP) do vírus foi expressa usando o Sistema de Expressão em Baculovírus. O cDNA que codifica a capa protéica do vírus foi clonada no vetor de transferência pFastPH3, no cassete após o gene da poliedrina, para ser expressa como proteína de fusão e subclonada no genoma de um baculovírus (bacmídeo). O DNA do bacmídeo obtido foi utilizado para originar o baculovírus recombinante, denominado vAcCSDaV, e para a expressão da proteína heteróloga em células de insetos infectadas. A proteína recombinante foi analisada por SDS-PAGE e western blot com o anticorpo anti-HisTag, que detectou um polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa, correspondente à fusão da CP de CSDaV (22.5 kDa) com o gene da poliedrina (29 kDa). Camundongos foram imunizados com a proteína recombinante, que foi reconhecida pelos anti-soros produzidos. Os anti-soros serão testados por imuno-deteção pela Fundecitrus, utilizando o vírus semi-purificado ou extrato de plantas infectadas.

Palavras-chave: Citrus sudden death-associated virus. Baculovírus. Produção de anti-soro.

ABSTRACT

Citrus Sudden Death (CSD) is a disease that affects sweet oranges (*Citrus sinensis*) and mandarins (*Citrus reticulata*) grafted on Rangpur lime (*Citrus limonia*) and have been causing, since its detection in 2001, serious economic damage in Brazilian states of Minas Gerais and São Paulo. These states have approximately 200 million of orange trees, principally for orange juice processing. Until now, more than 4 million of orange trees were affected with the disease, and most of them were eradicated or had severe declined. There is no effective strategy for control the disease in the fields, since the incubation period of the virus may reach two years till appearance of symptoms. The etiologic agent of this disease is still unconfirmed, but it was suggested the association of a new virus of *Marafivirus* genus within *Tymoviridae* family, with citrus sudden death disease, named Citrus sudden death-associated virus (CSDaV). The objective of this work was to produce an antibody capable of detection of the virus in early period of infection, and its presence in asymptomatic trees. For this purpose, the coat protein of virus was expressed using the Baculovirus Expression System. The cDNA that encodes a CSDaV CP was cloned into the transfer vector pFastPH3, in the cassette posterior to the polyhedrin gene, to be expressed as fusion protein and subcloned to a baculovirus genome (bacmid). The recombinant bacmid DNA was used to obtain the recombinant baculovirus, named vAcCSDaV, and to the heterologous protein expression in virus-infected insect cells. The heterologous protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blot using an anti-HisTag antibody, which detected a polypeptide around 50 kDa, corresponding to the fusion of CSDaV CP (22,5 kDa) and polyhedrin gene (29 kDa). Mice were immunized with recombinant protein, that was recognized by the antiserum produced. The antiserum will be tested by immuno-detection by Fundecitrus, using the semi-purified virus or extracts of infected plants.

Keywords: Citrus sudden death-associated virus. Baculovirus. Production of antiserum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Vista aérea de plantios de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada em limoeiro ‘Cravo’, apresentando sintomas da morte súbita do citros, e de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada em tangerineira ‘Cleópatra’, sadias (A). Em (B) observa-se duas fileiras de plantio de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada em tangerineira ‘Cleópatra’, sem sintomas da doença, no meio de um plantio de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada em limoeiro ‘Cravo’, afetado pela doença (Fonte: Fundecitrus). 16
- Figura 2-** Laranjeiras com sintomas da morte súbita do citros mostrando perda de brilho generalizada e coloração verde-pálida das folhas, contrastando com a cor normal das plantas sadias (A) e folhas coletadas em plantas sadia e doente, mostrando o contraste da coloração (B) (Fonte: Fundecitrus). 17
- Figura 3-** Plantas sadia e apresentando desfolha parcial, um dos sintomas da morte súbita do citros (Fonte: Fundecitrus)..... 17
- Figura 4-** Detalhe do sistema radicular de planta com sintoma inicial de morte súbita do citros, apresentando grande quantidade de raízes mortas, normalmente com poucas radicelas (A) e detalhe da podridão que se inicia da ponta para a base da raiz (B) (Fonte: Fundecitrus). 18
- Figura 5-** Coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto limão ‘Cravo’, na região do floema funcional, contrastando com os tecidos brancos da casca da copa (A) . Em (B), comparação da cor amarelada do floema funcional entre plantas sadia e doente (Fonte: Fundecitrus). 18
- Figura 6-** Mapa da distribuição da morte súbita do citros em MG e SP. (Fonte: Jeus Junior et al., 2004b). 19
- Figura 7-** Subenxertia realizada em planta com seis anos de idade através da técnica do T invertido, utilizando dois cavalinhos (Fonte: Fundecitrus). 20
- Figura 8-** Microscopia eletrônica de CSDaV purificado de plantas infectadas com citros. T- partículas vazias (sem RNA); B- partículas contendo RNA viral. (Maccheroni et al., 2005). 23
- Figura 9-** Organização do genoma de CSDaV, mostrando as proteínas associadas à replicação (Mtr, Pro e Hel e Pol) e a extremidade 3’, que codifica a CP. 25
- Figura 10-** Ultraestrutura de um baculovírus por microscopia eletrônica de transmissão. Partículas virais de NPV oclusas em uma matriz protéica (poliedro). (Fonte: Dr. Bergmann Morais Ribeiro). 28

- Figura 11-** Mapa do vetor pFastBac1, com o esquema representativo do fragmento PH3 que foi inserido por PCR logo após o promotor da poliedrina (P_{PH}), dando origem ao vetor pFastPH3 (Costa, 2008), utilizado neste trabalho. 32
- Figura 12-** Representação esquemática do fragmento amplificado por PCR, contendo a sequência codificadora da enzima *Nco* I flanqueando a sequência de reconhecimento da protease fator Xa e a sequência da capa protéica do vírus. 35
- Figura 13-** Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 (Invitrogen), que possui os genes de resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina, além de um sítio de multiclonagem onde o gene de interesse foi inserido, entre os sítios da enzima de restrição *Eco* RI. 36
- Figura 14 –** Sistema Bac-to-Bac de Expressão. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contem o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse (1). Em seguida, o evento da transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização deste na transfecção de células de inseto (4). Com os vírus recombinantes obtidos pode ser feita a titulação viral ou a utilização para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). (Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual – Invitrogen). 42
- Figura 15-** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação da PCR do fragmento de DNA da CP utilizando os primers *CP forward* e *CP reverse*. M- marcador molecular 1kb *Plus DNA Ladder*. Poços 1, 2, 3 e 4- resultado das reações de polimerase em cadeia. A seta em negrito, à esquerda, indica um fragmento de aproximadamente 650 pb referente ao inserto. 49
- Figura 16-** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a presença de DNA após a extração plasmidial. M- Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 14- resultado da extração de DNA plasmidial das 14 colônias selecionadas. As setas indicam as amostras que foram escolhidas para análise de restrição com a enzima *Eco* RI. 50
- Figura 17-** Análise de restrição dos possíveis clones. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M- Marcador molecular *1 kb Plus DNA Ladder*. Poços 1, 4, 5 e 6 - plasmídeo pCR 2.1 digerido com *Eco* RI, apresentando duas bandas, uma de 3.900 pb, referente ao plasmídeo e outra de 650 pb referente ao inserto (seta em negrito). Poços 2 e 3 - amostras negativas para a análise de restrição. Essas amostras podem não terem recebido o inserto ou não sofreram digestão completa. 50
- Figura 18-** Eletroforese em gel de agarose 1%. M - marcador *1 Kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 e 2- vetor pFastPH3 linearizado com *Nco* I, apresentando tamanho de aproximadamente 5.500 pb. Poços 3 a 6- vetor pCR 2.1 após ligação com o inserto e digerido com *Nco* I. O inserto foi visualizado apenas nos poços 4, 5 e 6 (650 pb, em negrito). 51
- Figura 19-** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da extração de DNA plasmidial do vetor pFastPH3 ligado ao fragmento CPCSDaV. M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*.

Poços 1 a 12- resultado da extração de DNA plasmidial das 12 colônias selecionadas. As setas indicam as três amostras selecionadas para análise com enzima de restrição..... 52

Figura 20- Análise de restrição de possíveis clones. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1, 3 e 5 - vetor pFastPH3 digerido com *Nco I* apresentando duas bandas, uma de 5.500 pb referente ao plasmídeo e outra de 650 pb referente ao inserto. Poços 2, 4 e 6 - vetor pFastPH3 com o inserto, sem digerir (controle negativo das amostras que foram digeridas). 52

Figura 21- Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a presença de DNA em bacmídeos recombinantes. M- Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 16 - resultado da extração de DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes. As setas indicam as sete colônias escolhidas para a confirmação da construção dos bacmídeos recombinantes por PCR..... 53

Figura 22- Confirmação da transposição do gene de interesse (CPCSDaV) para o DNA do bacmídeo. A) Esquema representativo da posição dos *primers* no genoma do bacmídeo. Amplificações por PCR utilizando diferentes combinações desses *primers* podem confirmar a transposição e orientação do inserto no bacmídeo, de acordo com os tamanhos esperados dos fragmentos. *Primer M13 forward* junto ao *primer* reverso do gene de interesse, espera-se fragmentos de aproximadamente 3.000 pb, e *primer M13 reverso* junto ao *primer CPCSDaV forward*, fragmentos de aproximadamente 1.350 pb. B) Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 7 - produtos da PCR utilizando os *primers M13 forward* e *CP reverse*, obtendo-se a banda esperada de aproximadamente 3.000 pb..... 54

Figura 23 – Microscopia óptica mostrando poliedros no interior de células de inseto Tn5B, em aumento de 400x. A) Poliedros formados pelo vírus selvagem AcMNPV 72 h.p.i. B) Poliedros formados pelo vírus recombinante vAcCSDaV 72 h.p.i. As setas indicam os poliedros no interior da célula. 55

Figura 24- Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a obtenção do baculovírus recombinante por PCR. M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 e 2 – resultado da PCR utilizando os *primers M13 forward* e *CPCSDaV reverse*. Poços 3 e 4 - resultado da PCR utilizando os *primers CPCSDaV forward* e *M13 reverse*. 56

Figura 25 – SDS-PAGE e Imuno-marcação de extrato de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV, confirmando a expressão da proteína recombinante. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com o vírus vAcCSDaV; Poço 3- extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV. A seta indica a proteína de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com anticorpo anti-HisTag. A ordem das amostras nos poços 1, 2 e 3 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação por anticorpo na altura de aproximadamente 55 kDa. 57

Figura 26– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar e ressuspender o *pellet* com PBS 1X; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica a proteína na altura de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida a partir do *pellet* lavado e ressuspendido com PBS 1X. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo, na altura aproximada de 55 kDa, conforme esperado. 58

Figura 27– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extrato de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células não infectadas (mock); Poço 3- extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- extrato de células infectadas com o vírus vAcCSDaV. A seta indica a proteína recombinante na altura de 50 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com anticorpo anti-HisTag. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo na altura de ~55 kDa..... 59

Figura 28- SDS-PAGE e Imuno-marcação de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar o *pellet* com PBS 1X, ressuspender com carbonato de sódio e dialisar com tampão fosfato de sódio; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica a proteína recombinante na altura de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida após o processo de diálise com tampão fosfato de sódio. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo na altura de aproximadamente 55 kDa, conforme esperado..... 60

Figura 29– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar e ressuspender o *pellet* com PBS 1X; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica uma proteína de aproximadamente 55 kDa. B e C) Membranas de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida a partir de gel de poliacrilamida. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. As setas na altura de aproximadamente 55 kDa indicam a marcação pelos anti-soros..... 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequências de nucleotídeos utilizados na construção dos *primers*. *maiúsculo= nucleotídeos induzidos para manter o quadro de leitura (GC) e facilitar a clonagem (T), evitando baixa qualidade na síntese 34
- Tabela 2** - *Primers* utilizados na PCR, contendo a seqüência codificadora da enzima *Nco* I, a seqüência de reconhecimento da protease fator Xa e a seqüência da capa protéica do vírus. .34
- Tabela 3** - Reagentes utilizados para a reação de PCR para amplificação do inserto. 35
- Tabela 4** - Reagentes utilizados para a desfosforilação do vetor pFastPH3 linearizado com a enzima *Nco* I. 38
- Tabela 5** - Sequência dos *primers* utilizados para verificar a presença e a orientação do inserto no genoma do bacmídeo. 43
- Tabela 6** - Reagentes utilizados na PCR para confirmar a construção do bacmídeo recombinante. 43
- Tabela 7** - Reagentes utilizados para fazer gel de poliacrilamida 12%. 45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

APS	Persulfato de amônia (<i>Ammonium persulfate</i>)
CP	Proteína do capsídeo (<i>coat protein</i>)
CSDaV	<i>Citrus sudden death-associated virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
For	<i>Forward</i>
h.p.i.	Horas pós-infecção
Hel	Helicase
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MSC	Morte Súbita dos Citros
Mtr	Metiltransferase
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
<i>Nco</i>	<i>Nocardia corallina</i>
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pol	Polimerase
Pro	<i>Papain-like protease</i>
Rev	<i>Reverse</i>
sgRNA	RNA subgenômico
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A Morte Súbita do Citros	15
1.1.1. Sintomas da Morte Súbita do Citros	16
1.1.2. Distribuição da doença	19
1.1.3. Manejo.....	19
1.1.4. Etiologia	20
1.1.5. A família <i>Tymoviridae</i>	23
1.1.6. Citrus sudden death-associated virus (CSDaV)	24
1.2. Baculovírus	26
1.2.1. Introdução.....	26
1.2.2. Classificação dos baculovírus	26
1.2.3. Estrutura do vírion.....	28
1.2.4. Modo de infecção <i>in vitro</i> : infecção de cultura de célula de inseto	28
1.2.5. Baculovírus como vetor de expressão	29
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivos gerais.....	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Obtenção do fragmento de DNA da capa protéica por PCR.....	34
3.1.1. Eluição do fragmento amplificado a partir do gel de agarose	35
3.2. Ligação do fragmento CPCSDaV ao vetor pCR 2.1	36
3.2.1. Transformação em bactérias competentes <i>E. coli</i> por eletroporação ..	37
3.2.2. Extração de DNA plasmidial e verificação da presença do inserto	37
3.3. Sequenciamento automático e análise das sequências	38
3.4. Obtenção do fragmento de DNA CPCSDaV para clonagem em pFastPH3 ...	38
3.5. Preparação do vetor pFastPH3	38
3.6. Construção do vetor pFastPH3-CPCSDaV	39

3.6.1. Transformação em bactérias <i>E. coli</i> por eletroporação	40
3.6.2. Extração de DNA plasmidial e digestão com <i>Nco</i> I.....	40
3.6.3. Sequenciamento automático e análise das sequências	40
3.7. Obtenção do bacmídeo recombinante BacCSDaV-pol	40
3.8. Confirmação da construção do bacmídeo recombinante por PCR.....	42
3.9. Obtenção do baculovírus recombinante vAcCSDaV	43
3.10. Purificação e análise do DNA viral por PCR.....	44
3.11. Análise da expressão de proteína heteróloga por SDS-PAGE.....	44
3.12. Análise da expressão de proteína heteróloga por Western Blot.....	45
3.13. Obtenção da proteína recombinante vAcCSDaV-pol a partir de células infectadas.....	46
3.14. Quantificação da proteína recombinante CSDaV-pol.....	46
3.15. Preparação das amostras para imunização dos camundongos	47
3.16. Imunização dos camundongos	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Clonagem e sequenciamento do inserto CPCSDaV	49
4.2. Construção do vetor pFastPH3-CPCSDaV	51
4.3. Obtenção do bacmídeo recombinante BacCPCSDaV.....	52
4.4. Obtenção do baculovírus recombinante vAcCSDaV	54
4.5. Análise da expressão da proteína CSDaV-pol em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Imuno-deteção (Western-blot).....	56
4.6. Análise dos anti-soros produzidos em camundongos	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 A MORTE SÚBITA DO CITROS

A morte súbita do citros (MSC) é uma doença destrutiva que afeta pomares de laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] das variedades ‘Valência’, ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Westin’ e ‘Pêra’ e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) ‘Cravo’ e ‘Ponkan’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), sendo descrita pela primeira vez no início de 2001 em Comendador Gomes, sul do Triângulo Mineiro (GIMENES-FERNANDES & BASSANEZI, 2001). A denominação MSC foi atribuída a essa doença devido à velocidade com que as plantas definhavam e morriam (INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA, 2001).

Todo o quadro sintomatológico da MSC pode ocorrer rapidamente, de um a mais de 12 meses, dependendo da época do ano (mais rápido na primavera) e da condição de produção da planta (BASSANEZI et al., 2002; MÜLLER et al., 2002). Até hoje, nenhuma planta com menos de 22 meses de idade apresentou sintomas de MSC nos pomares das regiões de maior incidência da doença. Até hoje, nenhuma planta com menos de 22 meses de idade apresentou sintomas da MSC. Este fato leva a pensar que o período de incubação da MSC deve ser de pelo menos dois anos em plantas jovens, e que as plantas que atualmente apresentam sintomas da MSC foram infectadas há algum tempo.

A MSC está associada à combinação entre laranjeira doce enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’ (Figura 1), uma vez que combinações de laranjeira doce sobre outros porta-enxertos, como de tangerineiras ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort.ex Tanaka) e ‘Sunki’ (*C. sunki* Blanco), *Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque-schmhlz e citrumeleiro ‘Swingle’ [*P. trifoliata* (L.) Raf. x *C. paradisi* Macfayden] até então não apresentaram sintomas da doença (GIMENES-FERNANDES et al., 2002).



Figura 1- Vista aérea de plantios de laranja-doce ‘Valência’ enxertada em limoeiro ‘Cravo’, apresentando sintomas da morte súbita do citros, e de laranja-doce ‘Valência’ enxertada em tangerineira ‘Cleópatra’, sadias (A). Em (B) observa-se duas fileiras de plantio de laranja-doce ‘Valência’ enxertada em tangerineira ‘Cleópatra’, sem sintomas da doença, no meio de um plantio de laranja-doce ‘Valência’ enxertada em limoeiro ‘Cravo’, afetado pela doença (Fonte: Fundecitrus).

Por afetar pomares de laranjeiras doces das variedades ‘Hamlin’, ‘Pêra’, ‘Valência’ e ‘Natal’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), que representam 85% das plantas no Estado de São Paulo (BASSANEZI et al., 2003b), a MSC representa séria ameaça à citricultura brasileira, assim como foi a tristeza do citros (causada pelo CTV- *Citrus tristeza virus*), que entre 1939 e 1949 destruiu 90% das plantas existentes em São Paulo (KIMATI & GALLI, 1980), matando milhões de laranjas doces (*Citrus sinensis*) enxertadas em laranjas azedas (*C. aurantium*). O problema foi resolvido trocando-se o porta-enxerto sensível ao vírus por um resistente, o limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), que agora tem se mostrado suscetível à MSC.

1.1.1 Sintomas da Morte Súbita do Citros

As plantas afetadas pela MSC apresentam sintomas de definhamento generalizado. Inicialmente, as folhas de toda a copa ficam sem brilho e com cor verde-pálida (Figura 2). Posteriormente, ocorre desfolha parcial, produção de poucas brotações e ausência de brotações internas (Figura 3), sintoma que se acentua com a evolução da doença. As raízes da laranja-doce afetada apresentam poucas radículas e muitas raízes podres e mortas. A morte do sistema radicular progride da ponta da raiz para a base, até que a raiz principal seja afetada e morra (Figura 4).



Figura 2- Laranjeiras com sintomas da morte súbita do citros mostrando perda de brilho generalizada e coloração verde-pálida das folhas, contrastando com a cor normal das plantas sadias (A) e folhas coletadas em plantas sadia e doente, mostrando o contraste da coloração (B) (Fonte: Fundecitrus).

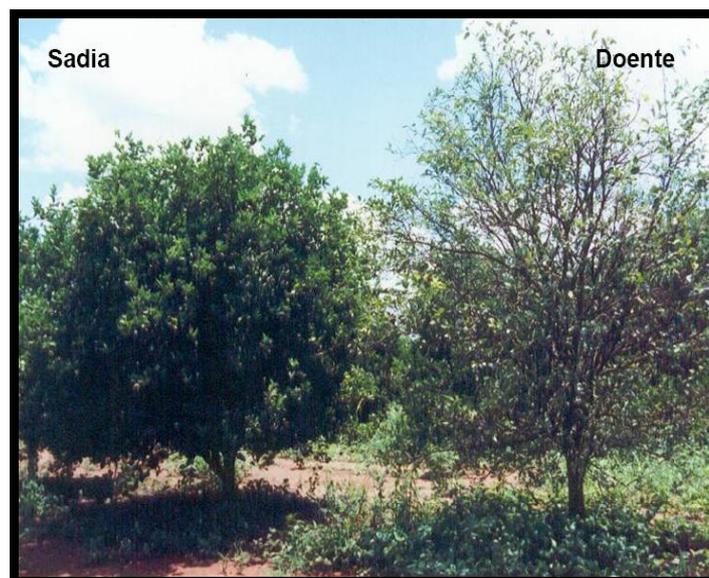


Figura 3- Plantas sadia e apresentando desfolha parcial, um dos sintomas da morte súbita do citros (Fonte: Fundecitrus).



Figura 4- Detalhe do sistema radicular de planta com sintoma inicial de morte súbita do citros, apresentando grande quantidade de raízes mortas, normalmente com poucas radículas (A) e detalhe da podridão que se inicia da ponta para a base da raiz (B) (Fonte: Fundecitrus).

O principal sintoma se caracteriza por uma coloração entre amarelo e alaranjado presentes nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, na região do floema funcional, abaixo da região de enxertia até as raízes mais grossas, em contraste com a cor creme dos tecidos da casca da copa (Figura 5) (JESUS JUNIOR et al., 2003). Essas regiões de tecido amarelado correspondem a vasos do floema que se encontram obstruídos e degenerados (GIMENES-FERNANDES & BASSANEZI, 2001).

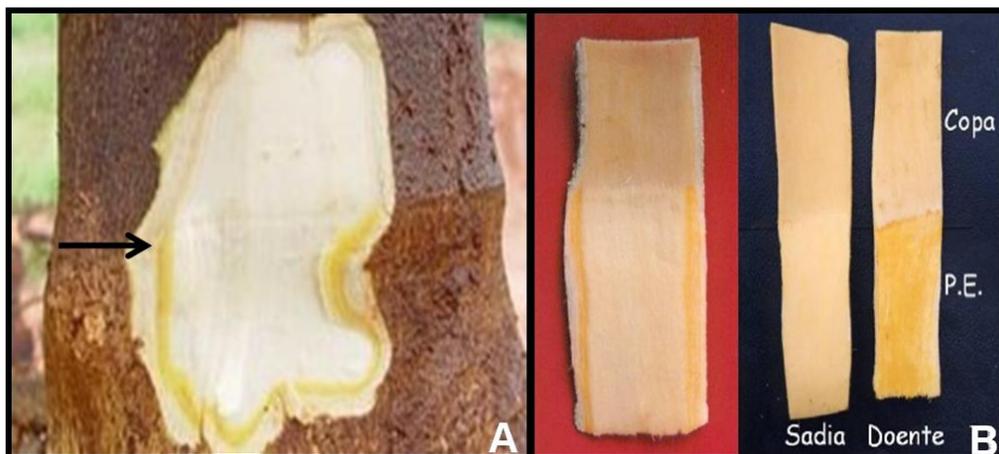


Figura 5- Coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto limão ‘Cravo’, na região do floema funcional, contrastando com os tecidos brancos da casca da copa (A) . Em (B), comparação da cor amarelada do floema funcional entre plantas sadia e doente (Fonte: Fundecitrus).

Esses sintomas se intensificam com o progresso da doença, até que ocorra a morte da planta. O aparecimento dos sintomas e a morte da planta ocorrem quando há acentuado desequilíbrio entre a demanda de água e sais minerais pela copa e o suprimento fornecido pelo

sistema radicular, devido à necessidade de absorção de água para os novos brotos e para a maturação dos frutos.

A produção das plantas que não entram em colapso repentino vai diminuindo gradativamente até a morte dessas plantas, sendo que quanto mais severos os sintomas da doença, maiores são as diferenças de peso, número e tamanho dos frutos colhidos.

1.1.2 Distribuição da doença

Desde sua constatação, o progresso e a disseminação da MSC nos pomares afetados têm sido bastante rápidos, podendo atingir de 30 a 70% das plantas em apenas seis meses (BASSANEZI et al., 2002, 2003a,b). De dezembro de 2001 a dezembro de 2003, a doença passou de sete municípios no sul do Triângulo Mineiro e no norte do Estado de São Paulo (LIBANORE et al., 2002) para 30 municípios (FUNDECITRUS, 2004).

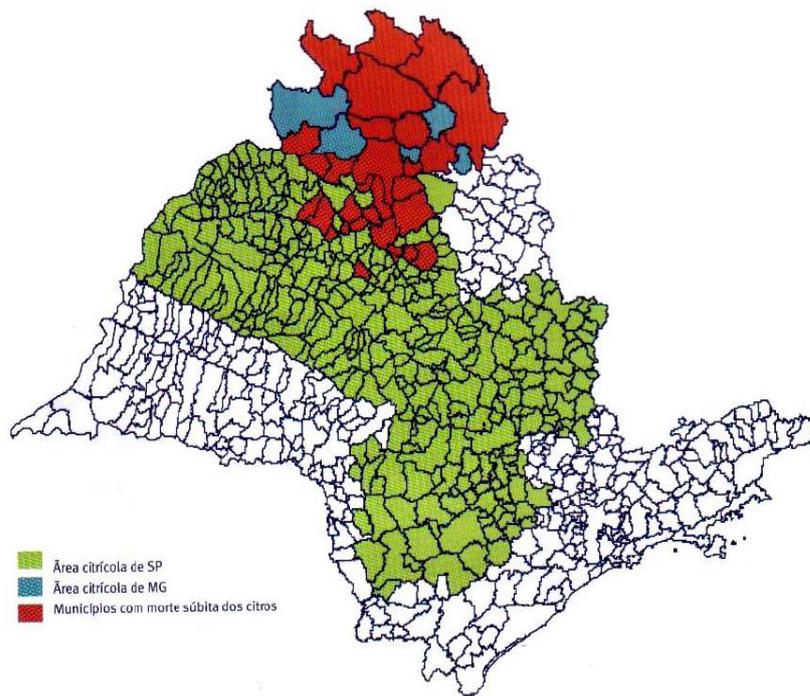


Figura 6- Mapa da distribuição da morte súbita do citros em MG e SP. (Fonte: Jesus Junior et al., 2004b).

1.1.3 Manejo

As estratégias recomendadas até o momento são baseadas em observações feitas no campo, não possuindo comprovação técnica-científica. As principais medidas recomendadas são: 1) não transportar mudas, borbulhas e cavalinhos das regiões com a doença para aquelas

onde a doença ainda não foi constatada; 2) evitar o plantio sobre limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’; 3) diversificação do plantio com porta-enxertos tolerantes; 4) subenxertia com porta-enxertos tido como tolerantes (citrumeleiro ‘Swingle’, tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’ e *Poncirus trifoliata*) em plantas enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’.

A subenxertia tem sido utilizada com sucesso em pequena escala, em diversos países, principalmente para estabelecer porta-enxertos tolerantes a tristeza em árvores enxertadas em laranja “Azeda”, ameaçadas pela doença. Esta técnica consiste no plantio de um novo porta-enxerto, conhecido por cavalinho, ao lado da planta existente, abaixo da região de enxertia, utilizando-se a técnica de T invertida (Figura 7). Em plantas com até 3 anos de idade tem-se utilizado um único cavalinho, enquanto em árvores mais velhas são utilizados 2 cavalinhos. A idade ideal do porta-enxerto a ser usado é de 5 a 8 meses, dependendo da variedade, com altura de 45 cm e com tecido maduro (lenhoso) na altura de enxertia, devendo ter no máximo 5 a 6 anos de idade (MÜLLER et al., 2002).



Figura 7- Subenxertia realizada em planta com seis anos de idade através da técnica do T invertido, utilizando dois cavalinhos (Fonte: Fundecitrus).

1.1.4 Etiologia

O agente causal da MSC ainda é desconhecido, mas com base nos resultados de estudos da evolução e da distribuição da doença concluiu-se que a doença é infecciosa, o agente causal possui um vetor alado envolvido na sua disseminação (BASSANEZI et al., 2003a), e esta é bastante rápida e eficiente (JESUS-JUNIOR & BASSANEZI, 2004a).

Estudos comprovaram que a causa primária da MSC é de natureza biótica, pois foi verificado experimentalmente que a doença pode ser transmitida de uma planta doente para uma sadia através da inoculação por enxertia de borbulhas sob condições de ausência de insetos. Este resultado permite excluir como causa da doença os fatores abióticos, pragas, nematóides e fungos de solo, os quais não são transmitidos por enxertia. Assim, os agentes que podem ser transmitidos dessa maneira são viróides, vírus ou bactérias endógenas (restritas ao xilema e floema).

Por ser o quadro sintomatológico da MSC resultante de alterações no sistema vascular das plantas, as buscas por bactérias e fitoplasmas que habitam e colonizam os vasos das plantas foram realizadas intensivamente. Porém, os testes de diagnóstico por PCR em diferentes laboratórios do Brasil e do exterior não constataram a presença destes organismos em tecidos da casca do tronco e raiz de plantas doentes (I.P. Bedendo – ESALQ/USP; M.A. Machado – APTA Citros; J. Hartung – USDA/Estados Unidos; M. Garnier – INRA/França – dados não publicados).

Os viróides de citros são moléculas de RNA sem capsídeo que colonizam o floema das plantas infectadas. Apesar da sintomatologia da MSC ser distinta da observada por doenças causadas por viróides, foram realizados testes de PCR com *primers* específicos para detecção destes organismos em amostras de plantas com sintomas de MSC. Em todas as amostras, a presença de viróides foi negativa (N. Duran-Vila & P. Moreno – IVIA/Espanha – dados não publicados).

Excluídos fatores abióticos, pragas, fungos, nematóides, bactérias habitantes do xilema e do floema e viróides como possíveis agentes causais da MSC, a hipótese mais provável é que a MSC seja causada por um vírus.

Atualmente existem três hipóteses quanto ao possível vírus causador desta doença. Os estudos têm apontado para o envolvimento do vírus da tristeza dos citros (CTV, da família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus*), ou de um novo vírus da família *Tymoviridae*, gênero *Marafivirus*, chamado Citrus sudden death-associated virus (CSDaV), detectado em plantas doentes (HARAKAVA, 2004; BARROS et al., 2004; MACCHERONI et al., 2005), ou ainda que possa haver um sinergismo entre estes dois vírus.

A primeira hipótese é que a MSC seja causada por uma nova estirpe mais virulenta do CTV, devido à semelhança entre a MSC e a tristeza na sua forma de declínio rápido (BOVÉ et al., 2002).

Esta hipótese baseia-se em algumas evidências, como a semelhança entre essas doenças em relação aos aspectos temporal e espacial na presença do pulgão preto (*Toxoptera*

citricida) (BASSANEZI et al., 2003a; JESUS JUNIOR & BASSANEZI, 2004a), semelhanças entre a MSC e o CTV quanto à sintomatologia (GIMENES-FERNANDES & BASSANEZI, 2001) e alterações ultraestruturais (ROMÁN et al., 2004) e por serem doenças de combinação copa/porta-enxerto (GIMENES-FERNANDES & BASSANEZI, 2001; MÜLLER et al., 2002), cuja remissão dos sintomas pode ser obtida com a utilização de subenxertia.

Além disso, somente CTV foi encontrado por microscopia eletrônica em tecidos de plantas infectadas (Kitajima, E. W., comunicação pessoal), detectado por testes sorológicos (Rezende, J. A. M., Machado, M. A. e Cambra, M., comunicação pessoal) e através de padrões de RNA de fita dupla (Moreno, P., comunicação pessoal) em todas as amostras examinadas (BASSANEZI et al., 2002). Entretanto, até o momento nenhuma associação entre a MSC e o CTV foi comprovado experimentalmente (DERRICK et al., 2003; TARGON et al., 2004), visto que o CTV está presente tanto nas plantas com sintomas de MSC, como em plantas assintomáticas.

A segunda hipótese é que a MSC seja causada por um novo vírus da família *Tymoviridae*. Esta hipótese está baseada no fato de sequências de RNA com semelhanças a um vírus de RNA da família *Tymoviridae* terem sido detectadas em plantas afetadas por MSC, mas não em plantas assintomáticas (REINACH, 2003; HARAKAVA, 2004; BARROS et al., 2004), e porque foram visualizados em microscopia eletrônica partículas virais purificadas de plantas com sintomas de MSC (JESUS JUNIOR et al., 2004c, 2005), onde detectou-se um novo vírus que foi denominado Citrus sudden death-associated virus (Figura 8). Além disso, CSDaV foi detectado através de PCR, utilizando-se *primers* específicos de sequências genômicas do CSDaV, em afídeos coletados de plantas com sintomas da MSC (Jesus Junior, W. C. De, comunicação pessoal).

A hipótese que possa haver um sinergismo entre esses dois vírus se baseia no fato de terem sido encontradas partículas virais de CTV em todas as plantas em que foi diagnosticada a MSC, mas ainda não há estudos comprobatórios neste sentido.

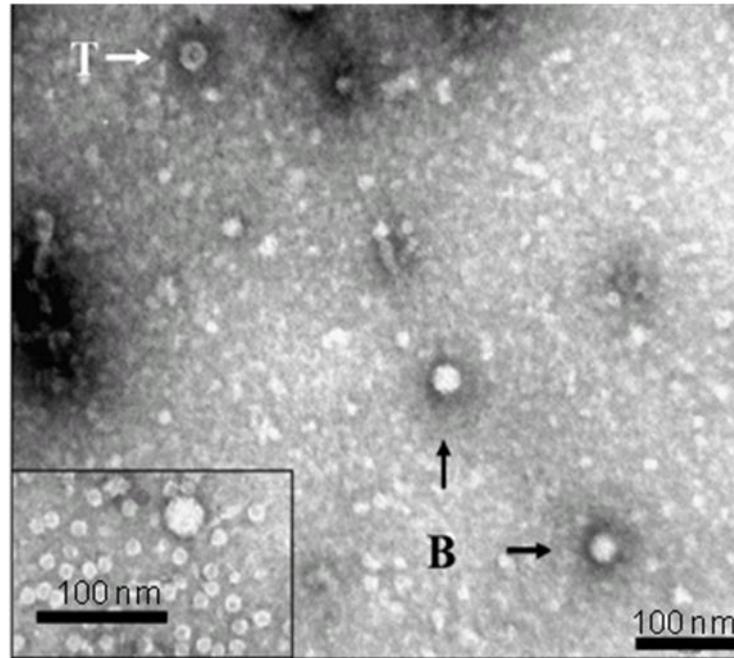


Figura 8- Microscopia eletrônica de CSDaV purificado de plantas infectadas com citros. T- partículas vazias (sem RNA); B- partículas contendo RNA viral. (Maccheroni et al., 2005).

No entanto, sabe-se que o estabelecimento da relação causal entre uma doença e um determinado agente patogênico só pode ser confirmado após o cumprimento de uma série de etapas, denominadas de postulados de Koch, que são:

- a) associação constante patógeno-hospedeiro;
- b) isolamento do patógeno;
- c) inoculação do patógeno e reprodução dos sintomas;
- d) reisolamento do patógeno.

Até o momento, estes postulados não foram concluídos para a MSC, visto que o isolamento dos patógenos candidatos desta doença (CTV e CSDaV) é dificultado por não ser transmitido por inoculação mecânica, além de não infectar plantas indicadoras (CSDaV), ou ter baixa eficiência nesse processo (CTV). Dessa forma, a etiologia do CSDaV permanece sujeita a várias hipóteses.

1.1.5 A família *Tymoviridae*

Tymoviridae é uma família viral que foi aprovada oficialmente pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em junho de 2002. Possuem vírions não envelopados, com cerca de 30 nm de diâmetro, contorno arredondado com estruturas

proeminentes em sua estrutura, icosaédricos (T=3) com agrupamento de subunidades da capa protéica (CP) em pentâmeros e hexâmeros (MARTELLI et al., 2002a). Seu genoma é composto de RNA monopartido de fita simples, positiva, com cerca de 6,0 a 7,5 Kb. A extremidade 5' possui *Cap*, enquanto que a extremidade 3' pode ter uma estrutura de tRNA ou uma cauda poli-A, dependendo do vírus (<http://www.dpvweb.net>). O genoma desta família possui uma grande ORF (*open reading frame*) que codifica proteínas relacionadas à replicação, possibilitando a clivagem proteolítica pós-traducional desta proteína codificada pela ORF1 por uma *papain-like protease* codificada pelo vírus e a expressão da proteína do capsídeo via RNA subgenômico (sgRNA) 3'-terminal.

Esta família é composta por três gêneros de vírus vegetais:

- *Tymovirus* (DREHER et al., 2000), do qual deriva o nome da família;
- *Marafivirus* (EDWARDS, 2000) e
- *Maculavirus* (MARTELLI et al., 2002b).

1.1.6 Citrus sudden death-associated virus (CSDaV)

A comparação entre os membros dos três gêneros da família *Tymoviridae*, em termos de organização do genoma e análise da sequência filogenética, classificaram o CSDaV no gênero *Marafivirus* (MACCHERONI et al., 2005). A maioria das características dos *Marafivirus* podem ser encontradas no CSDaV, tais como a presença de uma grande ORF traduzida em uma poliproteína associada a replicação viral e atividade proteolítica, uma sequência altamente conservada de 16 nucleotídeos que funciona como um promotor de sgRNA conhecida como “marafibox” e a transcrição de um sgRNA 3'-co-terminal e duas CPs, uma produzida pela clivagem C-terminal da poliproteína e outra traduzida a partir do sgRNA.

O genoma do gênero *Marafivirus* (tamanho de 6,3 a 6,5 kb) possui um grande quadro aberto de leitura (ORF – *open reading frame*) que codifica um polipeptídeo com massa molecular aproximada de 225 kDa, com motivos de sequências conservados de metiltransferase (Mtr), helicase (Hel), RNA polimerase (RdRp) e um domínio de *papain-like protease* (Pro). Esta ORF possui ainda o “marafibox” (IZADPANA, 2002), uma sequência de 16 nucleotídeos comparável ao “tymobox”, do qual difere em três resíduos. Os vírions possuem duas subunidades da CP, de aproximadamente 25 kDa e 21 kDa (EDWARD et al., 1997), cujas ORFs estão localizadas na extremidade 3' do genoma viral. A CP de 25 kDa é

produzida inicialmente na região C-terminal do polipeptídeo e posteriormente clivada, enquanto a CP de 21 kDa é produzida a partir do sgRNA da região 3'-co-terminal

No entanto, algumas características únicas deste novo vírus devem ser destacadas, como o tamanho de genoma com 6,8 kb, enquanto que o tamanho do genoma do gênero *Marafivirus* é de 6,0 a 6,5 kb (MACCHERONI et al., 2005). O genoma do CSDaV possui 6806 nucleotídeos, excluindo-se a cauda poli(A) na extremidade 3' e codifica uma poliproteína de aproximadamente 240 kDa (p240) com motivos de sequência similares às proteínas associadas à replicação (Mtr, Hel, RdRp), um domínio *papain-like protease* presentes nas proteínas não estruturais de outros vírus com genoma de RNA senso positivo (Figura 9). A extremidade 3' da ORF que codifica a poliproteína também pode codificar uma proteína do capsídeo (CP) de 22,5 kDa que é clivada na região C-terminal da poliproteína de 240 kDa. Uma segunda CP de 21 kDa é traduzida de um RNA subgenômico (sgRNA) localizado na extremidade 3' do genoma do CSDaV. Uma possível pequena ORF (ORF 2, Figura 9) na extremidade 3' do genoma foi detectada através de análise computacional e possivelmente codifica uma proteína de função desconhecida, cuja sequência possui baixa similaridade com proteínas de movimentos da família *Tymoviridae* (BARROS et al., 2004).



Figura 9- Organização do genoma de CSDaV, mostrando as proteínas associadas à replicação (Mtr, Pro e Hel e Pol) e a extremidade 3', que codifica a CP.

1.2 BACULOVÍRUS

1.2.1 Introdução

São vírus pertencentes à família *Baculoviridae*, e são capazes de infectar uma gama de hospedeiros artrópodes, em especial insetos das ordens Lepidóptera, Díptera e Himenóptera (FEDERICI, 1986, 1997; HERNIOU et al., 2004). São os vetores mais utilizados na expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. Inicialmente, o baculovírus foi estudado e bastante utilizado como agentes de controle biológico de insetos-praga associados à agricultura (CASTRO et al., 1999). Sua aplicação como ferramenta biotecnológica foi estabelecida na década de 80 (SMITH, et al., 1983a) e, desde então, vem sendo amplamente utilizados como vetores de expressão de proteínas oriundas de diferentes organismos (O'REILLY et al., 1994), principalmente por serem altamente específicos a uma ou poucas espécies de insetos relacionadas (GRÖNER, 1986) e incapazes de se replicar em células de mamíferos (TANI et al., 2003).

1.2.2 Classificação dos baculovírus

De acordo com o sistema de classificação hierárquica proposto, por volta de 1960, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. A classificação da família *Baculoviridae* em dois gêneros, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV), é baseada principalmente na morfologia de seus corpos de oclusão (OB) (MURPHY et al., 1995; VAN REGENMORTEL et al., 2000). A partir de 2006, a taxonomia dos gêneros da família *Baculoviridae* foi alterada com base na especificidade aos hospedeiros, e inclui hoje quatro gêneros: os *Alphabaculoviruses* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculoviruses* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculoviruses* (NPV específicos de himenópteros), e *Deltabaculoviruses* (NPV específicos de dípteros) (JEHLE et al., 2006).

Nos baculovírus, os vírions se encontram oclusos em uma proteína cristal, denominada corpo de oclusão ou OB (do inglês, *occluded body*) (MURPHY et al., 1995). A principal diferença morfológica entre os dois gêneros está na conformação deste corpo de oclusão. No caso dos NPV (Figura 10) é um corpo de oclusão poliédrico, também chamado de poliedro,

variando de 0,15 a 15 μm em diâmetro (BILIMORIA, 1991) e contendo vários vírions. Sua principal proteína é denominada poliedrina, com massa molecular em torno de 29 kDa (SUMMERS et al., 1980), e corresponde a cerca de 95% do seu conteúdo protéico (MARUNIAK, 1986). Os vírus desse gênero podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (“Single” *nucleopolyhedrovirus* - SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (“Multiple” *nucleopolyhedrovirus* - MNPV) (BILIMORIA, 1991; VAN REGENMORTEL et al., 2000). Os NPV podem ainda ser classificados em grupo ou tipo I e II com base em estudos comparativos de análises filogenéticas de baculovírus em relação ao gene da poliedrina (ZANOTTO et al., 1993; BULACH et al., 1999).

Nos GV, o OB se trata de um grânulo na forma ovicilíndrica composto pela proteína granulina, com massa molecular similar ao da poliedrina. O grânulo mede cerca de 0,3 x 0,5 μm , contém um vírion por grânulo podendo raramente conter dois a três vírions por grânulo (CROOK, 1991). Os GV são ainda pouco estudados, em especial porque existe uma dificuldade do estudo desses vírus *in vitro* por limitações de sua replicação viral em cultura de insetos (WINSTANLEY & CROOK, 1993) e por apresentar uma gama de insetos hospedeiros bastante reduzida (DWYER & GRANADOS, 1998; FUNK & CONSIGLI, 1992). Já os NPV são encontrados em mais de 600 espécies hospedeiras (FEDERICI, 1997) e diferentes linhagens de células de inseto podem ser utilizadas como cultura de células hospedeiras (MILLER, 1997).

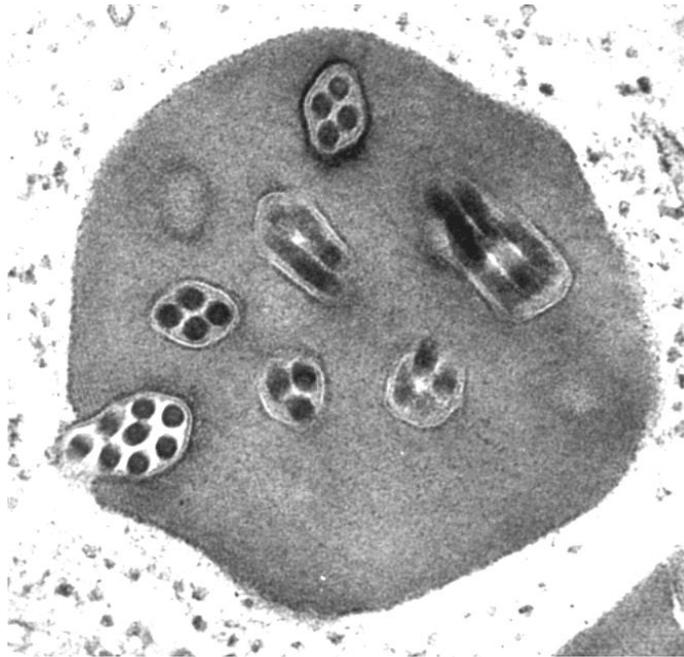


Figura 10- Ultraestrutura de um baculovírus por microscopia eletrônica de transmissão. Partículas virais de NPV oclusas em uma matriz protéica (poliedro). (Fonte: Dr. Bergmann Morais Ribeiro).

1.2.3 Estrutura do vírion

A origem do nome *Baculoviridae* tem origem da palavra latina *baculum*, que significa bastão, caracterizando a forma do capsídeo das partículas virais desta família (O'REILLY et al., 1994; FIELDS et al., 2001). O genoma do baculovírus é de DNA dupla fita, circular, que varia entre 80 e 200 kilobases (kb) (ARIF, 1986). Este genoma é envolto pelo capsídeo protéico com forma de bastonete, que apresenta um diâmetro de 40-50 nm e comprimento de 200-400 nm, constituindo a unidade infectiva do vírus (nucleocapsídeo) (O'REILLY et al., 1994). Apresentam dois fenótipos distintos durante o ciclo de infecção: o BV ou vírus extracelular (BV, do inglês *budded virus*), que é responsável pela transmissão do vírus célula a célula, e OB, vírus oclusos ou corpos de oclusão (OB, do inglês *occlusion boddies*) (SMITH et al., 1983), sendo responsável pela transmissão do vírus inseto a inseto.

1.2.4 Modo de infecção *in vitro*: infecção de cultura de célula de inseto

O desenvolvimento de metodologias em culturas de células de inseto permitiu o estudo sobre a organização molecular e expressão gênica, cinética do processo de infecção e patogênese dos baculovírus, pois possibilitou a avaliação da infecção viral *in vitro*. Com este propósito, foram estabelecidas diferentes linhagens de células de inseto, permitindo a

manipulação de condições que auxiliaram no estudo da infecção, replicação e biologia molecular dos baculovírus. Isto abriu perspectivas para produção *in vitro* de baculovírus.

De acordo com o ICTV, cada gênero viral contém uma espécie-tipo e o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) é a espécie-tipo dos NPV (FAUQUET et al., 2005). Este vírus foi primeiramente isolado da lagarta *Autographa californica* e é capaz de infectar diferentes insetos da ordem lepidóptera. O principal modelo de estudo hoje associado ao AcMNPV é na infecção de cultura de células de inseto derivadas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (WILLIAMS & FAULKNER, 1997).

Por ser a espécie-tipo, o modelo de replicação de AcMNPV é caracterizado e aceito como modelo para outros baculovírus (AYRES et al., 1994). Na replicação ocorre a produção das duas formas virais: a produção de BV começa por volta de 12 a 24 h.p.i. (horas pós-infecção) e de OB, no núcleo da célula, ocorre desde a fase final da infecção (a partir de 18 h.p.i.) até a morte celular, por volta de 72 h.p.i. Os BV dos NPV se caracterizam pela presença de um nucleocapsídeo simples envolto por envelopes frouxos, derivados da membrana plasmática, contendo projeções na superfície denominados peplômeros, compostas de uma glicoproteína viral denominada GP64 (para os baculovírus classificados como NPV do tipo I), que é responsável por mediar a endocitose do vírus via receptor (HESS & FALCON, 1977; VOLKMAN, 1986; BLISSARD, 1996).

1.2.5 Baculovírus como vetor de expressão

O sistema baculovírus de expressão baseia-se na introdução de genes exógenos no genoma de um baculovírus no lugar de um gene não-essencial para replicação, sob o comando de um promotor forte. O modelo mais simples de vetores para o sistema de expressão em baculovírus é a troca do gene da poliedrina (que não é essencial para a replicação do baculovírus em cultura de células de inseto), por um gene heterólogo de interesse sob o controle do promotor da poliedrina (MILLER et al., 1983; SMITH et al., 1983 a, b), que é um promotor forte. Por volta de 70 h.p.i., a poliedrina compõe cerca de 20-50% da proteína produzida pela célula infectada. Dessa forma, a expressão do gene heterólogo é conduzida pelo promotor da poliedrina.

O baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), isolado originalmente da lagarta da alfafa *A. californica* é o vírus tipo da família *Baculoviridae* e usado como vírus parental para construção de vetores. A tecnologia BEV (*Baculovirus Expression System*) combina a autenticidade da proteína de organismos

eucarióticos com a eficiência dos sistemas baseados em microorganismos (bactéria e levedura).

Dentre as características que fazem dos baculovírus um sistema de expressão de proteínas heterólogas vantajoso estão:

1- alto potencial para a expressão de proteínas heterólogas, mantendo a média de 10 a 100 mg de proteína por litro de cultura, podendo chegar até um grama por litro de cultura;

2- fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas, pois é capaz de oferecer condições para que ocorram modificações pós-traducionais semelhantes às que ocorrem em células de mamíferos, permitindo a produção de proteínas biologicamente ativas (CASTRO et al., 1999);

3- capacidade para acomodar grandes inserções de DNA. Isso é possível porque o nucleocapsídeo do baculovírus é capaz de acomodar genomas virais maiores que o próprio genoma selvagem. Acredita-se que um vetor baculoviral consiga acomodar até 100 Kb adicionais (O'REILLY et al., 1994);

4- simplicidade de manipulação quando comparado a outros vetores de expressão (CASTRO et al., 1999).

Essa última característica vem sendo cada vez mais explorada com o intuito de popularizar e tornar esse sistema o mais acessível possível (KOST et al., 2005).

Assim, a metodologia usada para construir baculovírus recombinante foi aprimorada. No procedimento original, por recombinação homóloga, são utilizados plasmídeos como vetores de transferência, que contem, além do gene de interesse, sequências flanqueadoras que são homólogas às do vírus selvagem. Assim, quando é feita uma co-transfecção para a célula de inseto, ocorre uma troca de insertos, por recombinação homóloga, e o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Nas células, serão produzidos vírus selvagens e recombinantes, sendo que este último poderá ser isolado por purificação em diluição seriada em placa de 96 poços contendo células de inseto infectadas (CASTRO et al., 1999).

Em um modelo novo, que utiliza a técnica de transposição sítio-específica, o gene também é clonado em um plasmídeo, mas este possui regiões flanqueadoras de transposição. Neste processo são necessários, além deste plasmídeo de transferência, a utilização de uma bactéria especial (DH10Bac), que contem, além de seu próprio genoma, o genoma de um baculovírus na forma de um plasmídeo (denominado bacmídeo) e um plasmídeo *helper* que codifica o gene de uma transposase, que é responsável pela transposição do gene de interesse

para o genoma do baculovírus. Como o DNA do bacmídeo é infectivo, ocorre a replicação do vírus recombinante em células de inseto em cultura.

✓ **Incorporando a proteína heteróloga ao corpo de oclusão**

Há alguns anos, foram construídos vetores baculovirais capazes de incorporar uma proteína heteróloga ao corpo de oclusão (JE et al., 2003). Esses vetores possuem o gene heterólogo fusionado ao gene da poliedrina, além de possuírem o gene selvagem da poliedrina. A utilidade de tais vetores diz respeito à produção de bioinseticidas (a construção de baculovírus com corpos de oclusão possuindo uma toxina contra o inseto-praga aumenta a letalidade do vírus) (CHANG et al., 2003) e também para apresentação de antígenos, visando a produção de anticorpos.

O vetor pFastPH3 (5538 pb) (COSTA, 2008), utilizado neste trabalho, é uma construção derivada do vetor pFastBac1 (Invitrogen) (Figura 11), onde foi adicionado, após o promotor da poliedrina, um fragmento denominado PH3. Este fragmento contém o gene da poliedrina (ausente no vetor pFastBac1), um sítio de restrição para a enzima *Nco* I e cauda de hexa histidina, nesta ordem. O gene da poliedrina facilita o isolamento do vírus pela formação dos corpos de oclusão (OB) dentro do núcleo das células infectadas.

Com base nesta construção, *primers* específicos foram desenhados para a obtenção do inserto de interesse, de maneira que este seja clonado no sítio de *Nco* I que está localizado após o promotor e o gene da poliedrina, ao qual irá se fusionar. Dessa forma, sob o comando de seu promotor forte, o gene da poliedrina será altamente transcrito e, junto com ele, o gene de interesse. Os poliedros formados são fáceis de ser isolados. Assim, purificando-se os poliedros, obtém-se também a proteína recombinante.

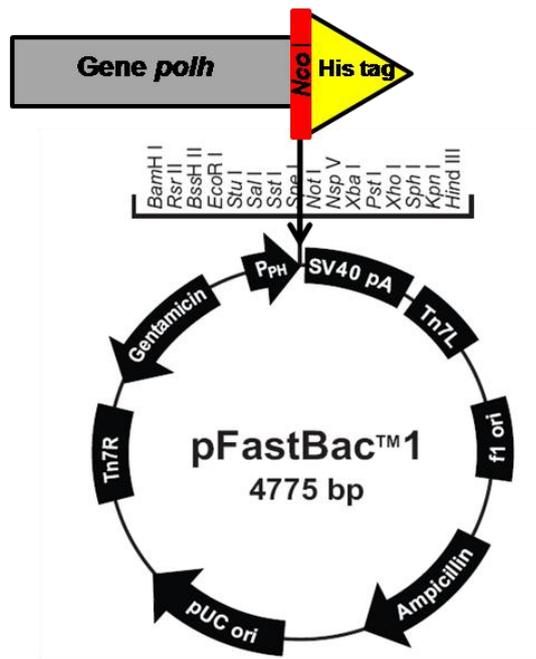


Figura 11- Mapa do vetor pFastBac1, com o esquema representativo do fragmento PH3 que foi inserido por PCR logo após o promotor da poliedrina (P_{PH}), dando origem ao vetor pFastPH3 (Costa, 2008), utilizado neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Expressar a proteína da capa (CP) do CSDaV a fim de gerar anti-soros em camundongos, que serão utilizados no diagnóstico da Morte Súbita do Citros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expressão da proteína da capa (CP) do CSDaV em baculovírus;
2. Produção de anti-soro em camundongos;
3. Imuno-deteção da CP do vírus por western blot utilizando os anti-soros produzidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA DA CAPA PROTÉICA POR PCR

A partir da sequência do genoma completo de CSDaV, obtida em trabalho anterior (BARROS et al., 2006), foram desenhados *primers* específicos (Tabelas 1 e 2) que flanqueiam a região do genoma viral codificadora da capa protéica, com a adição de sítios de restrição da enzima *Nco* I e a sequência para a protease Fator Xa, constituindo o inserto a ser clonado (Figura 12). A enzima *Nco* I foi selecionada por estar presente no sítio de clonagem do vetor de expressão utilizado (pFastPH3), e a protease Fator Xa pode ser utilizada como sítio de clivagem para liberação da CP do vírus, o que facilita o isolamento para a inoculação desta em camundongos, aumentando a especificidade dos anticorpos produzidos.

A PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com esses *primers*, utilizando a combinação de reagentes conforme a Tabela 3 e o seguinte programa: 80°C/1 min, 94°C/2 min, 35 ciclos de 94°C/15 s, 60°C/30 s, 68°C/1 min e extensão final de 68°C/10 min.

Tabela 1 - Sequências de nucleotídeos utilizados na construção dos *primers*. *maiúsculo= nucleotídeos induzidos para manter o quadro de leitura (GC) e facilitar a clonagem (T), evitando baixa qualidade na síntese .

NcoI	FatorXa				CP de CSDaV
T*ccatggGC	Ile att	Glu gga	Gly ggc	Arg cgc	ATG GCC AGT GAT GCC CAA GCA GG

Tabela 2 - *Primers* utilizados na PCR, contendo a sequência codificadora da enzima *Nco* I, a sequência de reconhecimento da protease fator Xa e a sequência da capa protéica do vírus.

Primer	Sequência dos primers	Temperatura de anelamento
CP Forward	5' TCC ATG GGC ATT GAA GGC CGC ATG GCC AGT GA 3'	74,2 °C
CP Reverse	5' TCC ATG GCA CGC AGG AGA TTA CCG GAG GGG 3'	68,8 °C

Tabela 3 - Reagentes utilizados para a reação de PCR para amplificação do inserto.

Reagentes	Volumes
Tampão 10X	2,5 µl
dNTP 2,5mM	2 µl
MgSO ₄ 50mM	1 µl
<i>Primer reverse</i> 10µM	0,5 µl
<i>Primer forward</i> 10µM	0,5 µl
<i>Platinum Taq High Fidelity DNA polymerase</i> (Invitrogen) (5u/µl)	0,1 µl
DNA (CP de CSDaV)	0,5 µl
Água “milli-Q”	17,9 µl
Volume final	25 µl

**Figura 12-** Representação esquemática do fragmento amplificado por PCR, contendo a sequência codificadora da enzima *Nco* I flanqueando a sequência de reconhecimento da protease fator Xa e a sequência da capa protéica do vírus.

Para a confirmação da amplificação do inserto (aproximadamente 650 pb), foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (5 µg/ml), sendo visualizado sob a emissão de ultravioleta. Foi usado como marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

3.1.1 Eluição do fragmento amplificado a partir do gel de agarose

Para a purificação, o volume total do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Para cada 5 µl de amostra foi utilizado 1 µl de tampão de corrida (30% glicerol, 20mM EDTA e 100 µg/ml violeta cristal) . O gel foi corado em solução de violeta cristal (concentração final 40 µg/ml), que permite a visualização dos fragmentos de DNA em luz branca, evitando danos no DNA que poderiam ser causadas pela visualização sob radiação ultravioleta, quando o gel é corado com brometo de etídeo (5 µg/ml).

A banda formada pelo produto da PCR foi cortada e eluída do gel de agarose utilizando o kit de purificação *Perfectprep Gel Clean Up* (Eppendorf), conforme instruções do fabricante.

3.2 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO CPCSDaV AO VETOR pCR 2.1

A ligação foi realizada combinando-se os seguintes reagentes fornecidos pelo kit TA *cloning* pCR 2.1 (Invitrogen): 1 µl de tampão de ligação 10X, 4 µl de água destilada, 1 µl de enzima de ligação T4 DNA ligase, 2 µl de vetor (25 ng/µl), e 2 µl de produto de PCR, mantendo-se a proporção molecular de vetor:inserto de 1:3, numa reação de volume final de 10 µl.

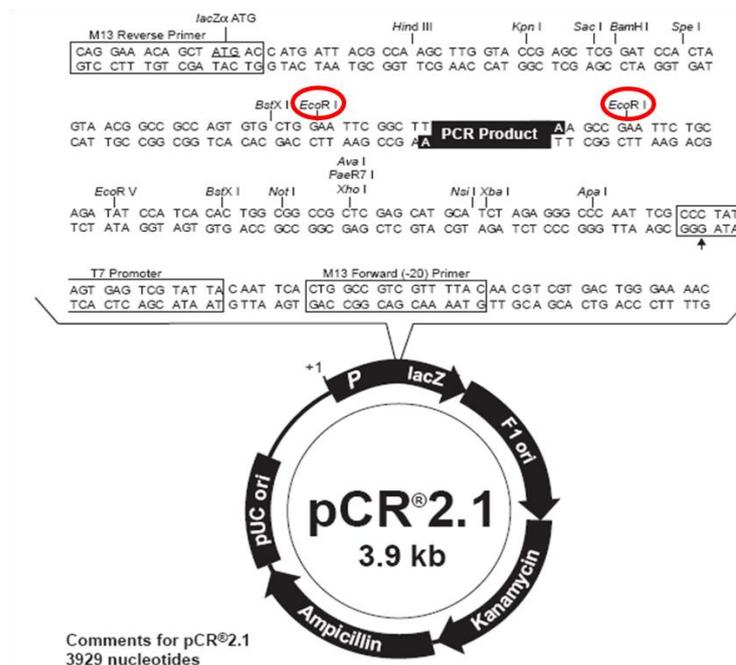


Figura 13- Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 (Invitrogen), que possui os genes de resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina, além de um sítio de multiclonagem onde o gene de interesse foi inserido, entre os sítios da enzima de restrição *Eco RI*.

Após a ligação, foi realizada a retirada dos sais da amostra (diálise), pois estes sais, quando entram em contato com o metal da cuveta, conduzem eletricidade e atrapalham a transformação. Por essa razão, a membrana de 0,025µm (MF-MilliporeTM Membrane Filters) foi colocada sobre água “milli-Q” e, no centro da membrana, 5 µl da ligação, permanecendo por 15 min.

3.2.1 Transformação em bactérias competentes *E. coli* por eletroporação

Foram utilizadas células de *E. coli* cepa DH5 α (Invitrogen) competentes para eletroporação. Estas células foram previamente preparadas seguindo o protocolo de Sambrook & Russel (2001) e estocadas em freezer a -80°C.

As bactérias foram transformadas por eletroporação sob 25 μ F de capacitância, 200 Ω de resistência e voltagem 1,8 KV em um eletroporador *Bio-Rad Gene Pulser*. Em um tubo de 1,5 ml contendo 50 μ l de células de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) eletrocompetentes, foi colocado 2 μ l de DNA ligado ao vetor pCR 2.1 e transferido para uma cuvette de eletroporação *Gene Pulser Cuvette* de 0,1 cm (Bio-Rad). Acoplada ao eletroporador, a cuvette foi submetida ao pulso elétrico. Em seguida, 800 μ l de meio SOC, (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), foi adicionado à cuvette, homogeneizado delicadamente e transferido para um tubo estéril, o qual permaneceu incubado por 1 h a 37°C sob uma agitação de 240 r.p.m.

Após a incubação, 200 μ l da transformação foi plaqueado, com auxílio de uma alça de Drigalski, em placa contendo LB ágar (SAMBROOK et al., 1989) com canamicina (50 μ g/ml).

3.2.2 Extração de DNA plasmidial e verificação da presença do inserto

As colônias que cresceram na placa foram selecionadas e, com auxílio de um palito de dente estéril, foram inoculadas em 5 ml de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) com canamicina (50 μ g/ml) e incubadas a 37°C sob agitação de 240 r.p.m. por aproximadamente 20 horas. A extração plasmidial foi feita utilizando-se o kit comercial *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos foram digeridos com a enzima *Eco* RI (Amersham Pharmacia), pois o vetor pCR 2.1 (Figura 13) possui esse sítio de restrição nas regiões flangeadoras do inserto. A reação foi realizada com volume final de 10 μ l utilizando as seguintes quantidades de reagentes: 1 μ l de tampão 10X específico para a enzima *Eco* RI, 0,1 μ l de BSA 100X (solução de albumina de soro bovino), 0,4 μ l de enzima *Eco* RI, 2 μ l (~200 ng) de plasmídeo e 6,5 μ l de água destilada. A liberação do inserto foi analisada em gel de agarose 1% e corado em brometo de etídeo (5 μ g/ml), utilizando o marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

3.3 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Com o objetivo de obter as sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados, foi realizado o sequenciamento automático dos plasmídeos obtidos. Para tanto, utilizou-se o sequenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377, e o sequenciamento ocorreu por meio de *di-deoxynucleotideos* marcados com fluoróforos *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence* (Amersham Biosciences). Foi usado o *primer* oriundo do vetor plasmidial.

Por meio da análise das sequências e eletroferogramas, foram selecionados clones de alta qualidade, contendo a CP e os sítios para a enzima de restrição *Nco I*. As sequências foram analisadas com o auxílio do *software* Staden Package (<http://staden.sourceforge.net/>).

3.4 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO CPCSDaV PARA CLONAGEM EM pFASTPH3

Após a seleção dos clones e confirmação por sequenciamento, estes foram digeridos com a enzima de restrição *Nco I*. Os fragmentos liberados correspondentes ao inserto (650 pb), foram eluídos do gel de agarose conforme item 3.1.2. Dessa forma, este fragmento de DNA, com as extremidades adesivas para a sequência de *Nco I*, está pronto para ser clonado no vetor pFastPH3 (COSTA, 2008), também digerido com a enzima *Nco I* e desfosforilado.

3.5 PREPARAÇÃO DO VETOR pFASTPH3

Para se obter pFastPH3 com capacidade de se ligar ao fragmento de interesse, este vetor foi linearizado com a enzima *Nco I*, eluído de gel de agarose conforme item 3.1.1, sendo em seguida desfosforilado com a enzima *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs, NEB), conforme a Tabela 4, com o objetivo de impedir que ele se feche sem receber o inserto.

Tabela 4 - Reagentes utilizados para a desfosforilação do vetor pFastPH3 linearizado com a enzima *Nco I*.

Reagentes	Volumes
Tampão 10X	5 µl
DNA (pFastPH3 linearizado)	25 µl
<i>Antarctic Phosphatase</i> (5u/ml)	1,0 µl
Água “milli-Q”	19 µl
Volume final	50 µl

A reação foi incubada por 30 min a 37°C em banho-maria. Posteriormente a enzima foi inativada a 65°C por 5 min.

Para purificar o vetor, todo o produto da desfosforilação foi purificado por precipitação por etanol, utilizando-se 1/10 do volume de 3M de acetato de sódio (pH 5,2), 2,5 volumes de etanol 100% gelado para a quantidade de DNA e 1 µl de glicogênio (1 mg/ml). Após incubar por 1 h em freezer -80°C, centrifugou-se a velocidade máxima por 15 min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml etanol 70% gelado. Centrifugou-se por mais 2 min em velocidade máxima. O pellet foi ressuscitado em 50 µl de água “milli-Q”.

3.6 CONSTRUÇÃO DO VETOR pFASTPH3-CPCSDaV

O vetor pFastPH3, originado do vetor pFastBac1, é um plasmídeo que permite que o inserto de interesse seja posteriormente transferido para o genoma de um baculovírus presente na forma plasmidial (bacmídeo) dentro de uma *E. coli* (DH10Bac, Invitrogen) por um mecanismo de transposição sítio-específica. O gene de interesse é inserido em um dos sítios presentes no sítio de multiclonagem e devem estar posicionados entre os sítios de transposição, logo após o promotor da poliedrina.

Uma das principais vantagens do vetor pFastPH3, para este trabalho, é a inserção do sítio da enzima de restrição *Nco* I no sítio de multiclonagem, logo após o gene da poliedrina. O inserto, que é flanqueado por sítios para *Nco* I, tem a capacidade de se inserir neste local, fusionando-se ao gene da poliedrina. Desta forma, quando o vírus recombinante se replica em cultura de células de inseto ocorre, além da produção de suas proteínas, a do inserto de interesse. Levando-se em consideração que a expressão do gene da poliedrina é conduzida a partir de um promotor forte e, por volta de 70 h.p.i., a poliedrina compõe cerca de 20-50% da proteína produzida pela célula infectada, estima-se uma boa produção da proteína recombinante de interesse, uma vez que esta encontra-se fusionada a este gene.

O fragmento CPCSDaV foi clonado em pFastPH3 utilizando-se 2 µl de tampão 10X T4 DNA Ligase (New England Biolabs, NEB), 1,5 µl enzima T4 DNA Ligase e aproximadamente 130 ng/µl de vetor para 40 ng/µl de inserto, num total de 20 µl de reação. A reação foi homogeneizada e incubada “over night” a 8°C. A ligação foi colocada em membrana de 0.02 µM (*Millipore*) sobre água “milli-Q” por 15 min, para a remoção de sais.

3.6.1 Transformação em bactérias *E. coli* por eletroporação

Foram utilizadas células de *E. coli* cepa DH5 α (Invitrogen) competentes para eletroporação, seguindo o mesmo procedimento já descrito no item 3.2.1. O antibiótico utilizado foi ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$).

3.6.2 Extração de DNA plasmidial e digestão com *Nco* I

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 ml de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), e incubadas a 37°C sob agitação de 240 r.p.m. por aproximadamente 20 h. A extração plasmidial foi feita utilizando-se o kit comercial *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Para confirmar se os plasmídeos continham o inserto, estes foram digeridos com a enzima *Nco* I (NEB). A presença do inserto foi confirmada em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (5 $\mu\text{g/ml}$) e visualizado em radiação ultravioleta.

3.6.3 Sequenciamento automático e análise das sequências

Para confirmar se o inserto estava na orientação correta dentro do vetor, foi realizado o sequenciamento nucleotídico dos plasmídeos obtidos. Para tanto, utilizou-se o sequenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377, e o sequenciamento ocorreu por meio de *di-deoxynucleotideos* marcados com fluoróforos *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence* (Amersham Biosciences). Foi usado o *primer* oriundo do vetor plasmidial.

Por meio da análise das sequências, foram selecionados apenas os clones que continham o inserto inserido na orientação correta. Para tanto, as sequências foram analisadas com o auxílio do *software* Staden Package (<http://staden.sourceforge.net/>).

3.7 OBTENÇÃO DO BACMÍDEO RECOMBINANTE BacCSDaV-Pol

Para obtenção do baculovírus recombinante foram utilizadas células competentes de bactéria *E. coli* DH10Bac (Invitrogen) que possuem, dentre as suas características especiais, o genoma completo de um baculovírus (*Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis*

virus, AcMNPV) na forma de um plasmídeo (bacmídeo) e o gene de resistência à canamicina, utilizado na seleção das colônias.

O bacmídeo possui uma pequena região de inserção, no locus da poliedrina, para o transposon Tn7, denominada *mini-attTn7*, e um plasmídeo *helper*, que codifica transposases necessárias para o evento de transposição entre o plasmídeo doador (pFastPH3 com o inserto) e o genoma do baculovírus inserido no bacmídeo. O vetor pFastPH3 contém os elementos Tn7L e Tn7R flanqueando o gene de interesse. A transposição ocorre entre os elementos Tn7L e Tn7R do vetor pFastPH3 e o sítio *mini-attTn7* do bacmídeo para gerar um bacmídeo recombinante contendo o gene de interesse.

As transformações foram feitas por choque térmico a 42°C, conforme instruções do fabricante. As colônias da bactéria DH10Bac nas quais ocorreu transposição foram selecionadas pela demonstração de resistência à canamicina, (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) e gentamicina (7 µg/ml). Os genes de resistência à tetraciclina (localizado no plasmídeo *helper*) e canamicina (localizado no bacmídeo) estão presentes em todas as bactérias DH10Bac, e o da gentamicina apenas nas bactérias nas quais os eventos de transposição obteve sucesso, pois está localizado entre os sítios de transposição de pFastPH3. Além disso, as colônias também foram identificadas pela cor branca mesmo na presença do substrato X-Gal e do indutor IPTG. A ausência de cor (colônias brancas) ocorre apenas se o gene da enzima β-galactosidase presente no bacmídeo for interrompido pelo evento da transposição. Caso isso não ocorra, o gene se mantém íntegro e permitirá que essa enzima seja produzida e aja sobre o seu substrato (X-Gal) causando a produção da cor azul.

Dessa forma, apenas as colônias brancas foram selecionadas para a extração do DNA do bacmídeo BacCSDaV-Pol, e com o auxílio de um palito de dente estéril, foram inoculadas em 3 ml de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) com canamicina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) e gentamicina (7 µg/ml). Os inóculos foram incubados a 37°C sob agitação de 240 r.p.m. por aproximadamente 20 h. A extração do DNA plasmidial foi feita seguindo orientações do fabricante (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen) e foi confirmada em gel de agarose a 1% conforme o item 3.1.5.

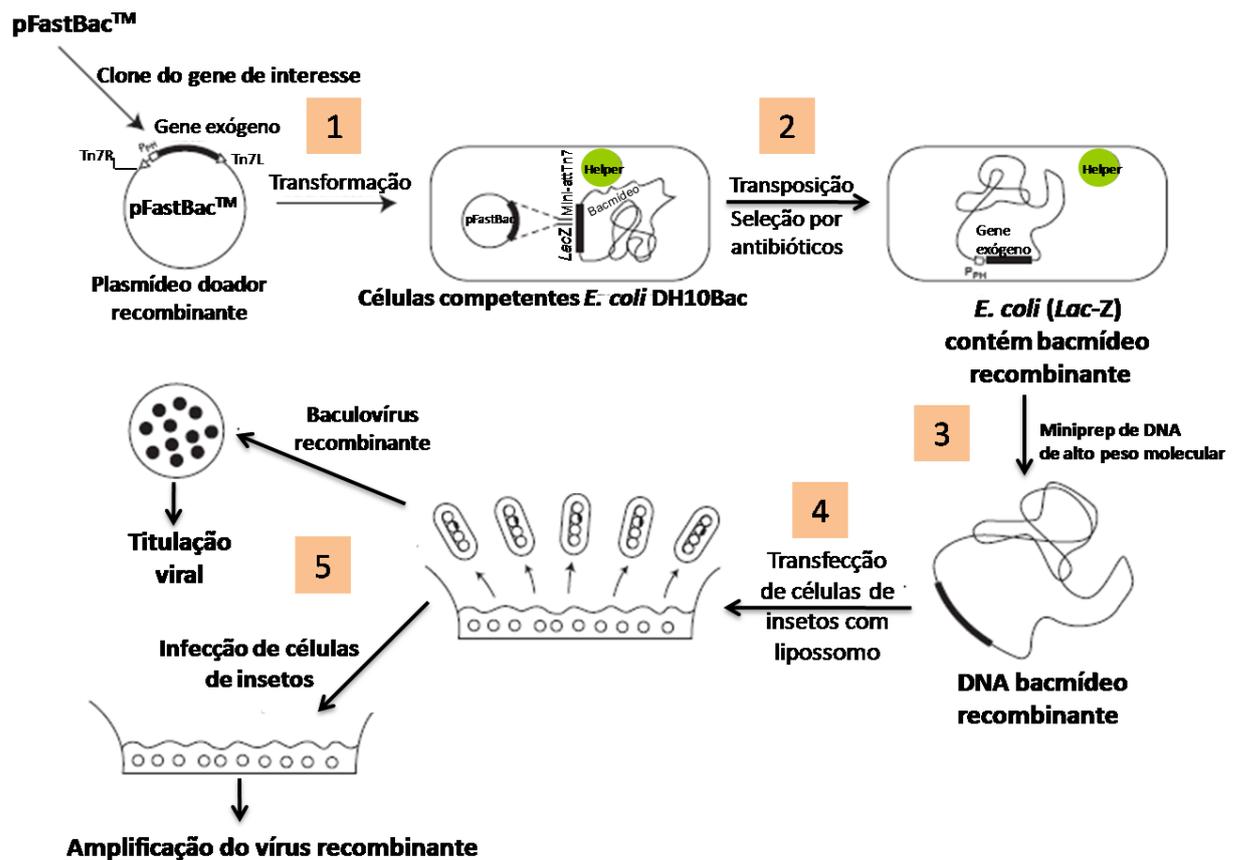


Figura 14 – Sistema Bac-to-Bac de Expressão. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contem o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse (1). Em seguida, o evento da transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização deste na transfecção de células de inseto (4). Com os vírus recombinantes obtidos pode ser feita a titulação viral ou a utilização para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). (Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual – Invitrogen).

3.8 CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO BACMÍDEO RECOMBINANTE POR PCR

Por se tratar de um DNA de alta massa molecular e baixo número de cópias, a confirmação de transposição é feita por PCR e não por restrição, conforme recomendação do fabricante.

Para verificar a presença e a orientação do inserto, utilizou-se duas combinações de *primers*: M13 *forward* utilizado junto ao *primer reverse* do gene de interesse e M13 *reverse* junto ao *primer* CPCSDaV *forward* (Tabela 5).

As quantidades dos reagentes que foram utilizados na PCR estão descritos na Tabela 6. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/2 min, 94°C/15 s, 35 ciclos de 60°C/30 s, 72°C/3 min e extensão final de 68°C/10 min. O resultado da PCR foi

confirmado em gel de agarose na concentração 1% e corado em brometo de etídeo (5 µg/ml). O bacmídeo recombinante foi denominado BacCSDaV-Pol.

Tabela 5 - Sequência dos *primers* utilizados para verificar a presença e a orientação do inserto no genoma do bacmídeo.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
M 13 <i>forward</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M 13 <i>reverse</i>	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
CPCSDaV <i>forward</i>	5' TCCATGGGCATTGAAGGCCGCATGGCCAGTGA 3'
CPCSDaV <i>reverse</i>	5' TCCATGGCACGCAGGAGATTACCGGAGGGG 3'

Tabela 6 - Reagentes utilizados na PCR para confirmar a construção do bacmídeo recombinante.

Reagentes	Volumes
Tampão 10X	2,5µl
dNTP 2,5mM	2 µl
<i>Primer M13 forward</i> 10µM	0,5 µl
<i>Primer CSDaV reverse</i> 10µM	0,5 µl
DNA do bacmídeo	0,5 µl
<i>Taq DNA polimerase pht</i> (5u/µl)	0,2 µl
Água “milli-Q”	18,3 µl
Volume final	25 µl

3.9 OBTENÇÃO DO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE vAcCSDaV

Cerca de $0,5 \times 10^6$ células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou TN5B) em cultura (GRANADOS et al., 1994), foram transferidas para uma placa de poliestireno de 60 mm de diâmetro, onde ficaram por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. O DNA do bacmídeo BacCSDaV-Pol (1µg) foi diluído em 0,5 ml de meio TC-100 sem soro, em uma placa de 35 mm de diâmetro. Em outra placa, dez microlitros de lipossomo (Cellfectin Reagent - Invitrogen) também foram diluídos em 0,5 ml de meio TC-100 sem soro e misturados à solução contendo o DNA, sendo incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos, sem

que isso perturbasse a monocamada formada e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 h. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27 °C por sete dias. O vírus recombinante originado foi denominado vAcCSDaV-Pol.

3.10 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DO DNA VIRAL POR PCR

O DNA viral foi purificado em pequena escala, seguindo o protocolo descrito por O'Reilly *et al.*, 1994. Após 168 h.p.i, o sobrenadante das células infectadas com o vírus recombinante vAcCSDaV-Pol foi coletado e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 2 min. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 14.000 r.p.m. por 15 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado no tampão “virus disruption buffer” (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0,25% SDS), acrescido de proteinase K na concentração de 500 µg/ml, e incubado a 37°C por pelo menos 16 h. O DNA viral foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), purificado por precipitação por etanol (conforme já descrito no item 3.5.1) e ressuscitado em 20 µl de água “milli-Q”. Para comprovar a presença do inserto no vírus recombinante, foi feita uma reação de polimerase em cadeia utilizando o DNA viral e uma combinação de *primers forward* e *reverse* de M13 e CPCSDaV (Tabela 5), que flanqueiam a região de inserção do gene no genoma do baculovírus.

3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA POR SDS-PAGE

O vírus vAcCSDaV-Pol replicado no meio de cultura foi coletado após 72 h da infecção e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 5 min. O sobrenadante (contendo os vírions) foi armazenado como estoque e o *pellet* (sedimento de células contendo poliedros) ressuscitado com 1 ml de tampão de fosfato salino - PBS (136 mM NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH 7,4) e centrifugado por 2 min em velocidade máxima. A lavagem foi repetida três vezes com PBS 1X, sendo que na última o *pellet* foi ressuscitado em 100 µl de tampão de eluição (Tris HCl 1M, pH 8,0, EDTA 0,5 M, pH 8,0). Foi retirado 10 µl desse material, onde foi adicionado o mesmo volume de tampão de corrida de proteína (1 ml Tris HCl 0,5M pH 6,8, 1,6 ml SDS 10%, 0,08 ml azul de bromofenol 0,05%, 0,8 ml glicerol, 0,16 ml 2-β-mercaptoetanol, 3,8 ml de água destilada) e incubado a 95°C por 5 min. A seguir, a

amostra foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%, conforme Laemmli (1970).

Os reagentes e respectivos volumes para a preparação do gel desnaturante de poliacrilamida estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Reagentes utilizados para fazer gel de poliacrilamida 12%.

Reagentes	*Gel concentrador 4%	*Gel separador 12%
Água	3,5 ml	2,45 ml
Acrilamida/Bis 30%	650 µl	3 ml
**Tris HCl 1,0 M pH 6,8	1,25 ml	1,9 ml
SDS 10%	50 µl	75 µl
APS 10%	50 µl	75 µl
TEMED	17 µl	12 µl

* volumes suficientes para um gel

** no gel separador 12% utiliza-se Tris HCl 1,5M, pH 8,8

3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA POR WESTERN BLOT

Após eletroforese em gel de poliacrilamida (corrida a 150 v e 300 mA), o gel foi transferido para membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Amersham Biosciences), onde foi feita a imunomarcação de acordo com o protocolo do fabricante (Amersham).

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana foi feita utilizando o equipamento *Trans-blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) e tampão de transferência Towbin (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol, pH 8,3). O gel, a membrana de PVDF e quatro papéis filtro foram incubados por 10 min neste tampão. Em seguida, montou-se o sanduíche, colocando-se dois papéis filtro, a membrana, o gel e mais dois papéis filtro sobre o gel. Para a transferência foi utilizada uma corrente de 15 V e amperagem de 150 por 40 min.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de PBS e leite em pó desnatado 3% por 1 h. Para a imunomarcação foi utilizado o anticorpo primário anti-HisTag (0,5 mg/ml), adquirido pela Invitrogen, que foi colocado sobre a membrana permanecendo em agitação de 60 r.p.m. por 2 h. A membrana foi devidamente lavada em PBS-Tween 0,1% e

incubada, por 1 h em agitação de 60 r.p.m., com o anticorpo secundário “Rabbit anti-mouse IgG”, conjugado à fosfatase alcalina (SIGMA). Após a lavagem da membrana com PBS-Tween 0,1%, a membrana foi revelada com Nitro-blue-tetrazolium (NBT) e BCIP (Zymed/Invitrogen).

3.13 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE vAcCSDaV-Pol A PARTIR DE CÉLULAS INFECTADAS

Para proceder às análises da expressão da proteína e extração do material utilizado nas imunizações dos camundongos, foi necessária uma maior quantidade de células infectadas com o vírus vAcCSDaV-Pol, uma vez que a expressão da proteína ocorre nas células. Com esse objetivo, foram preparadas três placas de 60 mm de diâmetro contendo meio TC-100 novo, com 10% de soro fetal bovino e aproximadamente $0,5 \times 10^6$ de células Tn5B. As placas foram deixadas por 1 h em repouso para a formação de monocamada de células. Após esse período, 100 μ l do estoque viral foi inoculado em cada placa, e incubadas em estufa a 27°C por 96 a 120 h, dependendo do progresso da infecção. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 5 min, sendo depois recuperado em tubo novo e guardado. As células infectadas foram ressuspendidas do fundo das placas com 1 ml de PBS 1X e centrifugadas por 2 min em velocidade máxima, formando um *pellet*. Este foi lavado três vezes com PBS 1X e ressuspendido em tampão de eluição, conforme já descrito no item 3.11.

3.14 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CSDaV-Pol

A proteína recombinante CSDaV-Pol foi dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a confecção da curva padrão, foram preparados 200 μ l de solução de albumina de soro bovino (BSA) a 2 mg/ml, e a partir dessa solução foram feitas, em tubos de microcentrífuga, as seguintes diluições seriadas em água “milli-Q”: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml e 0,125 mg/ml. O branco (controle) foi preparado com 800 μ l de água “milli-Q” e 200 μ l do reagente de Bradford (100 mg *Coomassie Brilliant Blue* BG-250; 50 ml etanol 95% e 100 ml ácido fosfórico 85%). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 min, transferidas para cuveta de quantificação *Standard Disposable Polystyrene Cuvette* 3,5 ml (Bio-Rad), e posteriormente submetidos à leitura de 595 nm no espectrofotômetro.

3.15 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Com o objetivo de garantir um anti-soro com alta especificidade, a proteína recombinante CSDaV-Pol, obtida a partir de cultura de células Tn5B, foi preparada de três maneiras diferentes:

- 1- Lavagem e ressuspensão do *pellet* com PBS 1X;
- 2- Extração da proteína a partir de gel de poliacrilamida;
- 3- Lavagem do *pellet* com PBS 1X e ressuspensão com carbonato de sódio 1 M (solubilização), seguido de diálise com tampão fosfato de sódio.

O sobrenadante das três placas preparadas para amplificação do estoque viral (item 3.13) foi retirado após 4-5 dias pós-infecção e guardado em geladeira. As células que ficaram no fundo das placas foram ressuspensas com 1 ml de PBS 1X e colocadas em tubos para microcentrífuga de 1,5 ml, seguindo-se o mesmo procedimento de lavagem já descrito no item 3.11. Após a última centrifugação, o *pellet* de dois tubos foi ressuspendido em 100 µl de PBS 1X (136 mM NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH 7,4). Essa amostra foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) (item 3.14), obtendo-se um valor de 1,5 µg/µl.

No terceiro tubo, o *pellet* foi ressuspendido com carbonato de sódio (Na₂CO₃), que é um reagente de pH básico, em torno de 11,5, e por esse motivo foi usado, pois o *pellet* contém os poliedros, que se dissolvem em pH básico, tornando as proteínas solúveis.

O *pellet* foi ressuspendido com 500 µl de carbonato de sódio 0,1 M fresco, permanecendo por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se à amostra Tris HCl 1M, pH 7,4 (concentração final 0,1 M) para neutralizar a solução (O'REILLY et al., 1994). O volume total foi colocado em tubo de celulose para diálise (SIGMA) e fechado com presilhas, conforme instruções do fabricante. O tubo foi colocado em um Becker contendo 500 ml de tampão fosfato de sódio gelado (NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂PO₄x2H₂O 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4), permanecendo sob agitação por 1 h, a 10 °C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, trocando-se o tampão ao final de cada hora.

Para o gel de poliacrilamida, foram retirados 10 µl da amostra anteriormente ressuspendida com PBS 1X, onde foi adicionado o mesmo volume de tampão de corrida de proteína, procedendo-se conforme já descrito no item 3.11. Foram aplicados

aproximadamente 20 µl em cada poço do gel de poliacrilamida (Tabela 7). Após corar o gel com azul de coomassie (10% ácido acético, 40% metanol, 0,1% *Coomassie Blue*), as bandas correspondentes à proteína foram cortadas do gel e maceradas em tubo de microcentrífuga com PBS 1X.

3.16 IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Camundongos machos da linhagem isogênica Balb-C foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em ambiente com temperatura controlada, com água e ração estéreis em livre demanda.

Os camundongos receberam 3 injeções subcutâneas com intervalos de 15 dias, segundo protocolo descrito por Harlow e Lane (1988). Foram utilizados quatro camundongos de três meses de idade. Dois foram imunizados com a proteína recombinante, extraída a partir de gel de poliacrilamida 12%, um com a proteína no estado solúvel após ressuspensão com carbonato de sódio e posterior processo da diálise com tampão fosfato e o outro com o *pellet* lavado e ressuspendido em PBS 1X. As bandas que foram recortadas de gel de poliacrilamida continham um valor aproximado de 10 µg de proteína. Estas foram maceradas com aproximadamente 200 µl de PBS 1X em tubo de microcentrífuga, onde foi adicionado o mesmo volume de adjuvante de Freund completo (SIGMA), para a primeira imunização. Para a segunda imunização, o protocolo seguido foi o mesmo, porém adicionando-se à amostra o adjuvante incompleto de Freund. A terceira injeção foi feita apenas com as amostras, sem nenhum adjuvante. Sete dias após a terceira imunização, foram retirados cerca de 1 ml de sangue arterial, que foi centrifugado a 5.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi retirado e estocado a -20 °C para ensaios de Western Blot.

4. RESULTADOS

4.1 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO INSERTO CPCSDaV

Inicialmente, foram feitas PCR para amplificar o gene da CP de CSDaV. A avaliação dos produtos de PCR confirmou a amplificação do DNA de tamanho esperado (aproximadamente 650 pb), que corresponde ao gene da CP contendo sítios para a enzima *Nco* I flanqueando esta região e a sequência para a protease Fator Xa (Figura 15).

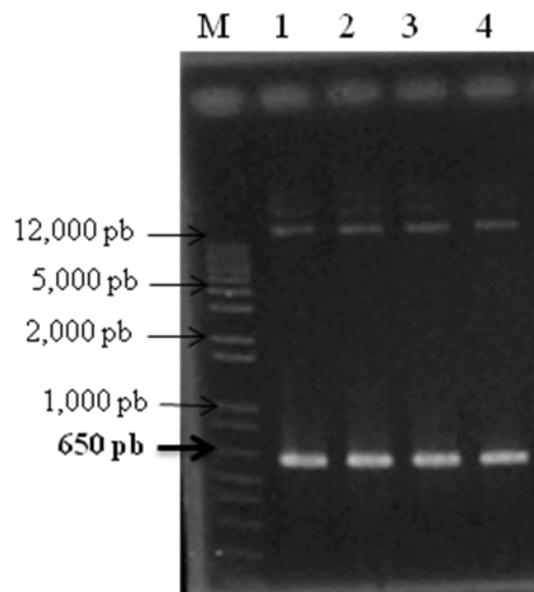


Figura 15- Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação da PCR do fragmento de DNA da CP utilizando os primers *CP forward* e *CP reverse*. M- marcador molecular 1kb *Plus DNA Ladder*. Poços 1, 2, 3 e 4- resultado das reações de polimerase em cadeia. A seta em negrito, à esquerda, indica um fragmento de aproximadamente 650 pb referente ao inserto.

Após a PCR, os fragmentos amplificados foram eluídos a partir do gel de agarose (item 3.1.1), ligados ao vetor pCR 2.1 (item 3.2) e transformados em bactérias *E. coli* cepa DH5 α por eletroporação (item 3.2.1). Quatorze colônias foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial, que foi confirmada em gel de agarose 1%.

Seis clones (1, 3, 4, 10, 11 e 14), com diferentes padrões de bandas, foram escolhidos (Figura 16) e digeridos com a enzima de restrição *Eco* RI, pois os sítios de reconhecimento desta enzima flanqueiam a região de inserção do fragmento clonado (650 pb). Assim, o inserto deve se desprender do vetor.

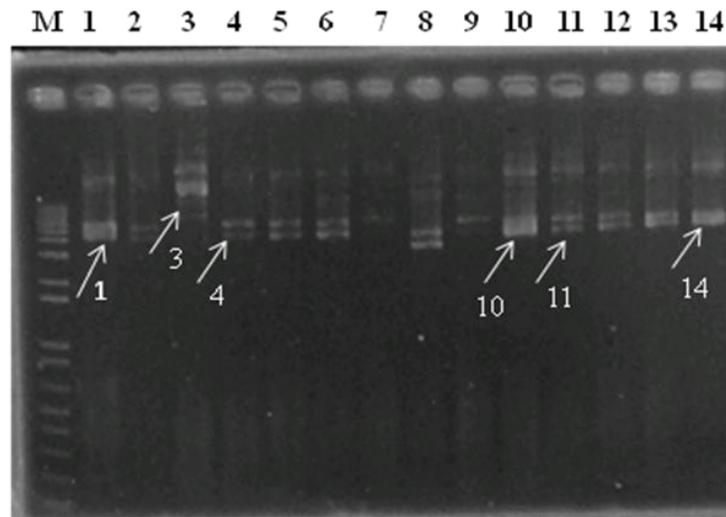


Figura 16- Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a presença de DNA após a extração plasmidial. M-Marcador molecular *1 kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 14- resultado da extração de DNA plasmidial das 14 colônias selecionadas. As setas indicam as amostras que foram escolhidas para análise de restrição com a enzima *Eco RI*.

Dentre os seis clones selecionados, quatro continham o fragmento de tamanho esperado (1, 10, 11 e 14). Na figura 17 são mostrados os resultados obtidos após a digestão. Nela é possível observar duas bandas predominantes, sendo o fragmento maior correspondente ao tamanho do vetor pCR 2.1 linearizado sem o inserto (3,9 kb) e a outra banda possui o tamanho correspondente ao fragmento de 650 pb clonado.

As quatro amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento automático (item 3.3) e, por meio da análise das sequências, foram selecionados clones que obtiveram leitura de alta qualidade no sequenciamento, mantendo a sequência de códons esperados.

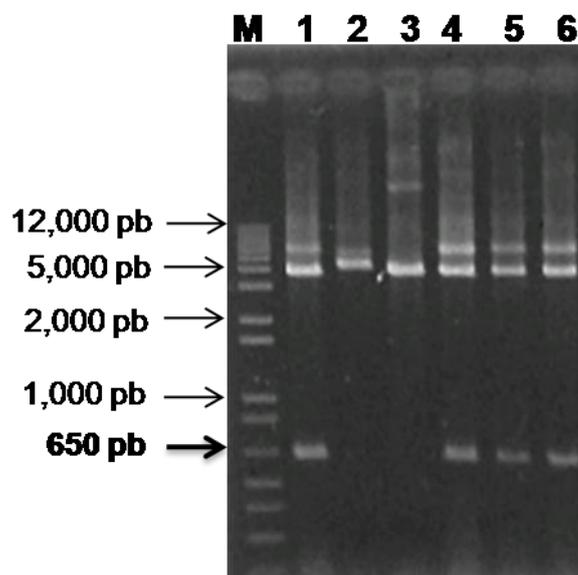


Figura 17- Análise de restrição dos possíveis clones. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M-Marcador molecular *1 kb Plus DNA Ladder*. Poços 1, 4, 5 e 6 - plasmídeo pCR 2.1 digerido com *Eco RI*,

apresentando duas bandas, uma de 3.900 pb, referente ao plasmídeo e outra de 650 pb referente ao inserto (seta em negrito). Poços 2 e 3 - amostras negativas para a análise de restrição. Essas amostras podem não terem recebido o inserto ou não sofreram digestão completa.

4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR pFASTPH3-CPCSDaV

Os clones selecionados por sequenciamento foram digeridos com a enzima de restrição *Nco* I (Figura 18) e o fragmento de DNA liberado, correspondente ao gene da CP, foi purificado a partir de gel de agarose 1% (item 3.1.1). O vetor pFastPH3 também foi digerido com a enzima *Nco* I e eluído a partir de gel de agarose 1%, sendo em seguida desfosforilado e purificado por precipitação por etanol, conforme item 3.5. A ligação foi realizada (item 3.6), e utilizada na transformação, por eletroporação, de células competentes de *E. coli* DH5 α (item 3.2.1).

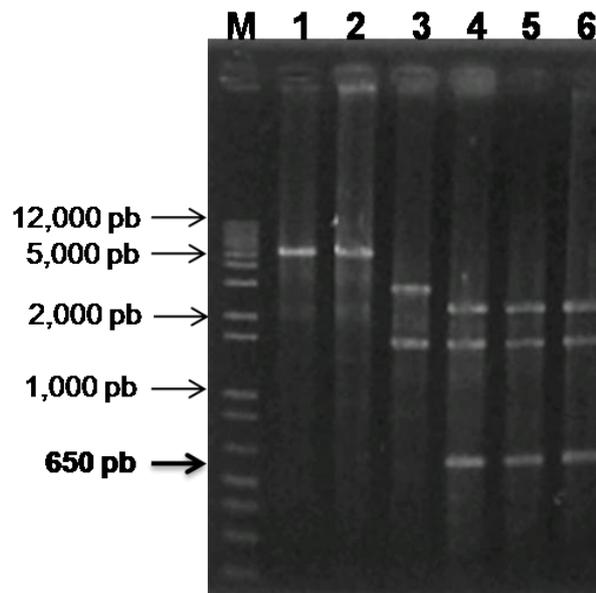


Figura 18- Eletroforese em gel de agarose 1%. M - marcador *1 Kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 e 2- vetor pFastPH3 linearizado com *Nco* I, apresentando tamanho de aproximadamente 5.500 pb. Poços 3 a 6- vetor pCR 2.1 após ligação com o inserto e digerido com *Nco* I. O inserto foi visualizado apenas nos poços 4, 5 e 6 (650 pb, em negrito).

Para a extração de DNA plasmidial foram escolhidas doze colônias (Figura 19), e destas, apenas três (3, 9 e 10), foram digeridas com a enzima de restrição *Nco* I. A eletroforese em gel de agarose 1% mostrou que as três amostras possuíam o inserto de tamanho esperado, pela visualização do fragmento de 650 pb e pela diferença de tamanho entre vetor digerido e não digerido (Figura 20).

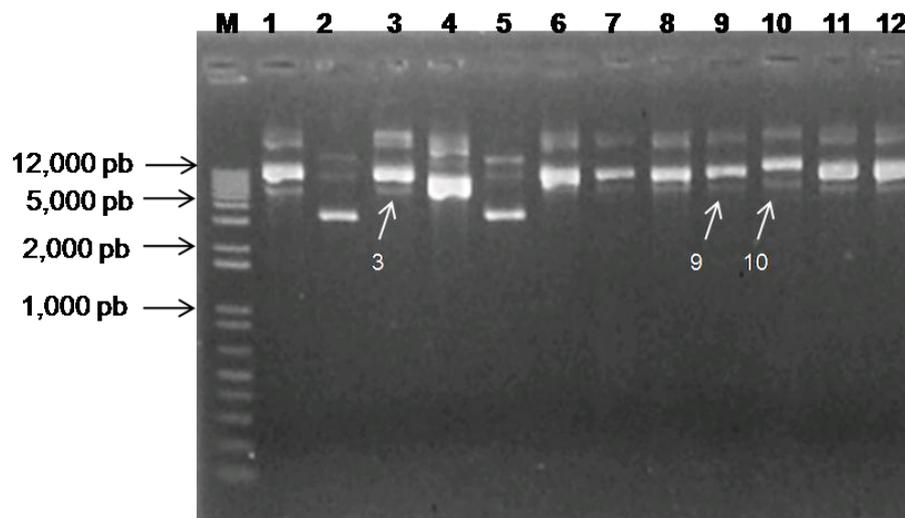


Figura 19- Gel de agarose 1% mostrando o resultado da extração de DNA plasmidial do vetor pFastPH3 ligado ao fragmento CPCSDaV. M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 12- resultado da extração de DNA plasmidial das 12 colônias selecionadas. As setas indicam as três amostras selecionadas para análise com enzima de restrição.

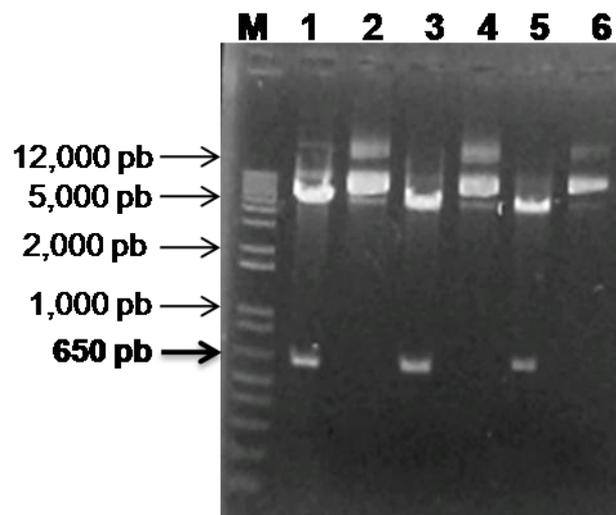


Figura 20- Análise de restrição de possíveis clones. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1, 3 e 5 - vetor pFastPH3 digerido com *Nco* I apresentando duas bandas, uma de 5.500 pb referente ao plasmídeo e outra de 650 pb referente ao inserto. Poços 2, 4 e 6 - vetor pFastPH3 com o inserto, sem digerir (controle negativo das amostras que foram digeridas).

A orientação do inserto foi confirmada por sequenciamento e os clones 1 e 3 foram selecionados para serem transformados em *E. coli* DH10Bac, com o objetivo de obter bacmídeos recombinantes.

4.3 OBTENÇÃO DO BACMÍDEO RECOMBINANTE BacCPCSDaV

Após confirmação da presença e da orientação do inserto no vetor pFastPH3, foi feita a transformação deste em bactérias *E. coli* DH10Bac por choque térmico (item 3.7), e, através de um evento de transposição, o inserto foi transferido do plasmídeo para o genoma de um

baculovírus na forma plasmidial (bacmídeo) dentro dessa bactéria, originando o bacmídeo recombinante BacCPCSDaV. Quatorze colônias brancas foram escolhidas e o DNA foi extraído para análise em gel de agarose 1% (Figura 21).

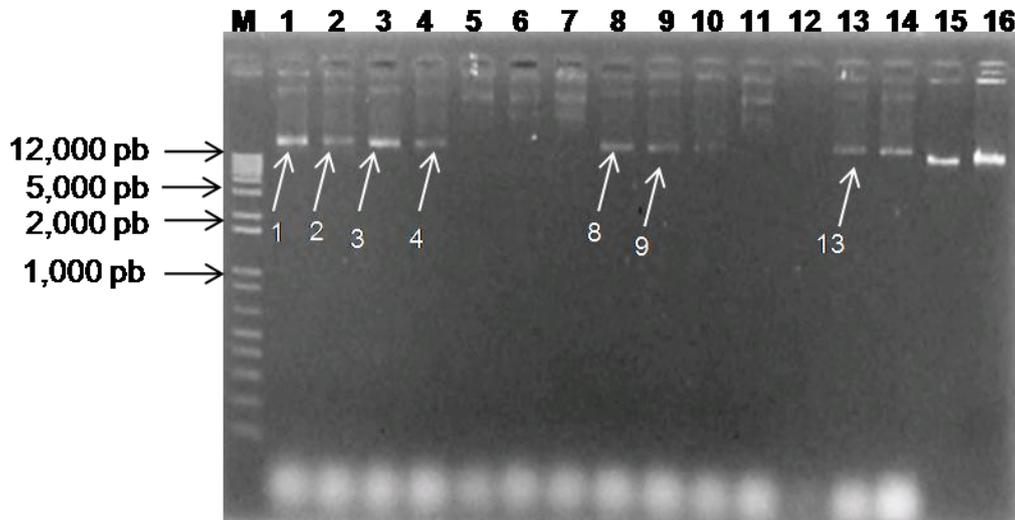
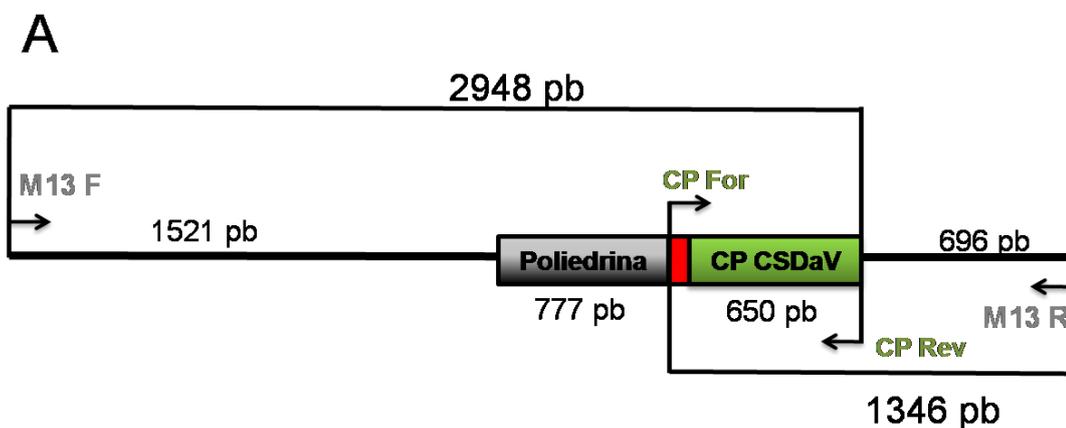


Figura 21- Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a presença de DNA em bacmídeos recombinantes. M- Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 16 - resultado da extração de DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes. As setas indicam as sete colônias escolhidas para a confirmação da construção dos bacmídeos recombinantes por PCR.

Sete (1, 2, 3, 4, 8, 9 e 13) dos quatorze clones foram escolhidos para confirmar a construção dos bacmídeos, por PCR, conforme recomendação do fabricante. A PCR utilizando 1 μ l do DNA do bacmídeo recombinante (100 ng) BacCPCSDaV amplificou um fragmento de aproximadamente 3.000 pb (Figura 22 A), conforme esperado quando os primers M13 *forward* e CPCSDaV *reverse* foram utilizados. Este fragmento corresponde ao tamanho do bacmídeo (aproximadamente 1.500 pb) com o inserto (~650 pb) e o gene da poliedrina (~777 pb).



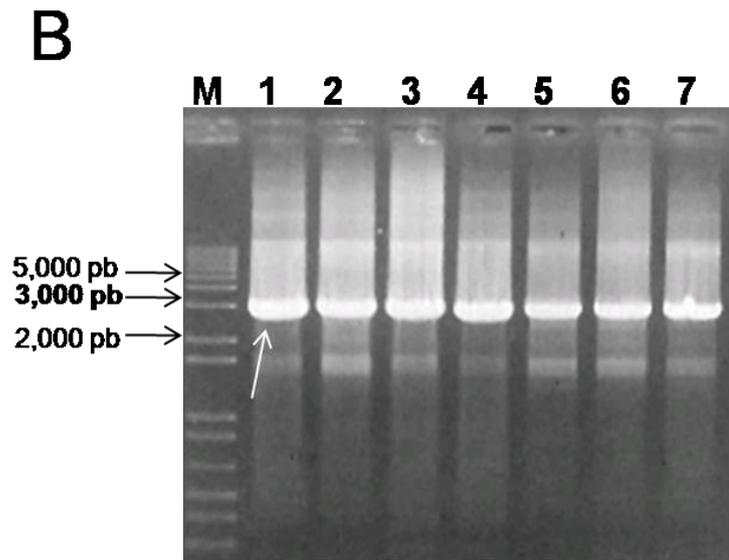


Figura 22- Confirmação da transposição do gene de interesse (CPCSDaV) para o DNA do bacmídeo. A) Esquema representativo da posição dos *primers* no genoma do bacmídeo. Amplificações por PCR utilizando diferentes combinações desses *primers* podem confirmar a transposição e orientação do inserto no bacmídeo, de acordo com os tamanhos esperados dos fragmentos. *Primer* M13 *forward* junto ao *primer* reverso do gene de interesse, espera-se fragmentos de aproximadamente 3.000 pb, e *primer* M13 reverso junto ao *primer* CPCSDaV *forward*, fragmentos de aproximadamente 1.350 pb. B) Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 a 7 - produtos da PCR utilizando os *primers* M13 *forward* e CP *reverse*, obtendo-se a banda esperada de aproximadamente 3.000 pb.

4.4 OBTENÇÃO DO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE vAcCSDaV

Um micrograma do bacmídeo BacCPCSDaV foi utilizado na transfecção em células *Trichoplusia ni* (Tn5B), originando o vírus recombinante vAcCSDaV. Após 72 h da transfecção, as células infectadas apresentaram efeitos citopáticos, como arredondamento celular e formação de poliedros no núcleo das células, como foi possível observar por microscópio óptico (Axiophot) (Figura 23). O DNA viral foi purificado e submetido a uma PCR para confirmação da presença do gene CPCSDaV no baculovírus. A PCR utilizando os *primers* M13 *forward* e CPCSDaV *reverse* amplificou um fragmento de aproximadamente 3.000 pb, e a combinação de *primers* M13 *reverse* e CPCSDaV *forward*, um fragmento em torno de 1.300 pb, ambos os resultados conforme o esperado (Figura 22 B). Estes resultados foram visualizados em gel de agarose 1% (Figura 24).

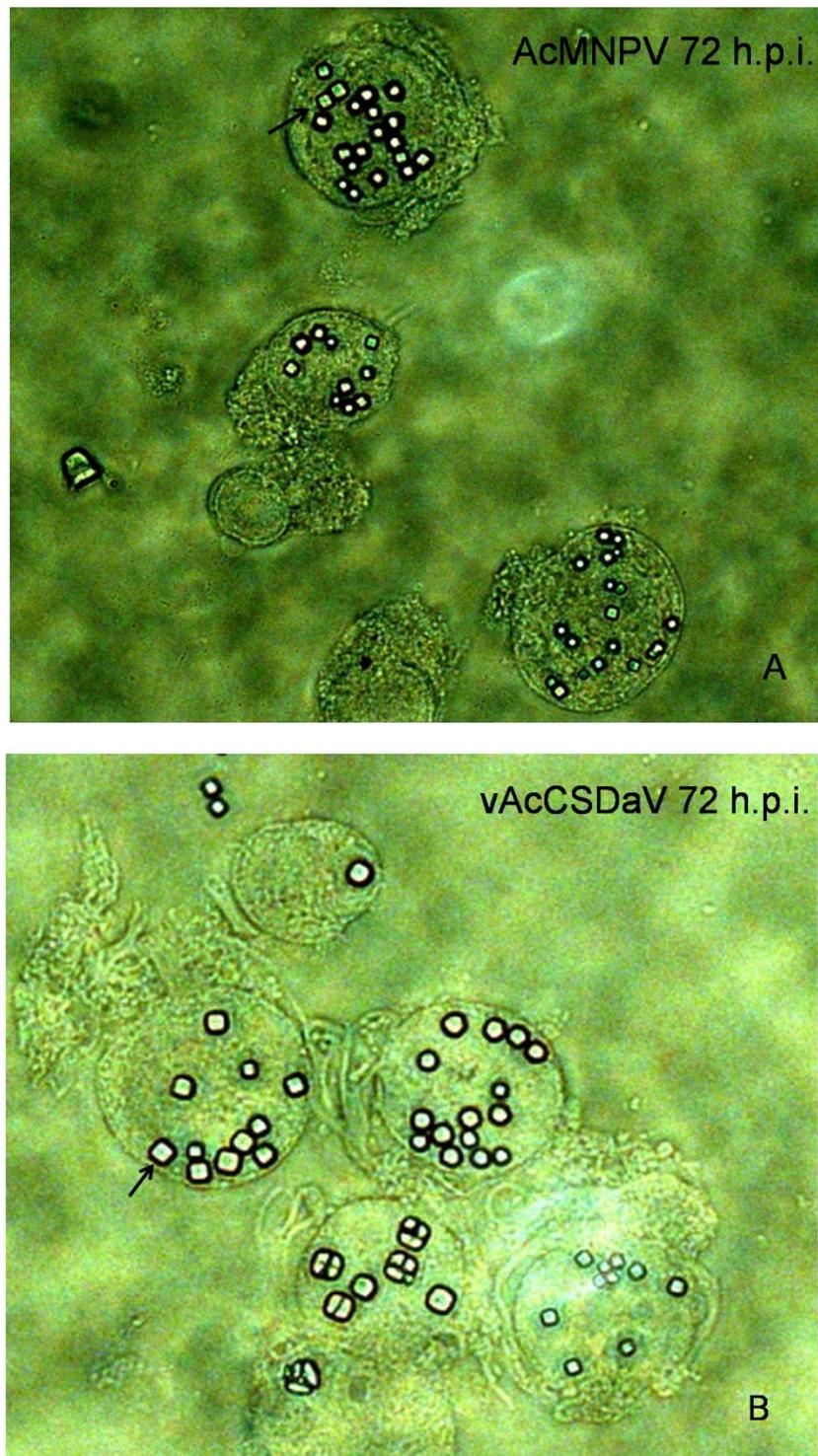


Figura 23 – Microscopia óptica mostrando poliedros no interior de células de inseto Tn5B, em aumento de 400x. A) Poliedros formados pelo vírus selvagem AcMNPV 72 h.p.i. B) Poliedros formados pelo vírus recombinante vAcCSDaV 72 h.p.i. As setas indicam os poliedros no interior da célula.

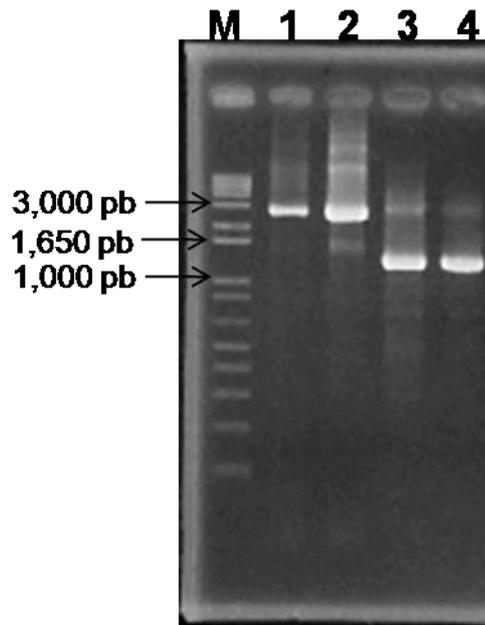


Figura 24- Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a obtenção do baculovírus recombinante por PCR. M - Marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*. Poços 1 e 2 – resultado da PCR utilizando os *primers* M13 *forward* e CPCSDaV *reverse*. Poços 3 e 4 - resultado da PCR utilizando os *primers* CPCSDaV *forward* e M13 *reverse*.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CSDaV-Pol EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E IMUNO-DETECÇÃO (WESTERN-BLOT)

O vírus vAcCSDaV foi amplificado em placas de cultura de células Tn5B. Após sete dias, o sobrenadante foi retirado e guardado como estoque viral. A placa foi lavada com 1 ml de PBS 1X, que foi centrifugado e o *pellet* ressuscitado com 1 ml de PBS 1X, repetindo-se esta lavagem por três vezes. Por último, o *pellet* foi ressuscitado com 50 µl de PBS 1X. Esse material foi utilizado para análise da expressão da proteína CSDaV-Pol em dois géis desnaturantes de SDS-PAGE 12%, em duplicata, sendo um corado em solução de “Coomassie blue” e o outro utilizado para a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF, para o experimento de imuno-deteção. A membrana foi marcada com o anticorpo anti-HisTag (SIGMA), que detectou uma proteína de aproximadamente 55 kDa (Figura 25), que corresponde ao gene da poliedrina (29 kDa) fusionado com o inserto (23 kDa).

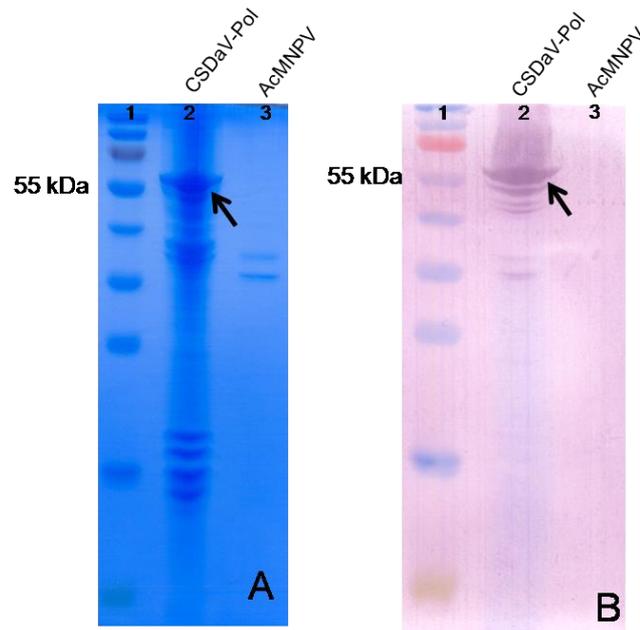


Figura 25 – SDS-PAGE e Imuno-marcação de extrato de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV, confirmando a expressão da proteína recombinante. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com o vírus vAcCSDaV; Poço 3- extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV. A seta indica a proteína de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com anticorpo anti-HisTag. A ordem das amostras nos poços 1, 2 e 3 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação por anticorpo na altura de aproximadamente 55 kDa.

4.6 ANÁLISE DOS ANTI-SOROS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS

Quatro camundongos foram imunizados com a proteína recombinante preparada de três maneiras diferentes, e todos produziram os anti-soros, porém com algumas diferenças quanto à especificidade.

O anti-soro produzido a partir do pellet ressuspendido com PBS 1X detectou a proteína recombinante CSDaV-Pol (Figura 26 B, poço 2), apesar de também terem aparecido algumas bandas inespecíficas, que provavelmente são proteínas provenientes das células de inseto, conforme confirmado por western blot utilizando o anticorpo anti-HisTag (Figura 27). Deve-se também levar em consideração que o anti-soro não apresentou o mesmo padrão de bandas nas reações com os controles (Figura 26 B, poços 3 e 4), o que demonstra que o anti-soro possui alguma especificidade. Dessa forma, pode-se cogitar a possibilidade da utilização deste anti-soro para fins diagnósticos do vírus CSDaV, uma vez que plantas não contêm proteínas de células de insetos. Para tanto, ainda são necessários testes com partículas virais preparadas a partir de plantas infectadas com CSDaV.

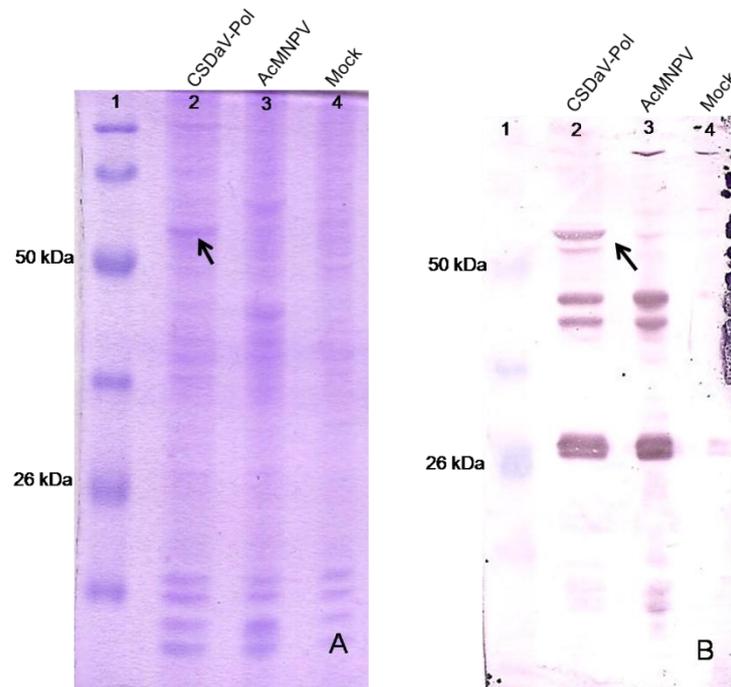


Figura 26– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar e ressuspender o *pellet* com PBS 1X; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica a proteína na altura de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida a partir do *pellet* lavado e ressuspensionado com PBS 1X. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo, na altura aproximada de 55 kDa, conforme esperado.

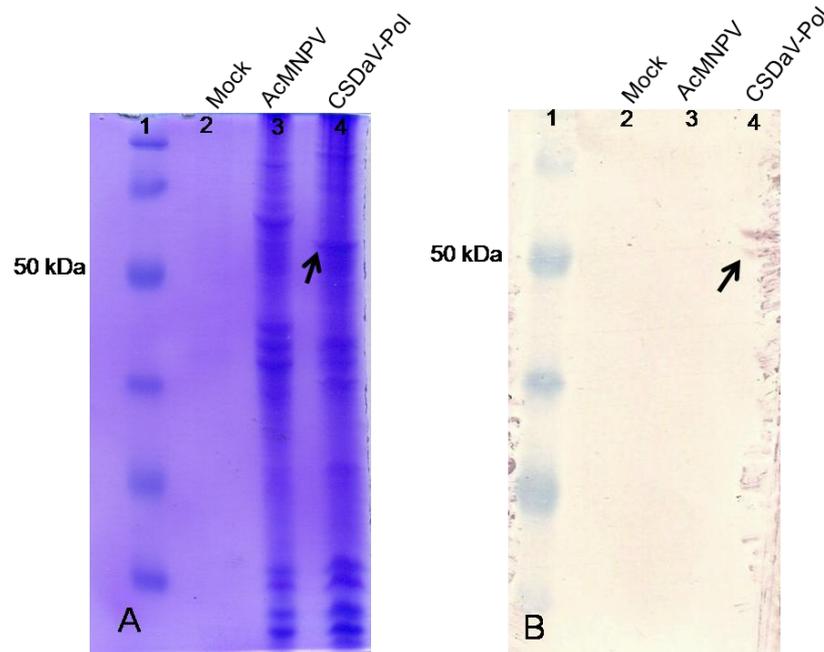


Figura 27– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extrato de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células não infectadas (mock); Poço 3- extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- extrato de células infectadas com o vírus vAcCSDaV. A seta indica a proteína recombinante na altura de 50 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com anticorpo anti-HisTag. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo na altura de ~55 kDa.

Este mesmo resultado foi observado com o anti-soro produzido utilizando-se a proteína dialisada com tampão fosfato de sódio (Figura 28), porém a reação com CSDaV-Pol foi menos intensa, provavelmente devido à perda de proteína que ocorre durante a diálise.

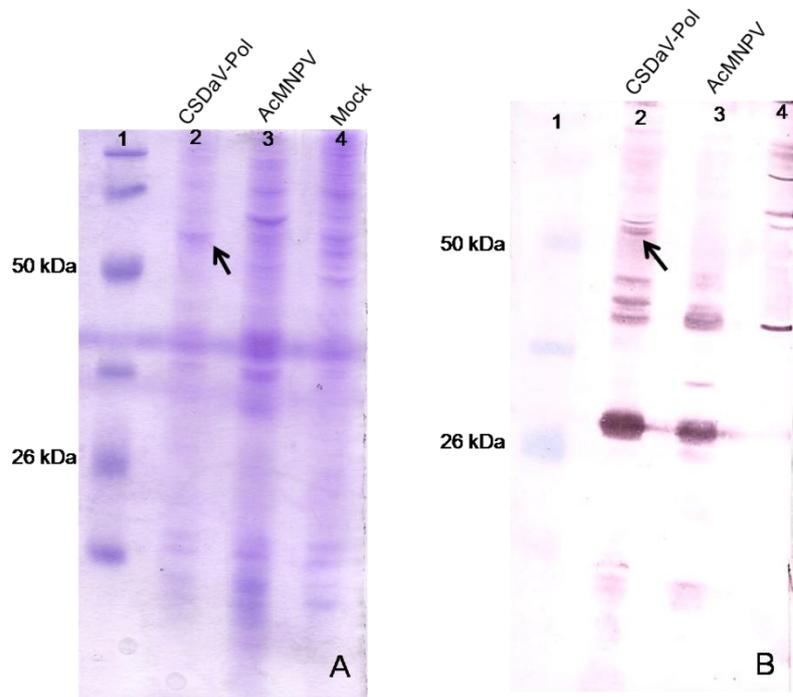


Figura 28- SDS-PAGE e Imuno-marcção de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar o *pellet* com PBS 1X, ressuspender com carbonato de sódio e dialisar com tampão fosfato de sódio; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica a proteína recombinante na altura de aproximadamente 55 kDa. B) Membrana de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida após o processo de diálise com tampão fosfato de sódio. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. A seta indica a marcação pelo anticorpo na altura de aproximadamente 55 kDa, conforme esperado.

Os dois anti-soros produzidos contra a proteína extraída a partir de gel de poliacrilamida apresentaram resultados iguais, conforme pode ser visto na Figura 29. Ambos detectaram uma proteína na posição referente à CSDaV-Pol (poço 2), e não houve formação de outras bandas com esta amostra. No entanto, nos controles (poços 3 e 4) foram detectadas proteínas apresentando o mesmo padrão de bandas da amostra. Esta marcação pode não ser a proteína-alvo, pois, conforme confirmado por western blot com anti-HisTag (Figura 27), esta não se trata da proteína CSDaV-Pol.

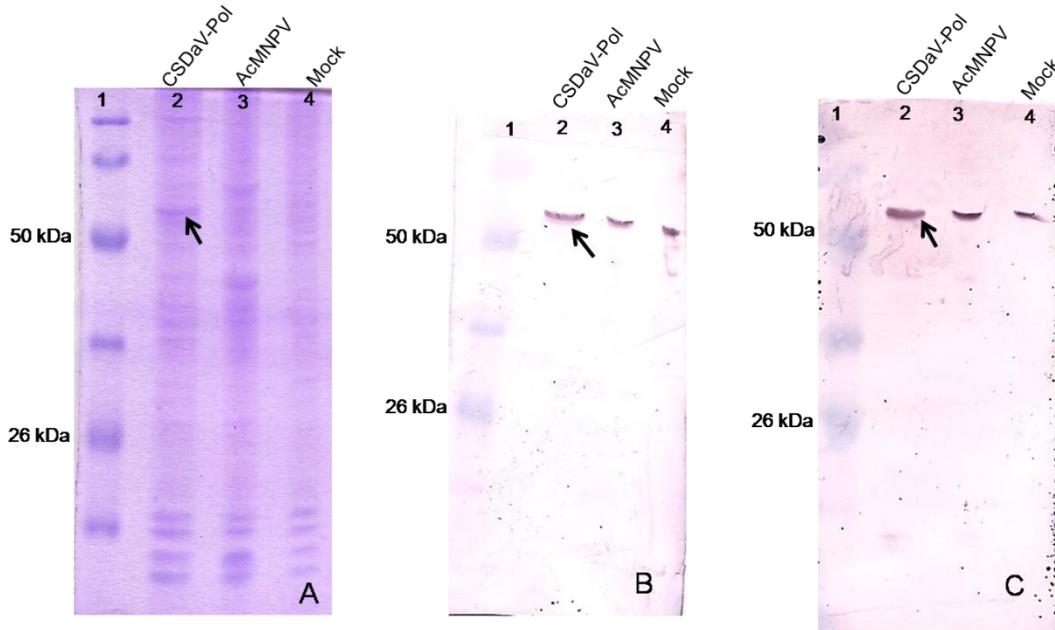


Figura 29– SDS-PAGE e Imuno-marcação de extratos de células Tn5B infectadas com o vírus vAcCSDaV. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1- marcador de massa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas); Poço 2- extrato de células infectadas com vAcCSDaV, após lavar e ressuspender o *pellet* com PBS 1X; Poço 3- Extrato de células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; Poço 4- Extrato de células não infectadas (mock). A seta indica uma proteína de aproximadamente 55 kDa. B e C) Membranas de PVDF marcada com o anti-soro produzido em camundongos imunizados com a proteína obtida a partir de gel de poliacrilamida. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3 e 4 é a mesma que foi descrita para A. As setas na altura de aproximadamente 55 kDa indicam a marcação pelos anti-soros.

5. DISCUSSÃO

A morte súbita do citros (MSC) é uma doença que tem causado grande prejuízo econômico na citricultura brasileira. Vários esforços já foram reunidos na tentativa de se obter um método de detecção precoce dessa doença, pois, as medidas que se tem até agora são baseadas na observação em campo, ou seja, depois que a planta já está infectada há algum tempo e destinada ao definhamento, podendo ainda já ter disseminado a doença pelo talhão, causando a destruição do pomar.

O agente etiológico da MSC ainda é desconhecido. Estudos apontam para o *Citrus sudden death-associated virus* como o causador da doença, entretanto, sua ocorrência e aparecimento dos sintomas ainda tem que ser estudados. Para tal fim, a produção de anticorpo específico ao CSDaV, que não tem reação cruzada com *Citrus tristeza virus* (CTV), é extremamente importante para identificar o causador da doença.

Atualmente, diferentes sistemas de expressão gênica podem ser empregados visando uma maior produção de proteínas facilitando o processo de purificação. Em sistemas procarióticos, a bactéria *E. coli* é bastante utilizada, principalmente pela facilidade de manipulação e manutenção de culturas bacterianas, além da grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida em pouco tempo. No entanto, apresenta desvantagens quanto à qualidade e funcionalidade das proteínas produzidas, uma vez que a produção protéica bacteriana é bem mais simples que a de uma célula eucariótica, não ocorrendo modificações pós-traducionais que são necessárias para que a proteína se torne biologicamente ativa. Houve a tentativa de expressar a proteína da capa (CP) de CSDaV em *E. coli*, porém o anti-soro produzido não foi capaz de reconhecer o vírus CSDaV selvagem. (Dr. Harakava, R., Instituto Biológico, SP, comunicação pessoal).

A expressão em leveduras é um sistema alternativo para substituir as bactérias, pois combina fácil manipulação e crescimento rápido característico dos procariotos com a maquinaria subcelular para realizar modificações pós-traducionais das células eucarióticas (CREGG et al., 1993). Em 2006, Barros e colaboradores realizaram um trabalho pioneiro utilizando a levedura *Pichia pastoris* como vetor de expressão de proteína da capa protéica de CSDaV, na tentativa de ser utilizada como antígeno na produção de anticorpos para o

diagnóstico do vírus. No entanto, não foi possível confirmar a eficiência da expressão de proteína viral vegetal em *P. pastoris* para tal finalidade.

O sistema de expressão em baculovírus utilizando células de inseto representa um sistema relativamente simples e eficiente, quando comparado a outros sistemas de expressão eucarióticos. Utilizando esse sistema, Alves-Júnior et al. (2008) conseguiu expressar a capa protéica de uma espécie de vírus que infecta plantas de alho (*Allium sativum* L.). A proteína, expressa de forma solúvel, foi utilizada para imunizar coelhos, e os anticorpos produzidos se mostraram específicos contra a CP do vírus, contudo apresentaram baixo título.

Diante disso, a utilização de vetores baculovirais capazes de produzir proteínas fusionadas à poliedrina apresentou-se, então, como um sistema mais eficiente de obtenção da CP para eliciação da resposta imune utilizando o sistema de expressão baculoviral. A principal vantagem trazida por esse sistema é a facilitação da purificação da proteína. Além disso, é possível obter boa quantidade de proteína, uma vez que, de acordo com Je et al. (2003), vírus recombinantes expressando uma proteína de fusão contendo a poliedrina formam poliedros se a poliedrina nativa também estiver sendo expressa. Este é o caso do vetor pFastPH3 utilizado neste trabalho.

Dessa forma, o sistema baculovírus de expressão foi escolhido como sendo o mais apropriado para a expressão da capa protéica do CSDaV, utilizando a estratégia de fusão da proteína-alvo com a poliedrina do baculovírus selvagem AcMNPV. Visto que o CSDaV utiliza a maquinaria da célula vegetal para expressar suas proteínas virais, a CP é naturalmente expressa sob condições eucarióticas. Assim, os anticorpos a serem produzidos e utilizados no diagnóstico do vírus devem ser capazes de reconhecer a proteína viral nativa.

As células infectadas com o baculovírus recombinante vAcCSDaV apresentaram, após 72 h.p.i., efeitos citopáticos, como o arredondamento celular e hipertrofia nuclear, ocorrendo também a formação de poliedros (Figura 23 B). Porém, a formação dos corpos de oclusão mostra apenas que estava ocorrendo a expressão da proteína poliedrina, mas não esclarece se ela estava sendo expressa fusionada a uma cauda de hexa-histidina. Para comprovar a presença da proteína de fusão foi feita a análise, por SDS-PAGE e Western Blot, da expressão de proteínas em células infectadas com o vírus vAcCSDaV. Esta análise deixou claro que a proteína recombinante CSDaV-Pol estava sendo expressa, pois foi detectada, utilizando o anticorpo contra a cauda de hexa-histidina, uma proteína com massa molecular superior ao da

poliedrina nativa e ausente em células infectadas com o vírus AcMNPV selvagem (Figura 25).

Do ponto de vista de reconhecimento da proteína CSDaV-Pol, dois dos quatro camundongos produziram anti-soros que apresentaram bons resultados (os que foram imunizados com as proteínas obtidas pelos processos de centrifugação e diálise), pois foram capazes de detectar a proteína recombinante e não reagiram com os controles (pelo menos não na mesma altura das bandas da proteína recombinante) (Figuras 26 e 28). As bandas inespecíficas são, provavelmente, marcações devido a reação com proteínas das células de inseto. No entanto, essas proteínas possivelmente não irão interferir na especificidade do anti-soro com o vírus preparado a partir das plantas com sintomas de MSC, pois estas proteínas provavelmente não serão encontradas em plantas.

O mesmo resultado não foi obtido com os outros dois anti-soros, produzidos com a proteína extraída a partir de gel de poliacrilamida, que detectaram outra proteína com o mesmo tamanho de CSDaV-Pol nos dois controles (células infectadas com vírus selvagem AcMNPV e células não infectadas) (Figura 29). Essas proteínas não foram identificadas e possivelmente são provenientes de célula de inseto, uma vez que não apresentaram reação com o anticorpo anti-HisTag (Figura 27). Portanto, a especificidade das reações utilizando estes anti-soros só poderá ser melhorada quando os testes utilizando o vírus preparado, oriundo de plantas, forem realizados.

No presente trabalho, a proteína alvo fusionada com a poliedrina foi purificada apenas por centrifugação, o que pode justificar os resultados obtidos com os anti-soros. Para aumentar a especificidade e o título dos anti-soros, o processo de purificação da proteína fusionada pode ser melhorado. A metodologia que utiliza o gradiente de sacarose para purificar poliedros é uma alternativa que pode ser adotada em trabalho futuro.

Para a expressão da capa protéica do CSDaV, foram desenhados *primers* específicos flanqueando esta região do genoma viral, com adição de uma sequência de reconhecimento para a protease Fator Xa e sítios de restrição da enzima *Nco I*. Essa protease cliva em uma sequência específica de aminoácidos (Ile-Glu-Gly-Arg) e foi adicionada aos *primers* com o objetivo de clivar a CP, podendo ser utilizada como mais uma opção para se obter uma proteína mais purificada para a imunização. Uma outra opção seria purificar a proteína por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (devido a cauda de hexa-histidina). Porém, para ambas as metodologias, a proteína deveria ser solubilizada e posteriormente purificada

por um processo de diálise. No entanto, devido principalmente à baixa recuperação de proteína solúvel, não foi possível finalizar nenhuma das duas estratégias. Portanto, para melhorar a extração da proteína recombinante e, conseqüentemente, a especificidade dos anti-soros, estas tentativas devem continuar em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando os objetivos deste trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ A capa protéica do CSDaV foi expressa em célula de inseto utilizando o Sistema Baculovírus, e esta foi detectada por SDS-PAGE e confirmada por testes de imunomarcacão;
- ✓ A proteína recombinante CSDaV-Pol foi extraída de três maneiras diferentes e utilizada para imunizar camundongos, obtendo-se a produção de anti-soros.
- ✓ Os testes de imuno-deteccão mostraram que todos os anti-soros produzidos reconheceram a proteína de interesse, porém detectaram algumas proteínas provenientes de célula de inseto.

Dessa forma, visando aprimorar este trabalho pretende-se:

- 1- Realizar testes de imuno-deteccão com o vírus CSDaV preparado de plantas (sempurificado ou extrato de planta), para avaliar a especificidade dos anti-soros.
- 2- Testar as metodologias propostas no trabalho para obter a proteína recombinante mais purificada, por gradiente de sacarose, aumentando a especificidade dos anti-soros.
- 3- Imunizar coelhos a fim de produzir maior quantidade de anti-soro para testes futuros com o vírus CSDaV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-JÚNIOR, M.; MARRACCINI, F.M.; MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; PIO-RIBEIRO, G.; RIBEIRO, B.M. Recombinant expression of Garlic virus C (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. **Microbiological Research**, 163:354-361, 2008.

ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v. 131, p. 21-29, 1986.

AYRES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 202(2), p. 586-605, 1994.

BARROS, C.C.P. Sequenciamento do genoma completo e expressão heteróloga da capa protéica do marafivirus associado à morte súbita dos citros. Brasília, 2006. 175 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia)** - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.

BARROS, C.C.P.; JESUS JR., W.C.; TEIXEIRA, D.C.; GOMES, C.C.; DUTRA, L.S. & NAGATA, T. Molecular characterization of tympo-like virus isolated from orange trees with sudden death disease symptom. **Fitopatologia Brasileira**, 29:S278 (resumo) 2004.

BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; GIMENES-FERNANDES, N. Progresso dos de “morte súbita” em pomares de laranjeiras ‘Valência’ e ‘Pêra’. **Summa Phytopathologica** v. 28, p. 23. 2002.

BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R. & BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analysis of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, 93:502-512, 2003a.

BASSANEZI, R.B.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T. Morte Súbita dos Citros. Araraquara: Fundecitrus/EECB, **Boletim Citrícola**, v. 24, 2003b.

BASSANEZI, R.B.; BUSATO, L.A.; SANCHES, A.L. & BARBOSA, J.C. Danos da Morte Súbita dos Citros sobre a produção de laranja. **Fitopatologia Brasileira**, 30:497-503. 2005.

BENZ, G.A. Introduction: historical perspective. In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds). **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, p.1-35, 1986.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Eds). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.

BLISSARD, G.W. Baculovirus-insect cells interactions. **Citotechnology**, v. 20, p. 73-93, 1996.

BOVÉ, J.M.; GARNIER, M.; GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A. J. Sudden death disease (Morte Súbita Doença) of sweet oranges trees on Rangpur lime: A hypothesis. **Report to Fundecitrus**, February, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BULACH, D.M.; KUMAR, C.A.; ZAIA, A.; LIANG, B.F.; TRIBE, D.E. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 73:59-73, 1999.

CANTÚ, M.D.; MARIANO, A.G.; PALMA, M.S.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. Proteomic Analysis Reveals Suppression of Bark Chitinases and Proteinase Inhibitors in Citrus Plants Affected by the Citrus Sudden Death Disease. **Phytopathology**, 2008 98:10, 1084-1092.

CASTRO, M.E.B., SOUSA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B.M. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 34, n. 10, Oct. 1999.

CHANG, J.H.; CHOI, J.Y.; JIN, B.R.; ROH, J.Y.; OLSZEWSKI, J.A.; SEO, S.J.; O'REILLY, D.R.; & JE, Y.H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, 84: 30-37, 2003.

COSTA, M.H.O. Construção de vetor baculoviral modificado para produção de poliedros contendo proteína capsidial de vírus do complexo viral do alho visando produção de anti-soros. Brasília, 2008. 151 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)** - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CREGG, J.M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, p. 905-910, 1993.

CROOK, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Eds.) **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 73-110, 1991.
 DERRICK, K.S.; BERETTA, M.J.; BARTHE, G.A.; KAYIM, M.; HARAKAVA, R. Identification of strain of *Citrus tristeza virus* by subtraction hybridization. **Plant Disease**, v. 87, p.1355-1359, 2003.

DREHER, T.W.; HAEMI, A.L.; MAYO, M.A. Genus Tymovirus. In: Van Regenmortel, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (eds) Virus taxonomy. **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, p. 964-969, 2000.

DWYER, K.G. & GRANADOS, R.R. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their in vitro translation products. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1535-1542, 1998.

ENGELHARD, E.K.; KAM-MORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M Nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings in the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3324-3327, 1994.

EDWARDS, C.M.; ZHANG, Z.; WEILAND, J. J. Oat Blue Dwarf Marafivirus Resembles the Tymoviruses in Sequence, Genome Organization, and Expression Strategy. **Virology**, v. 232, 217-229, 1997.

EDWARDS, M.C. Genus *Marafivirus*. In: Van Regenmortel, M.H.V.; FAUQUET, M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B.(eds) Virus taxonomy. **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, 2000.

FEDERICI, B. A. Biological properties and molecular biology. **The biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, p. 110-127, 1986.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis, p. 33-59. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. New York; Plenum Press, p. 447, 1997.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MONATH, T.P.; MELNICK, J.L.; ROIZMAN, B.; SRAUS, S.E. **Field-Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 2950, 2001.

FUNK, C.N. & CONSIGLI, R.A. Evidence for zinc binding by two structural proteins *Plodi interpunctella* granulosus virus. **Journal of Virology**, v. 66, p. 3168-3171, 1992.

FUNDECITRUS. MSC evolui. **Revista do Fundecitrus**, v. 120, p. 6-7, 2004.

GIMENES-FERNANDES, N. & BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopatologica**, 27:93, 2001.

GIMENES-FERNANDES, N. & BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J. Árvores de limoeiro 'Cravo' não mostram sintomas de "morte súbita" em área afetada. **Summa Phytopatologica**, v. 28, p. 72, 2002 (Resumo).

GRANADOS, R.R.; GUOXUN, L.; DERSKSEN, A.C.G.; MCKENNA, K.A.A. New insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 260-266, 1994.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC. v. 1, p. 177-202, 1986.

GROSS, C.H. & SHUMAN, S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5' triphosphatase. **Journal of Virology**, v. 72(9), p. 7057-7063, 1998.

GUARINO, L.A.; XU, B.; JIN, J.; DONG, W. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology**, v. 72(10), p. 7985-7991, 1998.

HARAKAVA, R. Obtenção de sequências de um vírus do gênero *Marafivirus* a partir de laranjeira com sintoma de morte súbita do citros. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 01, 2004.

HERNIOU, E.A.; OLSZEWSKI, J.A.; O'REILLY, D.R.; CORY, J.S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**, v. 78(7), p. 3244-3251, 2004.

HESS, R.T. & FALCON, L.A. Observations on the interaction of baculoviruses with the plasma membrane. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 525-530, 1977.

HORTON, H.M. & BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA. Nova doença já causa prejuízos a pomares de SP e MG. **Informativo Centro de Citricultura**. 76:1-4, 2001.

IZADPANA, K.; ZHANG, Y.P.; DAUBERT, S.; ROWHANI, A. Sequence of coat protein gene of *Bermuda grass etched-line virus* and of the adjacent “marafibox” motif. **Virus Genes**, v. 24, p. 131-134, 2002.

JE, Y.H.; JIN, B.R.; PARK, H.W.; ROH, J.Y.; CHANG, J.H.; SEO, S.J.; OLSZEWSKI, J.A.; O'REILLY, D.R.; & KANG, S.K.). Baculovirus Expression Vectors that Incorporate the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies. **BioTechniques**, 34: 81-87, 2003.

JESUS JUNIOR, W.C. De; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A. Morte Súbita dos Citros. In: ZAMBOLIM, L. (ed). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Produção Integrada de Fruteiras Tropicais**. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, MG, p. 187-222, 2003.

JESUS JUNIOR, W.C. de & BASSANEZI, R.B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**. 29:399-405, 2004a.

JESUS JUNIOR, W.C. De; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A. A Morte Súbita dos Citros ainda tem origem desconhecida. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 2, p. 34-39, dez 2004b.

JESUS JUNIOR, W.C. De; TEIXEIRA, D.C.; TANAKA, F.A.O.; MARTINS, E.C.; BARROS, C.C.P.; NAGATA, T.; REZENDE, J.A.M. Purification of Tymo-Like virus particles isolated from Orange trees with Sudden Death. **XVI Conference of International Organization of Citrus Virologists**, Monterrey, México, p. 148, 2004c.

JESUS JUNIOR, W. C. De; TEIXEIRA, D. C., SANTOS, M. A., POLVERARI, F. S., MARTINS, E. C., BARROS, C. C. P., NAGATA, T. & REZENDE, J. A. Detecção de um vírus da família *Tymoviridae* em plantas com Morte Súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.183, 2005.

JEHLE, J.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M.; VLAK, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151(7):1257-66, 2006.

JUNIOR, M. A. *et al.* Recombinant expression of Garlic virus C (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. **Microbiological Research**, 163 (2008) 354—361, 2008.

KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças dos citros. In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, v. 2, p. 213-235, 1980.

KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. **Nature**, Basingstoke, v. 201, p. 1011-1012. 1965. (resumo).

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

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

LIBANORE, A.C.; MASSARI, C.A.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; GIMENES-FERNANDES, N.; AYRES, A.J. Levantamento da ocorrência da “morte súbita dos citros” no Estado de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 72-73, 2002. (Resumo).

LU, A.; MILLER, L.K. Regulation of Baculovirus late and very late gene expression. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 193-211, 1997.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E.C.; FERRARI, F.; FRANCOM S.F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL, A.; JORDÃO JUNIOR, H.; SILVA, V.H.A.; SOUSA, L.C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ZANCA, A.S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J.P.; REINACH, F.C.; FERRO, J.A.; SILVA, A.C.R. Da. Identification and Genomic Characterization of a New Virus (*Tymoviridae* Family) Associated with Citrus Sudden Death Disease. **Journal of Virology**. p. 3028–3037 vol. 79, n. 5, mar. 2005.

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; ABOUH-GHANEM SABANADZOVIC, N.; EDWARDS, M.C.; DREHER, T. The family *Tymoviridae*. **Arch. Virol.** 147:1837–1846, 2002a.

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; ABOUH-GHANEM SABANADZOVIC, N.; SALDARELLI, P. *Maculavirus*, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1847-1853, 2002b.

MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FREDERICI, B.A. (Eds). *The Biology of Baculovirus*. Boca Raton: CRC Press, p. 275, 1986.

MILLER, L. K. (Eds). **The Baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

MÜLLER, G.W.; NEGRI, J.D. De.; CARLOS IVAN AGUILAR-VILDOSO, C. I.; JÚNIOR, D. M.; JUNIOR, J.P.; JOAQUIM TEÓFILO SOBRINHO, J.T.; CARVALHO, S.A.; GIOTTO, L.F.; e MARCOS ANTÔNIO MACHADO, M.A. Morte súbita do citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.2, p.371-386, 2002.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.) *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. New York: Springer-Verlag Wien, **Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 104-113, 1995.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. & LUCKOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York, Oxford University Press, 1994.

PASSARELLI, A.L. & MILLER, L.K. Identification and characterization of Lef-1, a baculovirus gene involved in late gene expression. **Journal of Virology**, v. 67(6), p. 3481-3488, 1993.

REINACH, F., Alellyx, Applied Genomics, public conference on CSD, October 14, 2003.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de inseto. **In: Controle microbiano de insetos**. Editor: ALVES, S. B. 2ª ed., vol. 4, p. 481-503. Ed. FEALQ.

RIBEIRO, B.M. & CROOK, N. E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 31 (6). p. 763-769, 1998.

ROMÁN, M.P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; AYRES, A.J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIOTTO, L.F.; BOVÉ, J.M. Sudden Death of Citrus in Brazil: A Graft-Transmissible Bud Union Disease. **Plant Disease**, 2004 88:5, 453-467.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIR, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. CSH Press, Vol. 3, 1989.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical Analysis of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Transcripts for Polyhedrin and 10,000-Molecular-Weight Protein. **Journal of Virology**, v. 45, n. 1, p. 215-225, 1983.

STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz, S.A.; Womble, D.D. (eds). **Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach**. Human Press Inc, Totawa, 2003.

TANI, H.; LIMN, C. K.; YAP, C. C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9799-9808, 2003.

TARGON, M.L.P.N.; ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; KISHI, L.; SOUZA, A.A.; SANTOS, F.A; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. Evaluation of CTV haplotypes in plants exhibiting citrus sudden death symptoms. **10th ISC Congress**, abstract, p. 83, 2004.

TODD, J.W.; PASSARELLI, A.L.; LU, A.; MILLER, L.K. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. **Journal of Virology**, v. 70, p. 2307-2317, 1996.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VOLKMAN, L.E. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Current Topics in Microbiological Immunology**, v. 131, p. 103-118, 1986.

VOLKMAN, L.E. & HOM, G. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus chiA Is Required for Processing of V-CATH. **Virology**, v. 277, p. 178-183, 2000.

WILLIAMS, G.V. & FAULKNER, P. Cytological and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. Plenum New York p. 61-107, 1997.

WINSTANLEY, D. & CROOK, N. E. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1599-1609, 1993.

XU, B.; YOO, S.; GUARINO, L.A. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. **Journal of Virology**, v. 69(5), p. 2912-2917, 1995.

ZANOTTO, P.M.A.; KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 147-164, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)