

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
ROBSON PEREIRA DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NUCLEOPROTEÍNA  
DO HANTAVÍRUS EM CÉLULAS DE INSETOS INFECTADAS  
COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

**Mogi das Cruzes, SP  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
ROBSON PEREIRA DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NUCLEOPROTEÍNA  
DO HANTAVÍRUS EM CÉLULAS DE INSETOS INFECTADAS  
COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação da  
Universidade de Mogi das Cruzes  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Aplicada a Recursos  
Naturais e Agronegócios.

Profº Orientador: Dr. José Luiz Caldas Wolff

**Mogi das Cruzes, SP  
2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Silva, Robson Pereira da

Investigação da expressão da nucleoproteína do hantavírus em células de insetos infectadas com baculovírus recombinante / Robson Pereira da Silva. –2010.

68 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a recursos naturais e Agronegócios

Orientador: Profº Drº José Luiz Caldas Wolff

1. Hantavírus 2. Baculovírus 3. Nucleoproteína I.  
Wolff, José Luiz Caldas

CDD 616.0792

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às oito horas do dia vinte e oito de agosto de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Investigação da expressão da nucleoproteína do hantavírus em células de insetos infectadas com baculovírus recombinante" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Robson Pereira da Silva**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira, Maria Santina de Castro Morini e Ivarne Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Robson Pereira da Silva por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 28 de agosto de 2009.

Comissão Examinadora

Julgamento

Regina L.B.C. Oliveira  
Profª Drª Regina L.B.C. Oliveira

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Maria Santina de Castro Morini  
Profª Drª Maria Santina de Castro Morini

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Ivarne Luis dos Santos Tersariol  
Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## DEDICATÓRIA

- Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, que por sempre acreditar em mim, deu-me forças para continuar sendo perseverante, forte, guerreiro, enfim um lutador...
- Dedico a meus pais, que mesmo distante, sempre foram um ponto de referência na minha vida, tornando cada vez mais simples, e com suas simplicidades e humildades, fizeram com que sempre devia correr atrás que julgasse bom para mim, mas nunca se esquecendo que o melhor da vida é ter o respeito por si próprio como também pelos outros.
- Dedico aos amigos de trabalho, que em vários momentos quisessem que eu desistisse, somente para ficar ali os ajudando, mas mesmo assim nunca se manifestaram, isto para que pudesse me dispor de um maior tempo livre, onde poderia dedicar-me melhor no desenvolvimento do trabalho.
- Dedico aos meus amigos de forma em geral que sempre acreditaram no meu esforço.
- Dedico a minha ex-namorada, que hoje tenho a honra de chamá-la de esposa, esta sim abandonei, e em momento algum foi egoísta pedindo para que desistisse e ficasse mais tempo com ela, sempre me dando força, mostrando caminho, e principalmente carinho nos momentos de angustia, sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus, por a cada dia me dá a oportunidade de começar um novo dia, executando tarefas novas ou terminando as iniciadas no dia anterior, e também agradeço a Ele por fazer como que a cada dia aumente ainda mais a minha fé, esperança e perseverança, fazendo-me acreditar que o Ele deixou tudo o que de melhor para mim, e cada dia ele mim guiará para este lugar maravilhoso e tão almejado.

- Agradeço ao Professor Wolff, meu orientador, que acreditou em mim, e teve a confiança de me entregar e que continuasse uma obra tão maravilhosa começada por ele e seu outro aluno.

- Agradeço aos Professores:

Wellington, que com seu jeito humorado e carinhoso, fez tornar mais estreita a minha relação com o professor e também por mostrar-me o prazer de ensinar e multiplicar conhecimentos.

Tiago, por ser um ponto de referência.

Iselli, uma pessoa de capacidade surpreendente.

Ronaldo, agradeço muito por ter cedido quando precisei do seu laboratório, e que também ensinou sobre dosagem de proteínas.

Santina, uma pessoa dotada de carisma e simpatia.

Regina, dotada de grande conhecimento e admiração.

- Agradeço aos meus pais (Sr Orlando e Manoelita), pela educação que me deram, sempre pregando que o estudo e a sabedoria eram as verdadeiras riquezas de nossas vidas, e também aos meus irmãos, cunhados, cunhadas e sobrinhos, que se orgulharam da minha vontade de crescer.

- Agradeço aos meus amigos do Banco de Sangue (lab Centrho), laboratórios de urgências (Sta Casa de Mogi das Cruzes e também Suzano), pela presteza em conciliar os plantões ou dando folga para que pudesse estudar, este em especial a Dra Leila, por entender e colaborar.

- Agradeço aos meus amigos que criei e cultivei, sendo estes do NIB, CIB, enfim os jovens promissores pesquisadores desta instituição, pelo carinho, presteza, auxílio e etc, não citando nomes para que não se cometa qualquer injustiça, mas sim louvando a outros que tiveram importância direta no desenvolver deste trabalho, este são, Corina, Débora, Cezar, Andressa, Bruno, Neilce, Fernanda, Roberto, Alex.

- Agradeço aos amigos em geral, por tido paciência e por entenderem a minha ausência, e mesmo cultivamos e fizemos crescer nossa amizade.

- Agradeço a minha a ex-namorada e atual esposa, por mesmo sabendo dos dias difíceis que teríamos permaneceu sempre ao meu lado, e hoje mais do que nunca, por fazer parte de mim.

Não tenhas inveja dos homens malignos, nem desejes estar com eles, pois o seu coração medita a violência, e os seus lábios falam maliciosamente. Com a sabedoria se edifica a casa, e com o entendimento ela se firma; pelo conhecimento se enchem as câmaras de todas as substâncias preciosas e deleitáveis. O homem sábio é forte, e o homem de conhecimento aumenta a força; pois com conselhos prudentes farás a guerra, e na multidão dos conselheiros há vitória...

Provérbios 24, 1-6

*“Epígrafe”*



## RESUMO

Os Hantavírus tratam-se de um grupo de agentes patogênicos com distribuição mundial e relacionados a Febre Hemorrágica com síndrome Renal (HFRS) e a Síndrome Cardiopulmonar (HCPS). A sorologia é o método diagnóstico de escolha da hantavirose, além de ser amplamente utilizada na avaliação epidemiológica de tal patologia. A técnica do DNA recombinante tornou-se padrão para a produção de antígenos de Hantavírus para serem utilizados nos testes sorológicos. Para tanto, é utilizado o gene N responsável pela codificação da nucleoproteína viral (altamente antigênica). Estudos anteriores mostram que a produção de tal proteína em células de inseto poderia ser considerada mais vantajosa quando comparada a produção em *Escherichia coli*. Portanto, este trabalho teve por objetivo principal a investigação da produção da nucleoproteína de Hantavírus Araraquara em culturas de células de inseto a partir do baculovirus recombinante (vBac-his-N) em vários períodos de infecção. Além disso, foi determinado o método de cultura de células mais adequado e foi testada a antigenicidade da proteína produzida. A técnica foi então aperfeiçoada e adaptada pra a realização do teste por ELISA. Demonstrando-se, assim, economia de tempo e vantagens como diagnóstico alternativo da Hantavirose.

**Palavras-chave:** Hantavirus, Baculovirus, Nucleoproteína.

## ABSTRACT

Hantavirus are a group of pathogenic agents with world-wide distribution. They are related to the Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) and Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS). The serology is the diagnostic method of choice of hantaviruses, beyond widely being used in the epidemiological evaluation of such pathology. The technique of the recombinant DNA became standard for the antigen production of Hantavirus to be used in the serological tests. For in such a way, responsible gene N for the codification of the viral nucleoprotein is used (highly antigenic). Previous studies show that the production of such protein in insect cells could be considered more advantageous when compared the production in *Escherichia coli*. Therefore, this work had for main objective the inquiry of the production of the nucleoprotein of Hantavirus Araraquara in cultures of cells of insect from baculovirus recombinant (vBac-his-N) in some periods of infection. Moreover, the method of culture of cells was determined more adjusted and was tested the antigenicity of the produced protein. The technique then was perfected and adapted for the accomplishment of the test for ELISA. Demonstrating itself, thus, economy of alternative time and advantages as diagnostic of the Hantaviruses.

**Keywords:** Hantavirus, Baculovirus, Nucleoprotein.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem na Eurásia relacionados à Febre Hemorrágica com Síndrome Renal.

Tabela 2: Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem nas Américas que causam a Síndrome Cardiopulmonar

Figura 1: Distribuição mundial dos genótipos virais e respectivos reservatórios.

Figura 2: Modos de transmissão das Hantaviroses.

Figura 3: Comparação entre os vírus V1, VR e V5, por Reação em Cadeia da Polimerase.

Figura 4: Comparação entre os vírus V1 e V5 por Reação em Cadeia da Polimerase.

Figura 5: Comparação entre os vírus V5 e VR por Reação em Cadeia da Polimerase.

Figura 6: Comparação entre os vírus V1, VR e V5 por Reação em Cadeia da Polimerase.

Figura 7: Purificação da Reação em Cadeia da Polimerase com os primers Pr\_syn/ Han-Flan5´.

Quadro 1: Sequencia gênica dos vírus V1 e VR a partir do PCR utilizando-se os primers Pr\_syn/ Han-Flan5´.

Quadro 2: Sequencia gênica do vírus V5 a partir do PCR utilizando-se os primers Pr\_syn/ Han-Flan5´.

Figura 08: Análise em Gel de Poliacrilamida da Nucleoproteína N extraída após 48, 72 e 96 h da infecção.

Figura 09: Análise em Gel de Poliacrilamida da Nucleoproteína N extraída após 48, 72 e 96 h da infecção e desproteïnizada (96°C) a fim de melhorar a visualização no gel.

Figura 10: Extração da proteína com uréia 8M

Figura 11: Extração da proteína com uréia 8M, comparativo com a proteína *E. coli*

Figura 12: PURIFICAÇÃO COM HIS-TAG

Figura 13: 96h p.i. (Purificação da proteína N, cromatografia Ni<sup>2+</sup>).

Figura 14: 72h p.i. (Purificação da proteína N, cromatografia Ni<sup>2+</sup>)

Figura 15: Western Blot Resultados Pré-Purificação.

Figura 16: Western Blot Resultados Pós-Purificação.

Figura 17: Teste ELISA com o vírus recombinante sendo utilizado como diagnóstico alternativo da Hantavirose.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem na Eurásia relacionados à Febre Hemorrágica com Síndrome Renal.

Tabela 2: Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem nas Américas que causam a Síndrome Cardiopulmonar.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AcNPV</b>	<i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus</i>
<b>ANDV</b>	vírus Andes
<b>BAYV</b>	virus Bayou
<b>BCCV</b>	virus Black Creek Canal
<b>BV</b>	Budded vírus
<b>CCB/USP</b>	Centro de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo
<b>DAB</b>	diaminobenzidina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DOBV</b>	vírus Dobrava
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assays
<b>G1</b>	Glicoproteína 1
<b>G2</b>	Glicoproteína 2
<b>g-INF</b>	g-interferon
<b>HCPS</b>	Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus
<b>HFRS</b>	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
<b>HLA</b>	
<b>HTNV</b>	virus Hantaan
<b>IgG</b>	imunoglobulina G
<b>IgM</b>	imunoglobulina M
<b>MHC</b>	Complexo de Histocompatibilidade Maior
<b>MOI</b>	mode of infection
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDV</b>	Polyedra-derived vírus
<b>PUUV</b>	vírus Puumala
<b>qPCR</b>	PCR quantitativo
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
<b>Segmento L</b>	Segmento grande do genoma do hantavirus
<b>Segmento M</b>	Segmento médio do genoma do hantavirus
<b>Segmento S</b>	Segmento pequeno do genoma do hantavirus
<b>SEOV</b>	vírus Seoul

<b>Sf-9</b>	linhagem celular derivada de ovário de <i>Spodoptera frugiperda</i>
<b>SNV</b>	vírus Sin Nombre
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>V1</b>	vírus que contem o gene de exportação da proteína N
<b>V5</b>	vírus que não contem o gene de exportação da proteína N
<b>vBac-His-N</b>	Baculovírus recombinante contendo o gene da nucleoproteína do Hantavírus Araraquara
<b>VR</b>	recombinante vBac-His-N
<b>vSyngal VI-</b>	AcNPV recombinante que expressa a $\beta$ -galactosidase, mas não expressa a poliedrina

## SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO .....	5
2 INTRODUÇÃO .....	7
2.1 HANTAVIRUS .....	7
2.1.1 Histórico .....	7
2.1.2 Características Virais .....	8
2.1.3 Transmissão .....	9
2.1.4 Patogenia .....	11
2.1.5 Sintomatologia .....	13
2.1.5.1 Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH) .....	13
2.1.5.2. Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) .....	14
2.1.6 Diagnóstico .....	15
2.1.7 Tratamento e Prevenção .....	17
2.2 BACULOVÍRUS.....	19
2.2.1 Características Virais .....	19
2.2.2 Baculovírus como Sistema de Expressão Gênica .....	19
2.2.3 Baculovírus Recombinante vBac-His-N .....	20
3 OBJETIVOS .....	21
3.1 OBJETIVO GERAL .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
4 MÉTODOS .....	22
4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	22
4.2 SEQUENCIAMENTO .....	23
4.3 CULTURA DE CÉLULAS DE INSETO .....	23
4.4 RECOMBINANTE vBac-His-N .....	23
4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE vBac-His-N E DA PUREZA DO ESTOQUE VIRAL .....	24
4.5.1 Infecção das células e extração do lisado celular bruto .....	25
4.5.2 Eletroforese em gel de poli(acrilamida com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	25
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE .....	26
4.7 PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE NÍQUEL .....	26
4.8 WESTERN BLOT .....	27



4.9	TESTE ELISA .....	28
4.10	DOSAGEM DA PROTEÍNA N .....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1	CONFIRMAÇÃO DA ORIGEM DO MATERIAL VIRAL A PARTIR DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	32
5.2	SEQUENCIAMENTO .....	32
5.3	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA N .....	34
5.3.1	Cultura de Células de Inseto .....	34
5.3.2	Extração da Proteína N .....	35
5.3.3	Géis de Poliacrilamida .....	35
5.3.4	Purificação em Coluna de Níquel .....	39
5.3.5	Western Blotting .....	41
5.3.6	ELISA .....	42
5.3.7	Dosagem da Proteína N .....	43
6	Conclusões e sugestões .....	44
	REFERÊNCIAS .....	46
	ANEXOS .....	49

# 1 APRESENTAÇÃO

Os Hantavírus constituem um grupo emergente de agentes patogênicos transmitidos por roedores. Fazem parte da família Bunyaviridae. Trata-se de agente etiológico de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (HFRS) na Europa e na Ásia, e são responsáveis pela Síndrome Cardiopulmonar (HCPS) nas Américas (LEE, 1991).

A HFRS foi pela primeira vez descrita durante a Guerra da Coreia, no início dos anos 50. Já em 1993, uma espécie de hantavírus foi encontrada como causadora da HCPS no Novo México e em outros quatro estados (EARLE, 1954).

O diagnóstico sorológico é o procedimento mais utilizado para a confirmação de infecção por hantavírus sendo também um método freqüentemente utilizado em estudos de avaliação epidemiológica desta virose (NICHOL, 1993).

A produção de antígenos nativos para os testes sorológicos é um problema devido principalmente ao alto risco envolvido na manipulação do hantavírus, para a qual é necessário laboratórios com nível de biossegurança classe três. Outra limitação para o uso dos antígenos nativos são os baixos títulos obtidos com Hantavírus em cultura de células. Por estas razões, antígenos de hantavírus produzidas pela técnica do DNA recombinante se tornaram padrão nos testes sorológicos (FELDMANN, 1993; ELGH, WADELL e JUTO, 1995; ELGH, 1997; NICHOL, 1993; PETERS e KHAN, 2002; LEDNICKY, 2003).

O gene N, que codifica a nucleoproteína viral (altamente antigênica), já foi utilizado para produção de antígenos recombinantes em vários sistemas. Estudos comparando métodos sorológicos para a detecção do *Puumala virus*, o principal hantavírus do norte da Europa, indicam que a produção da proteína recombinante N em células de insetos apresenta diversas vantagens sobre a proteína produzida em *Escherichia coli* (SJÖLANDER, 1997).

Assim, este trabalho realizado no Laboratório de Virologia Molecular teve como principal objetivo investigar a produção da nucleoproteína de Hantavírus Araraquara em culturas de células de inseto, a partir do baculovírus recombinante (vBac-His-N), em vários períodos da infecção. Além disso, o trabalho propôs a determinação do método de cultura de células mais adequado, além de testar a

antigenicidade da proteína produzida. Foi também aperfeiçoado a técnica para a realização do teste por ELISA, o que acarreta em economia de tempo, e melhora do diagnóstico.

## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 HANTAVIRUS

#### 2.1.1 Histórico

Os Hantavírus apresentam distribuição mundial e a nomenclatura de cada um está relacionada à região onde o vírus foi descoberto, bem como a seu hospedeiro (Figura 1). Diversos casos de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) ocasionados por hantavirus já foram diagnosticados (Tabela 1). A hantavirose moléstia relacionada aos hantavirus foi citada primeiramente na literatura no início do século XX (LEE, 1991). Apesar disso, o primeiro caso relacionado à infecção pelo hantavirus foi descrito em um soldado na guerra da Coreia na década de 50 (EARLE, 1954). Outra moléstia ocasionada pelos hantavírus é a Síndrome Cardiopulmonar (SCPH), que ocorre principalmente nas Américas (Tabela 2). Tem como alvo os sistemas cardiovascular e respiratório, com 50% de letalidade, com alto número de morbidade.

**Tabela 1:** Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem na Eurásia relacionados à Febre Hemorrágica com Síndrome Renal.

	Nomenclatura dos hantavirus			
	Hantaan	Seoul	Puumala	Dobrava
Região Geográfica	Ásia <sup>(a)</sup>	Mundial	Europa <sup>(b)</sup>	Europa Ocidental e Grécia
Reservatório	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Rattus sp.</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>	<i>Apodemus flavicolis</i>
Letalidade	5 – 15%	1%	1%	1 – 3%

<sup>(a)</sup> Rússia, Coreia, China e Japão; <sup>(b)</sup> Escandinávia, Alemanha e Bélgica.

Fonte: FERREIRA, 2003

No Brasil, a presença da FHSR, ocasionada pelo hantavirus Hantaan foi detectada em 1985; e o primeiro caso de SCPH foi em São Paulo no ano de 1993. Já em 2001 mais de 171 casos foram contabilizados, com cerca de 40% de

mortalidade nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato do Grosso, Rio Grande do Norte, Paraná. O hospedeiro da hantavirose nas regiões sul, sudeste e oeste do país é *Bolomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae), um animal muito comum no cerrado. Na região Sul, a partir do Paraná, o hospedeiro também pode ser *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae), que é um roedor silvestre. Especificamente no Maranhão, a hantavirose foi detectada em um roedor aquático (*Holochillus*: Cricetidae) (FERREIRA, 2003).

**Tabela 2:** Informações gerais sobre os principais Hantavírus que ocorrem nas Américas que causam a Síndrome Cardiopulmonar

	Nomenclatura dos hantavirus			
	Sin Nombre <sup>(a)</sup>	Andes <sup>(a)</sup>	Laguna Negra <sup>(a)</sup>	Araraquara <sup>(b)</sup>
Região Geográfica	EUA, Canadá	Argentina	Paraguai	Brasil
Reservatório	<i>Peromyscus maniculatos</i>	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	<i>Calomys laucha</i>	<i>Necromys lasiurus</i>
Letalidade	50%	50%	30%	50%

Fonte: <sup>(a)</sup>FERREIRA, 2003; <sup>(b)</sup>FIGUEIREDO, 2006.

### 2.1.2 Características Virais

Os Hantavirus pertencem à família Bunyaviridae; são denominados de vírus envelopados, com diâmetro de 80 a 120 nm e com RNA circular como ácido nucléico. Seu genoma é de fita simples, polaridade negativa, constituído de 12 a 13kbp e subdividido em três segmentos – pequeno, médio e grande. O pequeno (S) codifica a proteína N que envolve os segmentos de RNA viral, originando o nucleocapsídeo. O segmento médio (M) é responsável por codificar uma glicoproteína precursora que, quando clivada, gera as glicoproteínas G1 e G2 que constituem o envelope viral. Já o segmento maior (L) codifica a proteína L cujas funções são de transcriptase/replicase viral. A multiplicação viral ocorre exclusivamente no citoplasma, após acoplamento a receptores específicos da célula hospedeira e subsequente endocitose (HART e BENNETT, 1999).



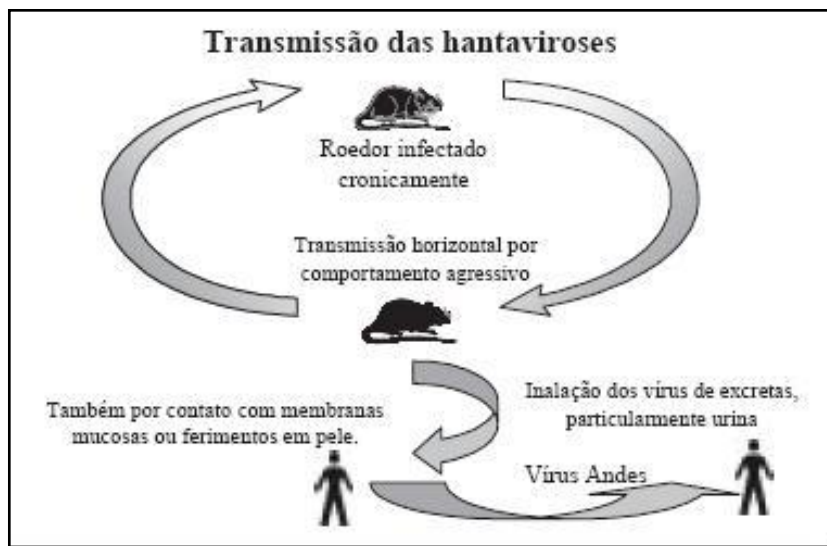
**Figura 1: Distribuição mundial dos genótipos virais e respectivos reservatórios.** A figura mostra a localização prevalente dos genótipos de Hantavírus (em negrito) relacionados as espécies de seus roedores-reservatórios (em itálico). (Fonte: [www.cdc.gov/.../hanta/hps/noframes/hpsem.htm](http://www.cdc.gov/.../hanta/hps/noframes/hpsem.htm), 2007)

### 2.1.3 Transmissão

As infecções por Hantavírus são enfermidades agudas e não específicas de nenhum grupo étnico. Os principais reservatórios dos Hantavírus são os roedores - desde aquáticos a terrestres, especialmente os silvestres. Neles a infecção por hantavírus caracteriza-se pela ausência de doença, bem como pela capacidade de estabelecer uma infecção persistente com duração de meses ou anos (LEE, 1981; MEYER e SCHMALJOHN, 2000). Nesses reservatórios a transmissão horizontal parece ser a via mais importante de infecção (GLASS, 1998) e os vírus podem ser isolados principalmente nos pulmões e rins (apesar da presença de anticorpos séricos) e são eliminados em grande quantidade na saliva, urina e fezes.

A infecção humana ocorre principalmente pela inalação de aerossóis (secreções e excreções dos roedores infectados), mas também por outras formas já

descritas, como a ingestão de alimentos e água contaminados, infecção percutânea (por meio de escoriações cutâneas e mordeduras de roedor), através do contato do vírus com mucosa, ou acidentalmente, em trabalhadores e visitantes de biotérios e laboratórios (podendo ser considerada infecção ocupacional). Recentemente, durante um surto de SCPH na Argentina (província de rio Negro) surgiram evidências que poderia haver transmissão de um indivíduo para outro e que, portanto, profissionais da área da saúde apresentariam maior risco de contaminação que os demais. (CATONI, 1997). O período de incubação geralmente varia de 14 a 21 dias para FHSR e de zero a 33 dias para SCPH.



**Figura 2: Modos de transmissão das Hantavíroses.** A figura mostra a transmissão dos Hantavirus, representados pelo Vírus Andes. A transmissão horizontal (roedor-roedor) ocorre a partir de contato agressivo entre os animais, considerados reservatórios dos Hantavirus. A transmissão roedor-humano ocorre principalmente pela inalação dos vírus contidos em excretas do reservatório. Além disso, pode ocorrer a partir do contato do viral com membranas mucosas ou escoriações cutâneas. (FIGUEIREDO, 2003)

O aumento da contaminação pelo hantavirus pode ser relacionado ao crescente desmatamento, enchentes e queimadas, que resultam na aproximação dos roedores (reservatórios) das cidades ou povoados (CASTRO, 1999).

#### 2.1.4 Patogenia

As infecções por hantavírus frequentemente resultam em doença em humanos, sendo o processo iniciado após a inalação de aerossóis contendo partículas virais. Tais partículas se depositam no bronquíolo respiratório terminal e nos alvéolos. Após a infecção do macrófago alveolar, ou outro alvo primário, a viremia parece se instalar, levando a infecção para as células endoteliais do sistema microvascular, pulmões e, em menor grau, para outras células do corpo (ZAKI, 1995).

Células endoteliais, macrófagos e plaquetas possuem receptores de adesão críticos  $\beta$ 3-integrinas que atuam regulando a permeabilidade, a ativação e adesão plaquetária (MACKOW e GAVRILOVSKAYA, 2001). Além disso, são responsáveis pela penetração celular do hantavírus.

A replicação viral ocorre nas células endoteliais e macrófagos/monócitos sem causar qualquer efeito citopático (PENSIERO, 1992). O mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observada em ambas as doenças, FHSR e SCPH, não é completamente compreendido, sendo provavelmente de origem imunopatológica (SUNDSTROM, 2001).

Sabe-se que aproximadamente 65% dos linfócitos T maduros do sangue e do tecido linfóide expressam a molécula CD4, enquanto os outros 35% expressam CD8. Em pacientes com FHSR e SCPH, o número de linfócitos T CD8+ ativos encontra-se aumentado e resulta no inverso dessa relação das células T CD4+/CD8+ (HUANG, 1994).

Análises histopatológicas de pacientes com SCPH demonstram associação de linfócitos T CD8+ com células endoteliais pulmonares (ZAKI, 1995). Além disso, foram observados certos alelos HLA associados a um caso clínico mais grave (MUSTONEN, 1996; TERAJIMA, 2004). Tais dados sugerem a importância do evento imunopatológico no processo de extravasamento que ocorre nas células endoteliais observadas na hantavirose (RAFTERY, 2002).

As células dendríticas são potentes apresentadoras de antígenos e, portanto, ativadoras da resposta imune celular. São crescentes os relatos de diversos vírus que infectam células dendríticas humanas, interferindo em suas funções e escapando deste componente imune efetor (PEEBLES e GRAHAM, 2001).



Foram demonstrados antígenos de hantavírus e células dendríticas foliculares co-localizadas no baço e linfonodos, confirmando que hantavírus pode infectar acentuadamente estas células (ZAKI, 1995). Tal infecção resultaria na estimulação do sistema do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC). Assim seria induzida a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) e g-interferon (g-INF). Tais substâncias estão relacionadas à inflamação e, portanto, a profundos efeitos sobre a permeabilidade endotelial do capilar, causando o edema pulmonar e provavelmente a grave depressão miocárdica observadas na SCPH (ZAKI, 1995; NOLTE, 1995; MORI, 1999). Estes dados reforçam a hipótese de que uma potente resposta imune é estimulada pelos hantavírus, que poderia ser uma parte essencial da patogênese associada ao vírus (RAFTERY, 2002; PETERS e KHAN, 2002).

Além da intensa resposta imune celular, anticorpos neutralizantes estão presentes no soro dos pacientes no momento da admissão hospitalar. E freqüentemente altos títulos de anticorpos neutralizantes são associados a uma maior probabilidade de sobrevivência (PADULA, 2000; BHARADWAJ, 2000).

Apesar do não esclarecimento da causa da trombocitopenia frequentemente observada em pacientes infectados por hantavírus, sugere-se que ela esteja relacionada ao incremento no consumo ou seqüestro das plaquetas. Isto porque o número de megacariócitos na medula óssea encontra-se normal ou aumentado e há evidência de fibrinólise. Além disso, é possível que pacientes com SCPH apresentem complexos imunes, o que pode causar uma diminuição na contagem de plaquetas devido à indução da agregação plaquetária, lise mediada por complemento e seqüestro pelo sistema retículo endotelial (RAVKOV, 1995). A patogênese parece estar relacionada aos receptores de integrina ( $\beta$  3) que conferem ao vírus a capacidade de aderir às plaquetas sanguíneas desencadeando sua retirada da circulação (HART e BENNETT, 1999; PETERS e KHAN, 2002).

Há ainda uma série de esclarecimentos a serem feitos com relação à patogênese da Hantavirose e ao desenvolvimento de medidas de controle desta patologia. Os pesquisadores têm encontrado dificuldades nestas questões já que ainda não foi encontrado um modelo animal que reflita a infecção humana. O primeiro modelo animal para doença grave relacionada ao Hantavírus foi o *Mesocricetus auratus* (Rodentia: Cricetidae), conhecido como hamster sírio. Esse animal desenvolve uma doença letal semelhante à SCPH ao ser infectado com o

Andes vírus (ANDV) (HOOPER, 2001). Posteriormente, foi observado que um Hantavírus (vírus Maporal), isolado de roedor na Venezuela, não estava associado à doença humana. Porém foi relatado que esse vírus tem a capacidade de causar, assim como o ANDV, uma doença com manifestações clínicas similares à SCPH em hamsters sírios (MILAZZO, 2002). Ainda recentemente, foram observados sinais de FHSR leve em primatas não humanos infectados pelo Puumala vírus (PUUV) (KLINGSTROM, 2002).

## **2.1.5 Sintomatologia**

### *2.1.5.1 Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH)*

A SCPH trata-se de uma síndrome clínica febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório. Embora essa síndrome se manifeste de maneira similar entre diferentes genótipos de Hantavírus das Américas, algumas manifestações têm sido descritas como características de infecção por determinadas cepas. Assim, foi descrito maior comprometimento renal e presença de miosite em pacientes infectados pelos vírus Black Creek Canal virus (BCCV) e Bayou virus (BAYV) (HJELLE, 1996). Bem como manifestações hemorrágicas, hiperemia facial e petéquias relacionadas a infecções por Andes virus (ANDV), na Argentina e no Chile (GALENO, 2002).

Normalmente a SCPH se manifesta em quatro estágios. O primeiro, denominado período prodrômico ou febre prodrômica, pode ter duração de três a seis dias e frequentemente são relatadas febre, mialgias, náuseas e diarreia, podendo também ocorrer vômitos, cefaléia, dor abdominal, dor torácica, sudorese, vertigem, tosse e dispnéia (NICHOL, 2001). Não ocorrem sintomas de vias respiratórias altas, como dor de garganta e rinorréia, e é o que basicamente diferencia a SCPH da influenza (MOOLENAAR, 1995).

O segundo estágio da SCPH é a fase cardiopulmonar com duração de dois a dez dias e que se manifesta como uma doença leve caracterizada por dispnéia ou até mesmo acarreta um quadro mais grave de comprometimento cardiovascular, insuficiência respiratória e instabilidade hemodinâmica. Comumente ocorre

hipotensão que pode resultar em choque. Nesta fase, a SCPH é de progressão rápida, assim o paciente necessita de hospitalização e assistência ventilatória nas primeiras 24 horas. Esta fase é marcada por 50% de óbitos nos três primeiros dias de internação (NICHOL, 2001). Nos pacientes que resistem a fase cardiopulmonar, ocorre uma súbita diurese (terceira fase) e logo em seguida a fase de convalescença, isto é, uma rápida melhora clínica. Este último estágio tem curso e duração muito variáveis, sendo que muitos pacientes relatam fadiga persistente e limitada tolerância a exercícios por vários meses (GALENO, 2002).

#### *2.1.5.2. Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR)*

Após o período de incubação da FHSR se inicia subitamente uma fase febril (prodrômica) caracterizada por sintomas semelhantes à influenza, isto é, febre, mal-estar, tremores e prostração, com duração de três a cinco dias. Nesta fase, pode ocorrer também uma fase hemorrágica a qual se manifesta por meio de rubor cutâneo e/ou hiperemia de conjuntivas e mucosas (decorrente da dilatação dos capilares), além de edema retroperitoneal que se manifesta como dores nas costas (decorrente do aumento da permeabilidade capilar) (NICHOL, 2001).

No quarto dia da fase febril, o paciente pode ter início súbito e grave de albuminúria, o que caracteriza a forma severa desta doença. Tal sinal é seguido de hipotensão, trombocitopenia grave, petéquias, náuseas e vômitos e, em torno de 15% dos casos, choque; podendo também ocorrer oligúria. Além disso, a insuficiência renal contribui para 50% dos óbitos durante esta fase (NICHOL, 2001). A outra metade dos pacientes passa pela fase diurética (de até meses de duração), e em seguida pela fase de convalescença (com duração de semanas a meses). Não são todos os que passam por estas fases, alguns casos são descritos como tendo evolução fatal muito rápida, bem como formas muito leves desta doença são observadas. Tal discrepância ainda tem causa desconhecida, porém sabe-se que a mortalidade é diretamente relacionada com o genótipo viral envolvido na doença. Assim, infecções pelos vírus HTNV e DOBV têm uma taxa de mortalidade de 3% a 10%, o SEOV em torno de 1%, e o PUUV (relacionado a uma forma muito leve de doença, denominada nefropatia epidêmica) tem uma taxa de mortalidade em torno de 0,2% (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997; NICHOL, 2001).

### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico para hantavirose tornou-se muito complexo devido ao grande número de doenças que possuem sintomas e sinais clínicos semelhantes aos da infecção pelo hantavírus. Assim, diversas metodologias laboratoriais têm sido desenvolvidas para o diagnóstico das hantavirose. Técnicas tradicionais como o cultivo celular, a detecção de anticorpos e de antígenos em ensaios de imunohistoquímica têm sido utilizadas em conjunto com métodos mais avançados, baseados na detecção do RNA viral (NICHOL, 2001). Estes últimos consistem em técnicas como a reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR), PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), bem como análise de polimorfismo dos fragmentos clivados por enzimas de restrição (RFLP) (AHN, 2000), além da técnica de microarranjo de alta densidade de DNA (NORDSTRÖM, 2004). A primeira permite não só a detecção como também a caracterização genética do vírus (FELDMANN, 1993), enquanto a segunda consiste na quantificação da carga viral (AITICHOU, 2005) e as duas últimas permitem a identificação de diversos genótipos de Hantavírus.

O diagnóstico sorológico é o método de primeira escolha para a detecção da infecção por hantavírus (NICHOL, 2001). A utilização do diagnóstico sorológico a partir da produção de antígenos virais em culturas celulares é de grande importância para a confirmação de infecção bem como para estudos de avaliação epidemiológica desta importante virose. No entanto, esta metodologia diagnóstica apresenta entraves como o lento e variável crescimento do vírus em cultivo celular, o alto risco de manipulação destes vírus (que deve ser, portanto, realizada em laboratórios de biossegurança nível três ou quatro), por requerer pessoal treinado e, principalmente, apresentar uma sensibilidade muito baixa (NICHOL, 2001).

Por tal razão, a utilização de antígenos recombinantes em ensaios sorológicos tem sido um importante alvo de pesquisas (FELDMANN, 1993; ELGH, WADELL e JUTO, 1995; ELGH *et al.*, 1997; NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002; LEDNICKY, 2003). Para a produção de tais antígenos recombinantes, o gene N (que codifica a nucleoproteína viral) tem sido o alvo antigênico de escolha, pois é mais sensível do que as glicoproteínas, além de induzir inicialmente uma resposta humoral mais intensa, precoce e duradoura, já que altos títulos de imunoglobulina M (IgM), direcionados à nucleoproteína, são detectados principalmente na fase aguda

da infecção viral (LUNDKVIST, SCHOLANDER e NIKLASSON, 1993). Além disso, imunoglobulina G (IgG) direcionada à nucleoproteína também pode ser detectada após longos períodos da infecção viral, mesmo que com títulos mais baixos (SETTERGREN, 1994).

A expressão deste antígeno recombinante é obtida utilizando sistemas procarióticos - como a clonagem em plasmídeos e expressão em *Escherichia coli* - ou eucarióticos como baculovírus e *Drosophila* (KALLIO-KOKKO, 1993; ZÖLLER, 1993; ELGH, WADELL e JUTO, 1995; VAPALAHTI, 1996; YOSHIMATSU, 1996; HJELLE, 1997; KALLIO-KOKKO, 1998; PADULA, 2000).

No Brasil, a proteína N do isolado Araraquara foi clonada no plasmídeo pET Directional TOPO® (Invitrogen, USA) e expressa em células *Escherichia coli* BL21 DE3 (Luiz Tadeu Figueiredo, comunicação pessoal). A expressão da proteína N recombinante foi confirmada por “imunoblotting” utilizando-se anticorpos primários contidos no soro de pacientes que tiveram a Síndrome Cardiopulmonar pelo Hantavírus (SCPH). A proteína recombinante purificada em colunas de níquel após solubilização em uréia tem se mostrado bastante adequada nos testes realizados até o momento com soro de pacientes infectados com Hantavirus (Luiz Tadeu Figueiredo, comunicação pessoal), e em estudos sorológicos com roedores selvagens (SOUSA, 2004). Existe a possibilidade de fazer um kit utilizando esta proteína recombinante ser comercializado (Luiz Tadeu Figueiredo, comunicação pessoal).

Entretanto, estudos comparando métodos sorológicos para a detecção do *Puumala virus*, o principal Hantavírus do norte da Europa, mostram que a proteína recombinante N produzida em células de insetos (utilizando-se baculovírus como sistema de expressão) é mais adequada que a proteína produzida em *Escherichia coli* (SJOLANDER, 1997). De fato, a proteína produzida no baculovírus parece ser tão eficiente quanto os antígenos nativos, com relação à capacidade de detecção de anticorpos (SJOLANDER, 1997). Associado a isso, a proteína produzida em *Escherichia coli* mostrou-se menos sensível (SJOLANDER, 1997). Outra evidência relevante a favor da proteína produzida em baculovírus é o fato de que ela ter sido empregada em um teste comercial desenvolvido na Escandinávia (HUJAKKA, 2001). Entre os fatores positivos do baculovírus como sistema de expressão destaca-se também o fato de que, comparado à proteína produzida em *Escherichia coli*, o processo de purificação é mais simples e menos oneroso. Antígenos recombinantes

produzidos em *Escherichia coli* tem de ser altamente purificados, pois, no caso de testes sorológicos, qualquer contaminação com proteínas da bactéria pode resultar em resultados falso-positivos (VAPALAHTI, 1996). Estas constatações mostram que a proteína N, produzida utilizando-se baculovirus como sistema de expressão, é altamente adequada para testes sorológicos quando relacionado à confirmação de hantavirose.

### **2.1.7 Tratamento e Prevenção**

A Hantavirose trata-se de uma doença que atinge adultos previamente saudáveis em todos os grupos etários, progride rapidamente e tem uma das taxas de mortalidade mais altas entre as doenças virais agudas. Além disso, o fato de existirem relatos de transmissão inter-humana desta doença faz com que o desenvolvimento de medidas de controle e profilaxia desta patologia seja essencial.

As manifestações clínicas não são patognomônicas o que torna difícil o diagnóstico precoce de infecção por hantavirus, conseqüentemente faz com que a terapia tenha início tardio, o que poderia explicar a baixa resposta relatada ao uso de corticóides (RIQUELME, 2003). Tais drogas têm o potencial de modular a resposta inflamatória intrapulmonar modificando os níveis de citocinas, tendo sido usado no manejo das desordens pulmonares graves (MER e RICHARDS, 1998).

Foram realizados estudos utilizando-se hamsters sírios adultos (*M. auratus*) como modelo de doença por hantavírus para avaliar a eficácia protetora de candidatos a vacinas, drogas ou imunoproliféricos (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). Obtiveram-se alguns resultados preliminares demonstrando que a inoculação com ANDV provoca o desenvolvimento de SCPH fatal em 91% dos animais, e que imunizações prévias com os vírus HTNV, SEOV, DOBV, PUUV ou SNV protegeram estes hamsters contra a infecção pelo ANDV (HOOPER, CUSTER e THOMPSON, 2001).

Desde 1990, está disponível na Coreia a vacina que utiliza HTNV inativado (LEE, AN e SONG, 1990), porém ainda não há relatos de nenhuma vacina que ofereça proteção cruzada, isto é, que possa ser utilizada como medida profilática de infecções causadas por diferentes hantavírus. Graças a baixa incidência da doença,

a imunização em massa torna-se inviável, fazendo com que seja necessária a identificação dos grupos de risco (HART e BENNETT, 1999).

Foi observado que pacientes com altos títulos de anticorpos neutralizantes apresentam uma evolução clínica mais favorável. Isto sugere que a imunoterapia poderia ser uma opção de tratamento viável às pessoas expostas a SCPH (BHARADWAJ, 2000). Sendo assim, foi administrada vacina de DNA baseada em segmento M de ANDV em macacos. A partir daí, testes demonstraram que a transferência passiva de anticorpos de soro desses macacos protegeu os hamsters da infecção letal pelos ANDV quando administrado até o quinto dia pós-exposição (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). Associado a isso, há trabalhos realizados em roedores e humanos que demonstram que anticorpos maternos podem proteger contra infecções por Hantavírus. Tais resultados não só sugerem que a resposta imune humoral é um importante fator na determinação do curso da infecção e na evolução da doença (RIZVANOVA, 2003; YU, 2006), como também, indicam que o desenvolvimento de anticorpos policlonais de primata, incluindo humanos, imunizados com tal vacina de DNA, poderia ser usado como tratamento dos pacientes e profilaxia para os grupos de risco.

A partir de estudos futuros relacionados à patogênese da Hantavirose, poderão ser formuladas estratégias de profilaxia e terapia pré e pós-exposição.

## 2.2 BACULOVÍRUS

### 2.2.1 Características Virais

Os baculovirus, pertencentes à família Baculoviridae, são os vírus patogênicos a insetos (principalmente da ordem Lepidoptera) mais estudados; sendo divididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (MURPHY *et al.*, 1995). Os *Granulovirus* apresentam corpo de oclusão ovocilíndrico – grânulo - com geralmente um vírion e têm a granulina como principal componente protéico. Já os *Nucleopolyhedrovirus* possuem corpos de oclusão poliédrica – poliedros – contendo vários vírions e têm como principal proteína a poliedrina. Os corpos de oclusão são

responsáveis não só pela proteção das partículas infectivas durante a transmissão do vírus de inseto para inseto, como também permitem aos baculovírus resistirem a condições ambientais fora do hospedeiro.

Quanto ao genoma, o DNA dos baculovírus é circular e em dupla-fita, constituído por 80-200kb (ARIF, 1986). Durante o ciclo de vida dos baculovírus são produzidas duas formas de progênes virais, “Budded virus” (BV) e “Polyedra-derived vírus” (PDV) (Figura 2). Tais progênes são consideradas idênticas quanto ao genótipo, mas diferem quanto ao fenótipo e papéis que desempenham durante o ciclo infectivo do vírus (Granados & Williams, 1986). Os BVs brotam da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular e são envelopados individualmente, sendo responsáveis pela transmissão do vírus de célula para célula. Os PDVs são envelopados ainda no núcleo da célula do hospedeiro, podem ser constituídos por mais de um nucleocapsídeo e são oclusos nos chamados corpos de oclusão, promovendo a transmissão viral de inseto para inseto.

### **2.2.2 Baculovírus como Sistema de Expressão Gênica**

A partir do surgimento da tecnologia do DNA recombinante, os baculovírus se tornaram importantes ferramentas na Biotecnologia devido a sua aplicação como vetor de expressão de proteínas exógenas em escala comercial (O'REILLY, 1992). Entre as vantagens da utilização de baculovírus como sistema de expressão gênica, podem ser citadas: a simplicidade de manipulação; os altos níveis de expressão devido ao fato de alguns genes serem hiperexpressos durante o processo de infecção; a capacidade de acomodarem grandes inserções; permitirem a expressão em células eucarióticas, daí a possibilidade de processamento pós-traducional; a presença de regiões promotoras fortemente ativas (sendo a região promotora da poliedrina a mais utilizada) mesmo nos estágios mais tardios de infecção, o que não interfere no ciclo viral (CASTRO, 1999). Além disso, os baculovírus não são patogênicos a mamíferos o que favorece o uso deste sistema de expressão.

As proteínas inseridas no genoma dos baculovírus podem ser expressas utilizando sistemas de cultura de células ou larvas de lepidópteros susceptíveis ao baculovírus (O'REILLY, 1992). O primeiro sistema é bastante utilizado principalmente devido à facilidade de manuseio das culturas celulares derivadas de



insetos e ao alto grau de controle e opções que oferecem. No entanto, vários fatores podem afetar a quantidade de proteínas produzidas pelo vírus recombinante. Dentre eles, destacam-se as condições de cultura de célula (temperatura, agitação, tipo de meio de cultura, etc), o uso de suplementos e também a linhagem celular utilizada (OGONAH, 1991; SHAO-HUA, 1998; MARANGA, 2003).

### 2.2.3 Baculovírus Recombinante vBac-His-N

Um baculovírus recombinante contendo o gene da nucleoproteína do Hantavírus Araraquara (vBac-His-N) foi recentemente construído no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade de Mogi das Cruzes (MARTINS, 2006). Este baculovirus foi construído a partir da introdução do gene que codifica a nucleoproteína do hantavírus Araraquara ao genoma do *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) recombinante (vSyngal VI-) capaz de expressar a  $\beta$ -galactosidase, porém incapaz de expressar a poliedrina (WANG, 1991). Para tanto, foram utilizados vetores de transferência pSyn contendo o gene de interesse. Assim, foram construídos dois baculovírus recombinantes, ambos capazes de produzir a proteína N. Entretanto o primeiro é capaz de produzir esta proteína junto a uma cauda de histidina, enquanto o outro se trata de uma variante do primeiro, sendo capaz de produzir a proteína N junto a uma seqüência de exportação. Os baculovirus recombinantes, uma vez obtidos, foram purificados a partir de diluições seriadas, tiveram confirmadas as seqüências do gene de interesse inserido no seu genoma por PCR e estoques virais foram produzidos para a futura expressão e purificação da nucleoproteína do hantavirus Araraquara.

Estudos preliminares mostram que células de insetos em cultura infectadas com este recombinante produzem uma proteína, cujo peso molecular (próximo a 55 kD) é similar ao da nucleoproteína. Sabe-se que uma proteína com tal peso molecular não ocorre no baculovírus que foi usado na construção do vBac-His-N. Assim, pressupõem-se que a proteína expressa corresponde à nucleoproteína recombinante.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

A proposta deste projeto foi investigar a produção da nucleoproteína de Hantavírus a partir do baculovirus recombinante vBac-His-N.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Confirmação da expressão da nucleoproteína de Hantavírus por Western Blot;
- Análise da expressão da nucleoproteína N do Hantavirus recombinante em diversos períodos pós-infecção de células Sf-9;
- Avaliação da eficiência do método de cultura celular do tipo monocamada para a obtenção da nucleoproteína de Hantavírus, através da produção da proteína N do Hantavírus recombinante com células Sf-9 em suspensão;
- Avaliação da antigenicidade da proteína produzida a partir de testes ELISA com a nucleoproteína purificada e do lisado celular bruto;
- Analisar a expressão da proteína;
- Produzir e testar para fins diagnósticos.

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Durante o trabalho, todos os experimentos foram realizados com o vBac-His-N. Sabe-se que durante a produção deste vírus foram produzidos outros dois tipos virais. Um deles contendo o gene de exportação da proteína N (denominados V1 e VR) enquanto o outro não (V5). Para determinar qual dos dois tipos virais estava

sendo utilizado, foram realizados diferentes PCR. Para tanto foram utilizados três conjuntos de primers distintos e condições diferentes programadas no termociclador. A primeira reação mostrou a similaridade entre as cepas virais. Para isso, foi utilizado o conjunto de primers Han/Flan 5'(5' CAC AGC CGC CCG TCT ACC 3') e pol AcR, ambos diluídos de 1:10. Na reação foi utilizado 1uL da amostra de DNA viral (extraída 5 dias após a infecção), 1uL de dntp, 1uL de taq-polimerase, 1,5uL tampão, 1uL de cada um dos primers e 8,5uL de água deionizada, totalizando 15uL de solução. As três reações (cada uma com um recombinante) foram homogeneizadas e colocadas no termociclador. O programa utilizado consistia na temperatura de 94°C inicialmente por quatro minutos para separação das fitas de DNA. Os ciclos foram repetidos por trinta vezes e consistiam na temperatura de 94°C por um minuto, seguida de 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Foram aplicados 5uL das amostras finais em gel de agarose 0,8%. O mesmo procedimento foi repetido para outro conjunto de primers a fim de se obter melhores resultados para purificação e posterior seqüenciamento. Assim, foram utilizados os primers Han/Flan 5' e Pr\_syn rev (5' TCTGTAAATCAACAACGCACAG 3'). Nesta reação, foi aumentada a temperatura de anelamento de 60°C para 65°C e mantidas as demais condições.

## 4.2 SEQUENCIAMENTO

As amostras obtidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase foram purificadas utilizando-se o Kit Omega. O material purificado foi encaminhado para análise no CCB/USP (Centro de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo). O equipamento utilizado para o seqüenciamento foi o ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Perkin-Elmer). A análise tinha por objetivo a determinação do tipo viral produtor da proteína N.

### 4.3 CULTURA DE CÉLULAS DE INSETO

Foi utilizada a linhagem celular Sf9, derivadas de ovário de *Spodoptera frugiperda*. Estas células, cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo, são de fácil manutenção, não necessitam de CO<sub>2</sub> e crescem a 27°C. O meio de cultura utilizado foi o TC-100 (Cultlab) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

### 4.4 RECOMBINANTE vBac-His-N

O baculovírus recombinante vBac-His-N foi construído no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade de Mogi das Cruzes (MARTINS, 2006) a partir do recombinante vSyngal VI- (WANG, 1991). O vSyngal VI- trata-se de um *Autographa californica* Nucleopoliedrovirus (AcMNPV) modificado que expressa a β-galactosidase, mas não expressa a poliedrina (sendo, portanto, incapaz de produzir poliedros virais).

O gene N usado neste trabalho origina-se de RNA viral extraído de soro de pacientes da região de Ribeirão Preto. O plasmídeo pET Directional TOPO® (Invitrogen, USA), contendo o gene N, foi enviado gentilmente pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo. A partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi então sintetizada uma cópia do gene N, contendo a cauda de histidina presente no pET (MARTINS, 2006).

Após a síntese, o gene N foi inserido no plasmídeo pSynXIVX3 (vetor de transferência para o vírus vSyngal VI-), a partir da digestão de ambos com as enzimas de restrição *Bgl*II (Biolabs) e *Xma*I (Biolabs) (WANG, 1991; MARTINS, 2006). Este vetor possui o gene da poliedrina, que neste caso é usado como marcador na construção do vírus recombinante. O vírus recombinante - vBac-His-N – foi obtido por co-transfecção e tem por características a capacidade de formar poliedros, não produzir a β-galactosidase (uma vez que o gene *Lac-Z* fora substituído pelo fragmento de interesse), além de conter o gene N inserido ao seu genoma.

## **4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE vBac-His-N E DA PUREZA DO ESTOQUE VIRAL**

A titulação do vírus vBac-His-N foi realizada através do método de formação de placas, conforme descrito na literatura (O.Reilly, 1992). Várias diluições do estoque viral foram utilizadas para a infecção de células em placas de seis poços (“six well plates”), nas quais cerca de  $1,0 \times 10^6$  células Sf9 se encontram em fase exponencial de crescimento. Uma hora após a infecção, o inóculo viral foi removido. Logo em seguida, uma solução de meio de cultura contendo 2% de agarose NA (Amersham) e X-gal (120  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionada aos poços formando uma camada que cobre completamente as células. As células infectadas com o vBac-His-N produziram poliedros em três ou quatro dias após a infecção. A presença dos poliedros serve como marcador para a contagem de placas contendo células infectadas e, conseqüentemente, ajuda na avaliação do título do estoque viral. Este procedimento também auxilia a avaliação da pureza do estoque viral, pois a presença de vSyngal VI- (o vírus sem a nucleoproteína, capaz de expressar a  $\beta$ -galactosidase) resulta na formação de placas azuis (resultado do contato entre a  $\beta$ -galactosidase expressa e o X-gal da placa).

### **4.5.1 Infecção das células e extração do lisado celular bruto**

Células Sf9 em fase exponencial de crescimento foram infectadas com uma quantidade de partículas virais suficientes para se atingir 10 MOI (mode of infection), isto é, 10 partículas virais por célula. As células infectadas foram removidas dos frascos 48, 72 e 96 horas após a infecção e utilizadas para a extração de proteínas.

As células foram transferidas para um tubo tipo Falcon 10mL, submetidos à centrifugação por três minutos com rotação igual a 2000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular solubilizado em tampão PBS (1X) resfriado. O processo de centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetido para se eliminar a contaminação com o meio de cultura. O precipitado foi então transferido para um tampão de lise celular (2x SDS Loading buffer: 4% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.7, 30% glicerol, 0,002% azul de bromofenol e 2%  $\beta$ -mercaptoetanol - este último

adicionado imediatamente antes do uso da solução tampão). Alíquotas deste extrato foram submetidas diretamente à eletroforese em gel de poliacrilamida. Este procedimento foi realizado em infecções de células mantidas em culturas de monocamadas.

#### **4.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

As amostras protéicas foram submetidas à SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida 12,5% (LAEMMILI, 1970). Como padrão, foi utilizado o marcador BenchMark (Invitrogen), o qual marca pesos moleculares entre 10 e 220 kDa, com destaque (maior intensidade) para as bandas de 20 e 50 kDa. A coloração dos géis foi feita com Coomassie Brilliant Blue.

### **4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE**

A produção do vírus recombinante foi avaliada pela quantidade de poliedros virais produzidos por volume de meio de cultura. Os poliedros virais são cristais protéicos, formados pela proteína poliedrina expressa em largas quantidades na fase final da infecção por baculovírus. Os poliedros virais são facilmente observados por microscopia óptica e sua contagem em câmaras de Newbauer é um procedimento de rotina em laboratórios que trabalham com baculovirus. No vírus vBAC-His-N a poliedrina e a nucleoproteína estão sob o controle transcricional de regiões promotoras semelhantes (a região promotora usada para a nucleoproteína é uma versão modificada da região da poliedrina). Sendo assim, é razoável assumir que a quantidade de poliedros seja um indicativo da quantidade de nucleoproteínas expressas.

## 4.7 PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE NÍQUEL

Este método de purificação foi baseado na presença de uma "cauda", isto é, uma seqüência de vários aminoácidos histidina, incorporados à nucleoproteína recombinante. A histidina possui anéis que podem se ligar ao íon de  $Ni^{+2}$  presentes na resina utilizada para purificação (SCHMITT, 1993). Na primeira etapa do procedimento, as células infectadas com o vírus recombinante foram lisadas. Em seguida, o lisado celular foi exposto à coluna de níquel que retém apenas proteínas que contenham a "cauda" de níquel. Segue-se uma etapa de lavagem para retirada das proteínas não ligantes. Finalmente, um tampão de eluição é adicionado e contém uma grande quantidade de imidazol. Esta substância tem alta afinidade por íons níquel e faz com que a proteína (com a "cauda" de níquel) se desprenda da coluna.

Para purificação da nucleoproteína recombinante, frascos contendo 13mL de células Sf9 em fase exponencial de crescimento foram infectas com o vBac-His-N (MOI = 10). Os reagentes do kit "Ni-NTA Buffer Kit" (Novagen) foram utilizados para a purificação da proteína e os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante.

A extração protéica foi feita 72 e 96 horas após a infecção. A monocamada celular foi transferida para um tubo falcon e lavada com 12 mL de solução PBS 1X (pH 7,4). A solução foi centrifugada 1.700 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se o tampão de lise (4mL de solução de PBS (1x) com uréia 8M, pH 8,0).

A resina para purificação da proteína foi preparada adicionando-se 1mL de "Ni-NTA His-bind" a 4mL de 1X Ni-NTA Bind Buffer. Após suave agitação, a mistura ficou em repouso por alguns minutos de forma a permitir a precipitação pela ação da gravidade. Após a precipitação da resina no fundo do frasco, os 4mL do sobrenadante foram removidos com uma pipeta e descartados. Adicionou-se 4mL do lisado celular à 1mL da resina (equilibrada com o tampão fornecido pelo kit). O material foi então submetido a agitação (200 rpm) por 60 minutos à 4°C. Após este período, o lisado celular com a resina foi centrifugado por 5 minutos à 25°C com rotação de 200xg, realizando procedimento de separação por solução de eluição. Para tanto, o sobrenadante foi guardado para análise por SDS-PAGE. Seguiu-se a

lavagem da membrana com o tampão de lavagem (Tampão PBS 1x, pH 6,3; 5,9 e 4,5). As frações obtidas pela centrifugação foram também coletadas para análise por SDS-PAGE.

#### **4.8 WESTERN BLOT**

Para a realização do Western blot, as proteínas submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen, USA) utilizando a técnica de "eletroblotting" e o equipamento "Electroblotting System" (Owl, USA). No "eletroblotting" a membrana de nitrocelulose é colocada junto ao gel de poliacrilamida e várias camadas de papéis filtros embebidos em solução de transferência. O conjunto foi então submergido em tampão de transferência e submetido a uma amperagem de 200-500mA de 45-120 minutos. Com a ação da amperagem, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida são transportadas para a membrana de nitrocelulose onde se fixa, em um menor espaço de tempo.

A membrana de nitrocelulose "carregada" com as proteínas do gel é então utilizada no "Western blotting". Para isto, a membrana foi inicialmente tratada com solução de bloqueio (Invitrogen, USA) de 30-60 minutos. Para obtenção de melhores resultados, a solução de bloqueio foi modificada de forma que fosse composta por leite em pó e Tween 20.

Após este tratamento, anticorpos anti-nucleoproteína produzidos em camundongos (cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo) foram colocados em contato com a membrana na solução de bloqueio e incubados por cerca de 60 minutos. Estes anticorpos se ligam de forma específica somente à nucleoproteína. Passado este período, a membrana foi lavada com tampão PBS e água deionizada ao qual foi adicionado anticorpos anti-IgG-Mouse (Invitrogen, USA) ligado a enzima peroxidase. Após uma hora de incubação, a membrana foi novamente lavada com tampão PBS. O substrato da enzima peroxidase (Peróxido de Hidrogênio) e substâncias cromógenas (Cloro Naftol e DAB - diaminobenzidina) foram adicionados à solução na qual a membrana está imersa e deixados em contato com a mesma por 20



minutos. A adição do substrato e da substância cromógena possibilitou a visualização das regiões nas quais o anticorpo anti-nucleoproteína se ligou.

#### **4.9 TESTE ELISA**

Um teste ELISA qualitativo foi realizado para avaliar a possibilidade de utilização de extratos celulares brutos obtidos de células infectadas com o vírus vBac-His-N e a nucleoproteína purificada em testes diagnósticos. Para isto, o extrato bruto (lisado celular) e a nucleoproteína purificada foram diluídos em PBS e adicionados às microplacas. Como controle positivo, foi utilizado diluições da nucleoproteína produzida em *Escherichia coli* (cedida pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo). Como controle negativo, foram utilizados extratos celulares obtidos de células Sf9 infectadas com o vírus vSynGal. Para a sensibilização das placas, todo material adicionado foi incubado por pelo menos 14 horas à temperatura ambiente e após este período as microplacas foram lavadas com PBS. Anticorpos anti-nucleoproteína produzidos em camundongos foram adicionados aos orifícios das placas e deixados por pelo menos 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavagem. Para a detecção dos anticorpos primários foram utilizados anticorpos anti-IgG Mouse ligados à enzima peroxidase. A adição do substrato da peroxidase (Peróxido de Hidrogênio) e de substâncias cromógenas produziu uma coloração roxa nas amostras positivas.

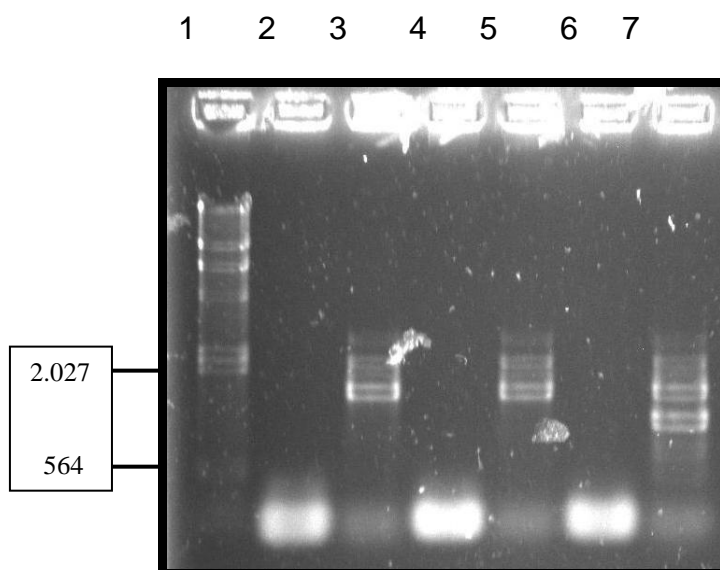
#### **4.10 DOSAGEM DA PROTEÍNA N**

Após a investigação e identificação da proteína N, as amostras foram enviadas para o Instituto Adolfo Lutz, onde foram realizadas a comprovação, quantificação e especificidade da proteína, a partir do método de Bradford (comunicação pessoal).

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

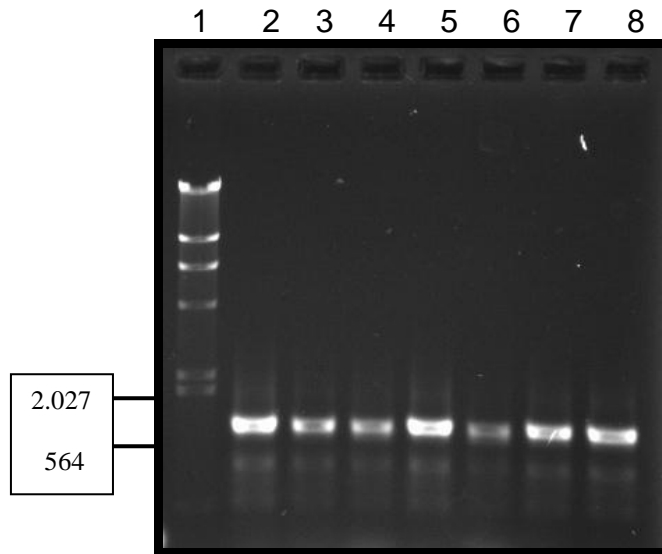
## 5.1 CONFIRMAÇÃO DA ORIGEM DO MATERIAL VIRAL A PARTIR DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A primeira reação foi realizada como confirmação da origem da cepa viral utilizada durante o projeto. Foram comparados os vírus V1 (capaz de exportar a proteína N para a membrana da célula infectada), V5 (sem tal capacidade) e o vírus VR (recombinante vBac-His-N, utilizado neste projeto). As ampliações (Figura 3) sugerem a similaridade entre os vírus V1 e VR. Isto porque as três cepas virais apresentam fragmentos amplificados com o conjunto de primers 2. Entretanto, os vírus V1 e VR apresentam três ampliações de tamanhos semelhantes (entre 1800pb a 2500pb), enquanto que o V5 apresenta um fragmento adicional de, aproximadamente, 700pb.

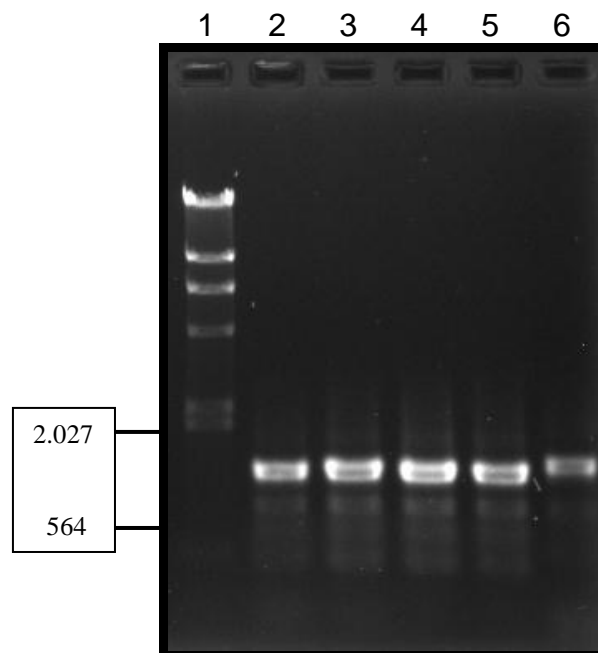


**Figura 3: Comparação entre os vírus V1, VR e V5, por Reação em Cadeia da Polimerase.** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da análise eletroforética do produto de PCR utilizando-se os vírus V1, V5 e VR como molde e dois conjuntos de primers. Conjunto de primers 1: GP 67/REVER2 - HAN/FLAN 5'. Conjunto de primers 2: GP 67/REVER2(5'GAA GAT CTG CCG CAA AGG CAG AAT GCG CCGCCGC 3') - GP 67/FOR (5'CCG CTC GAG ATG CTA CTA GTA AAT CAG TCA CACCAA GGC). (1) Marcador padrão ( $\lambda$  DNA digerido com Hind III); (2) amostra 1 (conj 01); (3) amostra 1 (conj 02); (4) amostra R (conj 01); (5) amostra R (conj 02); (6) amostra 5 (conj 01); (7) amostra 5 (conj 02).

A partir dos resultados obtidos, foram feitas novas reações utilizando-se os primers Han/Flan 5' e Pr\_syn com os vírus V1 e V5 (Figura 4) e VR (Figura 5), a fim de se obter fragmentos para serem sequenciados. Foram obtidos fragmentos de tamanhos semelhantes (aproximadamente 1300pb).

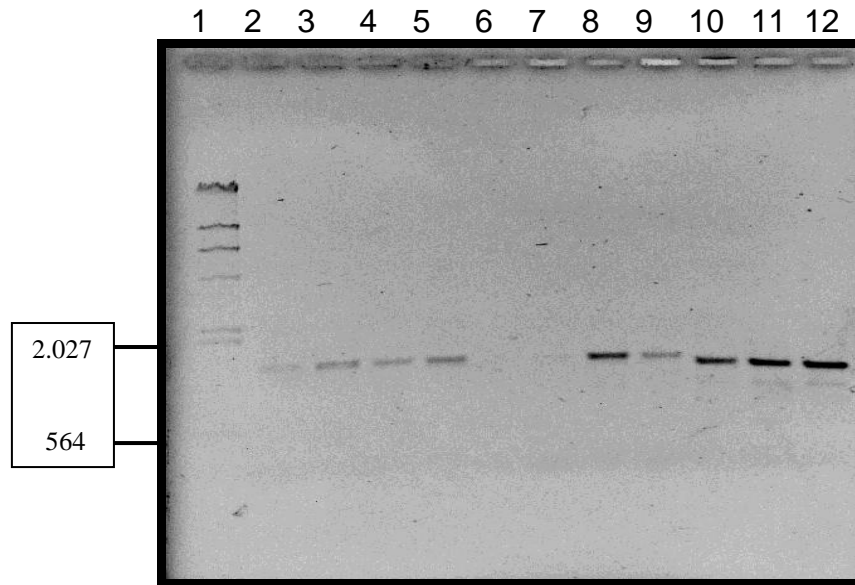


**Figura 4: Comparação entre os vírus V1 e V5 por Reação em Cadeia da Polimerase.** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da análise eletroforética do produto de PCR utilizando-se os vírus V1 e V5 como molde e o conjunto de primers Pr\_syn/ Han-Flan5'. (1) Marcador padrão ( $\lambda$  DNA digerido com Hind III); (2 - 5) Vírus V1; (6 - 8) Vírus V5.



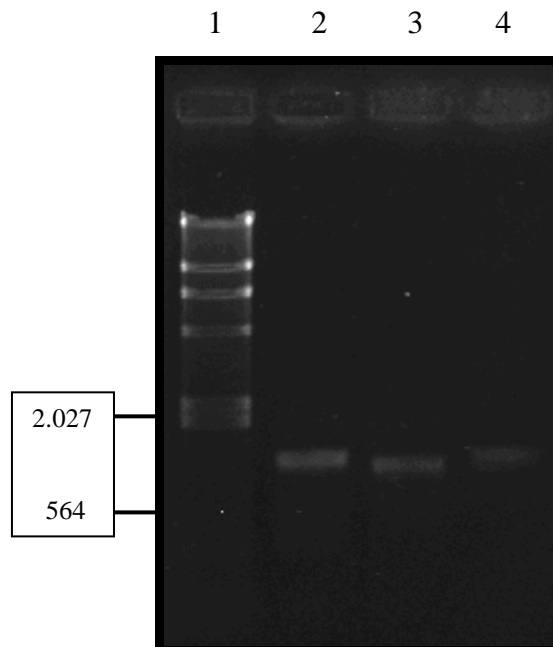
**Figura 5: Comparação entre os vírus V5 e VR por Reação em Cadeia da Polimerase.** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da análise eletroforética do produto de PCR utilizando-se os vírus V5 e VR como molde e o conjunto de primers Pr\_syn/ Han-Flan5'. (1) Marcador padrão ( $\lambda$  DNA digerido com Hind III); (2; 3) Vírus V5; (4 - 6) Vírus VR.

Para serem obtidos melhores resultados, com a finalidade de serem realizados purificação e sequenciamento posteriormente, as reações foram repetidas sob as mesmas condições exceto pela mudança de temperatura de anelamento de 60°C para 65°C (Figura 6).



**Figura 6: Comparação entre os vírus V1, VR e V5 por Reação em Cadeia da Polimerase.** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da análise eletroforética do produto de PCR utilizando-se os vírus V1, VR e V5 como molde e o conjunto de primers Pr<sub>syn</sub>/ Han-Flan5'. (1) Marcador padrão ( $\lambda$  DNA digerido com Hind III); (2 - 5) Vírus VR; (6 - 9) Vírus V1; (10 - 12) Vírus 5.

O produto de PCR foi então purificado com o kit OMEGA e sua qualidade foi confirmada em gel de agarose (Figura 7). A partir da foto obtida, foi possível notar a diferença de poucos pares de bases entre os vírus V1 e VR comparado com o vírus V5.



**Figura 7: Purificação da Reação em Cadeia da Polimerase com os primers Pr<sub>syn</sub>/ Han-Flan5'.** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da análise eletroforética do produto de purificação de PCR utilizando-se os produtos de PCR obtidos com os vírus V1, VR e V5 como molde e o conjunto de primers Pr<sub>syn</sub>/ Han-Flan5'. (1) Marcador padrão ( $\lambda$  DNA digerido com Hind III); (2) Vírus V1; (3) Vírus V5; (4) Vírus VR.

## 5.2 SEQUENCIAMENTO

O produto de PCR purificado foi submetido a reação de sequenciamento. A partir do sequenciamento, foi confirmada a origem do vírus VR, que contém a cauda de histina e que, portanto, é capaz de exportar a proteína N para a membrana da célula hospedeira, assim como o vírus V1. (Quadro 1). Ainda foi possível confirmar que o vírus V5 não apresenta tal capacidade, justamente por não conter a cauda de histina em seu material genético (Quadro 2).

Sinal de exportação localizado

Início: posição 25

TAAATAGATCATCGAATTCTCGAGATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCT  
TCAATAAGGAACACACAAGCAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTT  
GGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTGCGAGATCTATGCGGGGTCTCATCATCAT  
CATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGT  
ACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGAGCAACTCCAAGAATTAGA  
GAAAAACATCACCGCACACGAACAACAGCTCGTGACTGCAAGGCAGAAGCTTAA  
AGATGCAGAAAAAGCAGTTGATGGACCCAGAG

Sinal de exportação, com o sítio de restrição incluído: CTCGAGATGCTACTAG

Início da cauda de histidina: ATGCGGGG

Início do gene N: AGCAACC

**Quadro 1: Sequencia gênica dos vírus V1 e VR a partir do PCR utilizando-se os primers Pr\_syn/ Han-Flan5´. As amostras utilizadas foram: A03\_Rob1\_01 (corresponde a sequencia de DNA V1, primer F); B03\_ROB2\_03 (corresponde a sequencia de DNA VR, primer F)**

Sinal de exportação localizado

Início: posição 25

TAATAAAAAACCTATAAATAGATCATCGAATTCTCGAGCTGCAGATCTATGCGG  
GGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA  
GGGTCGGGATCTGTACGAGGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCGTGAGCA  
ACTCCAAGAATTACGGGAAAACATCTCCGCACACGAACAACGGCTCGTGACTG  
GCAGGCAGAAGCTTAAAGATGCAGAAAAAGCAGTGA

Início da janela de leitura e da cauda de histidina ATGCGGGG

Região do plasmídeo que antecede o sinal de exportação: ...TTCTCGAG

Início do gene N: AGCAACC

**Quadro 2: Sequencia gênica do vírus V5 a partir do PCR utilizando-se os primers Pr\_syn/ Han-Flan5´. A amostra utilizada foi: C03\_ROB3\_05 corresponde a amostra V5, primer forward A03\_Rob1\_01.**

## 5.3 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA N

### 5.3.1 Cultura de Células de Inseto

Durante a execução do trabalho foram utilizadas células de Sf9, doadas gentilmente pelo Laboratório de Virologia Molecular da Universidade de São Paulo, estas, foram tratadas, para melhor desenvolvimento e adequação com o meio de cultura TC-100 suplementada com soro fetal bovino 10%, uma vez que eram cultivadas em outro meio de cultura, que não possuía soro fetal bovino. As células foram colocadas em garrafas T-25 ou T-75, dependendo do volume de material que se desejaria obter. O cultivo celular foi feito em monocamada a 27° C, sendo que a cada 24 horas era necessária a troca do meio de cultura para melhor manutenção do meio celular. Assim foi possível melhorar o crescimento das células e a partir daí houve melhor aproveitamento na infecção com vírus bruto, selvagem e/ou recombinante.

Durante a pré-infecção, observou-se o crescimento celular exponencial (desenvolvimento), cujo objetivo é um índice menor que 80%. Assim, 24h após a infecção, se tem uma boa contaminação, com início de formação de pontos de oclusão no interior do núcleo e em praticamente 85% das células, o que indica uma boa infecção, com 48 horas pós infecção, já pode visualizar formação de poliedros (cristais no interior celular), porém em pequena quantidade em se tratando do quantidade de células, com 72h já se tem maioria das células infectadas e com 2 ou 3 poliedros no interior do núcleo, o melhor momento para extração acontecia em 96 h, onde praticamente 98% das células estavam infectadas e apresentando 5 ou mais poliedros. Foi possível executar a extração com praticamente todas as células infectadas. Para um tempo maior de infecção, quando eram passados mais que 96h, começava a ter perda de proteínas, pois as células se degeneram, havendo lise (rompimento) de citoplasma e extravasamento para o meio de cultura.

### 5.3.2 Extração da Proteína N

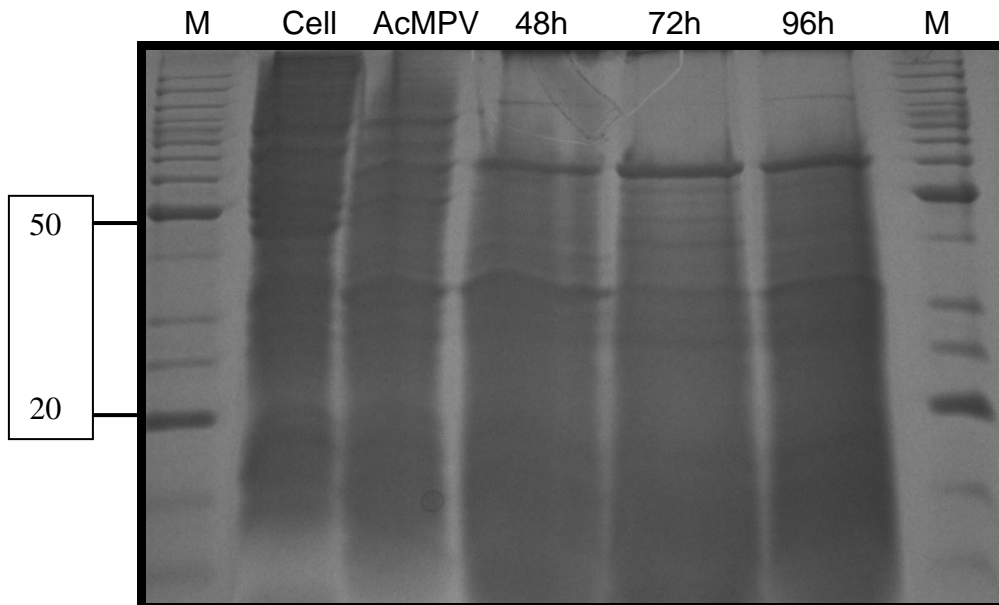
O cultivo de células eram sempre realizadas em garrafas T-25, sendo 5 mL de caldo TC-100, 10% SFB, em suspensão monocamada, e após 36 ou 48 horas, adicionava 500 uL de caldo contendo vírus. Através de microscopia óptica, a cada 24 h, observou-se a formação ou não de poliedros (cristais intra-citoplasma), o que foi possível apenas nas células contaminadas com o vírus recombinante da proteína N. A extração se dava a partir da contaminação completa de toda a camada celular, por volta de 72 ou 96h pós-infecção e com preenchimento completo do citoplasma celular. Na garrafa de T-25 havia um volume bruto de 5,5 mL com formação de aproximadamente 0,3 mL de precipitado bruto. Já na garrafa T-75 foi obtido um valor de aproximadamente 14 mL de amostra total para 1 mL de precipitado bruto. Tais precipitados foram separados após centrifugação de 2 a 3 minutos a 1.500 rpm.

### 5.3.3 Géis de Poliacrilamida

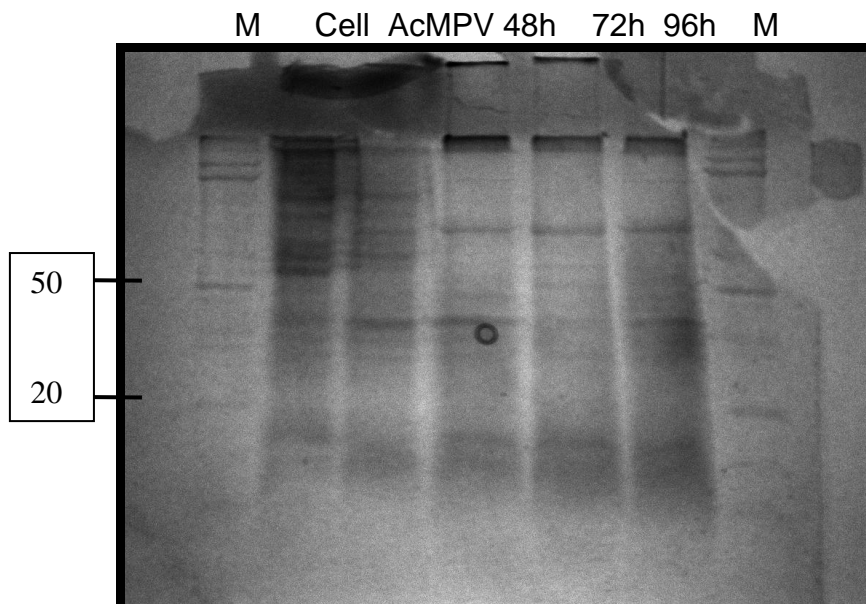
Com relação a expressão da proteína, a cultura do vírus foi realizada em meio TC-100 contendo células Sf-9, onde após 48, 72 e 96 h, foi feita extração da proteína N, e estas amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5%, utilizando-se como marcador o controle BenchMarck, para proteína de 10 a 220 kDa. Posto que a proteína N possui um peso médio de 56 kDa, foi observado uma forte presença da banda nas culturas de 72 e 96 h pós infecção (figura 8); para esta extração foi utilizado solução de lise. Ainda assim houve a necessidade de tornar as bandas mais puras. A temperatura antes da aplicação das amostras foi aumentada durante 3 minutos para 96° C para desproteínizar a amostra (figura 9). Mesmo assim observou-se um grande número de proteínas interferentes no processo, sendo estas oriundas de estroma celular (figura 10), também foi possível notar nas análises dos géis que a presença da banda de interesse, ou seja a proteína N (56 kDa), era mais marcante no extrato obtido a partir de 72 h pós infecção, sendo que a 96 h, ele se apresenta com maior intensidade.

Visto que havia a necessidade de produzir um gel com o menor número de proteínas inespecíficas possíveis, partiu-se do princípio da desproteínização, como também do volume a ser aplicado em cada canaleta (figura 11). Foi mantida a

mesma amostra obtida, sendo também aquecida a 96° C por 3 min, mas o volume aplicado foi de 10 uL. Assim foi alcançada melhora na visualização do gel em se tratando de proteínas inespecíficas.

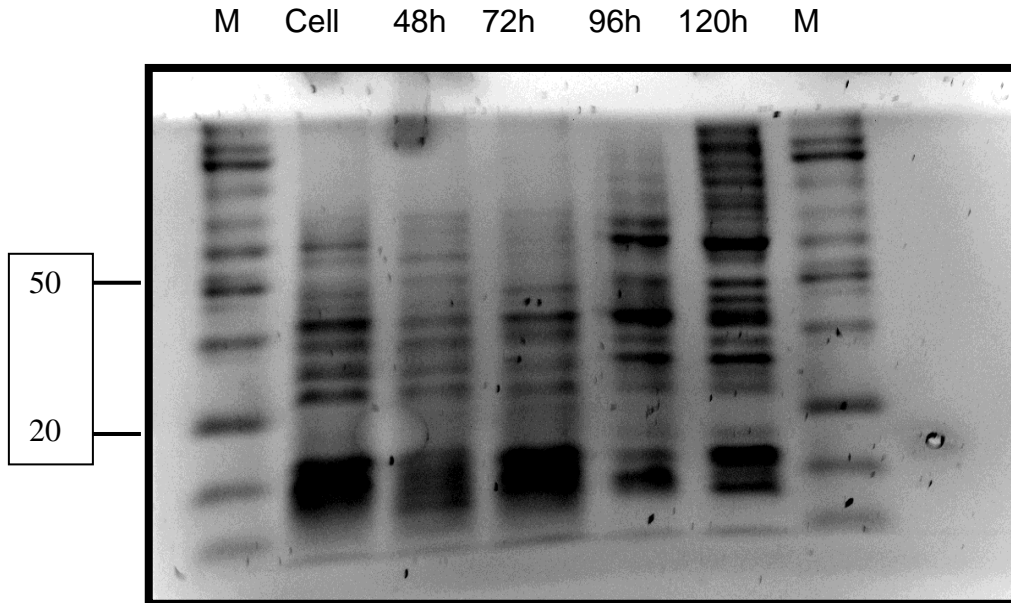


**Figura 08: Análise em Gel de Poliacrilamida da Nucleoproteína N extraída após 48, 72 e 96 h da infecção.** M- marcador; cell- extrato de cultura de células, AcMPV- extrato de células infectadas com AcMPV; recombinante 48, 72 e 96h- período de incubação pós infecção, volume de aplicação fora de 20 uL de amostras e 5 uL do marcador, corado por comassie blue, observa-se presença de uma com maior intensidade entre 50 e 60 kDa, sendo a proteína N de 56 kDa .

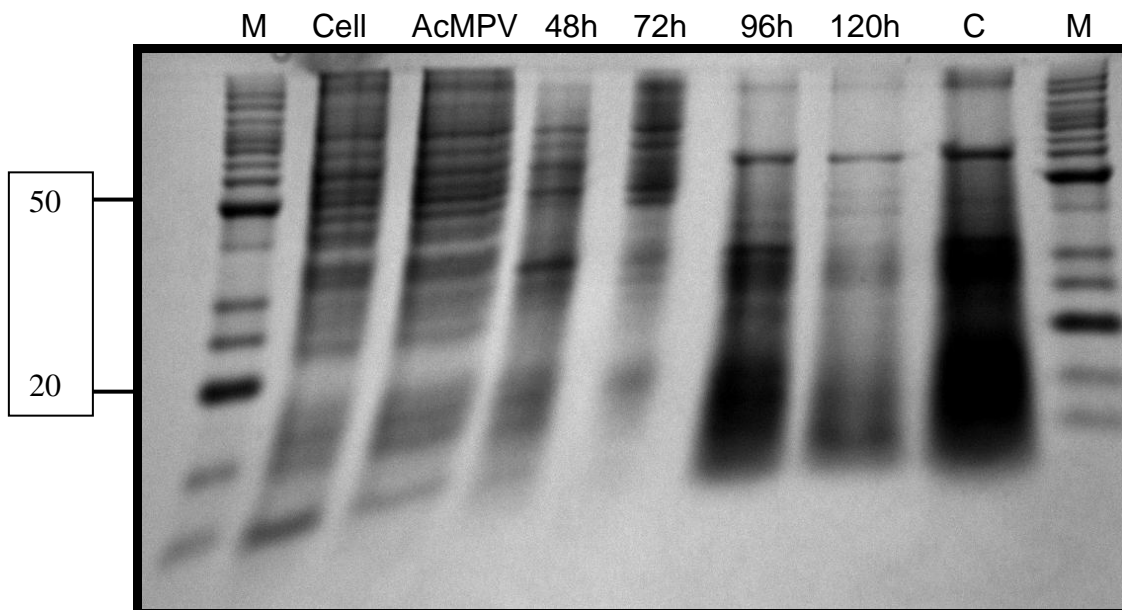


**Figura 09: Análise em Gel de Poliacrilamida da Nucleoproteína N extraída após 48, 72 e 96 h da infecção e desproteínizada (96°C) a fim de melhorar a visualização no gel.** M- marcador; cell- extrato de cultura de células, AcMPV- extrato de células infectadas com AcMPV; recombinante 48, 72 e 96h- período de incubação pós infecção, a amostra do extrato fora desproteínizada por aumento de temperatura, 3 min à 96°, volume de aplicação fora de 10 uL de amostras e 5 uL do marcador, corado por comassie blue, observa-se presença de uma com maior intensidade entre 50 e 60 kDa, sendo a proteína N de 56 kDa, Com a desproteíneização houve uma pequena diminuição das bandas inespecíficas.





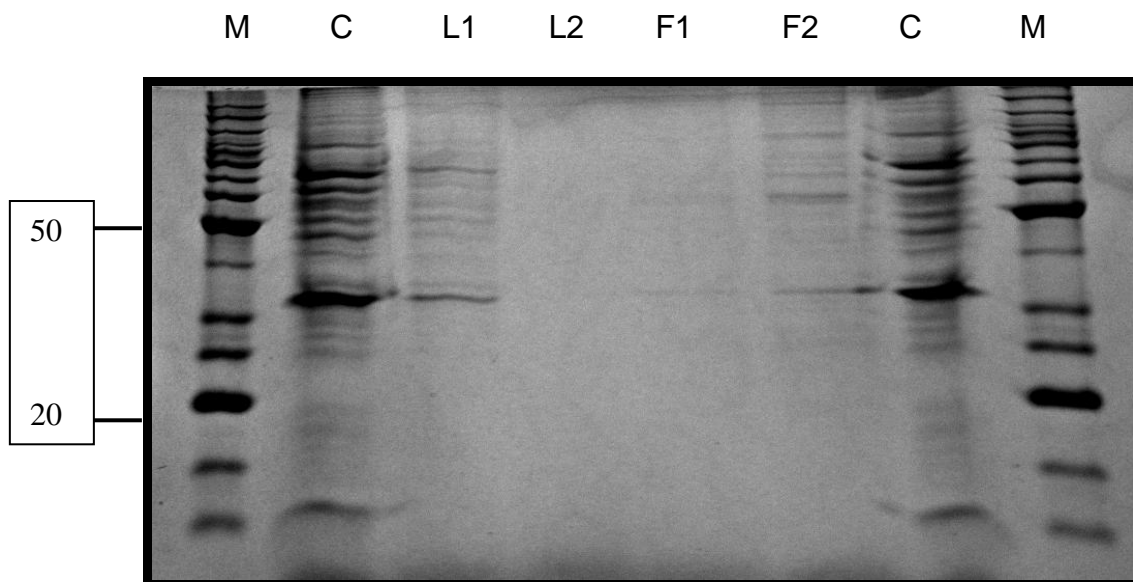
**Figura 10: Extração da proteína com uréia 8M.** M- marcador; cell- extrato de cultura de células, recombinante 48, 72, 96 e 120h- período de incubação pós infecção, a amostra do extrato no fora desproteinezada por aumento de temperatura, 3 min à 96°, volume de aplicação fora de 15 uL de amostras diluídas em 20 ul de água millq e 5 uL do marcador, corado por comassie blue, a extração da proteína fora feita com PBS 1x com 8M de uréia, pH 8,0, sendo a uréia utilizada como desproteinizante, a presença das bandas de 56 kDa se tornaram mais fortes como também as bandas inespecíficas.



**Figura 11: Extração da proteína com uréia 8M, comparativo com a proteína E.coli.** M- marcador; cell - extrato de altura de células, AcMPV- extrato de células infectadas com Acmpv; recombinante 48, 72, 96 e 120h- período de incubação pós infecção; C- controle de proteína N extraída de *Escherichia coli*, a amostra do extrato fora desproteinezada por aumento de temperatura, 3 min à 96° e realizada com PBS 8M uréia, pH 8,0, volume de aplicação fora de 15 uL de amostras com 15 uL de água, controle 15 uL e 5 uL do marcador, corado por comassie blue, observa-se presença da banda de 56 kDa com ótima intensidade em 96h p.i.,

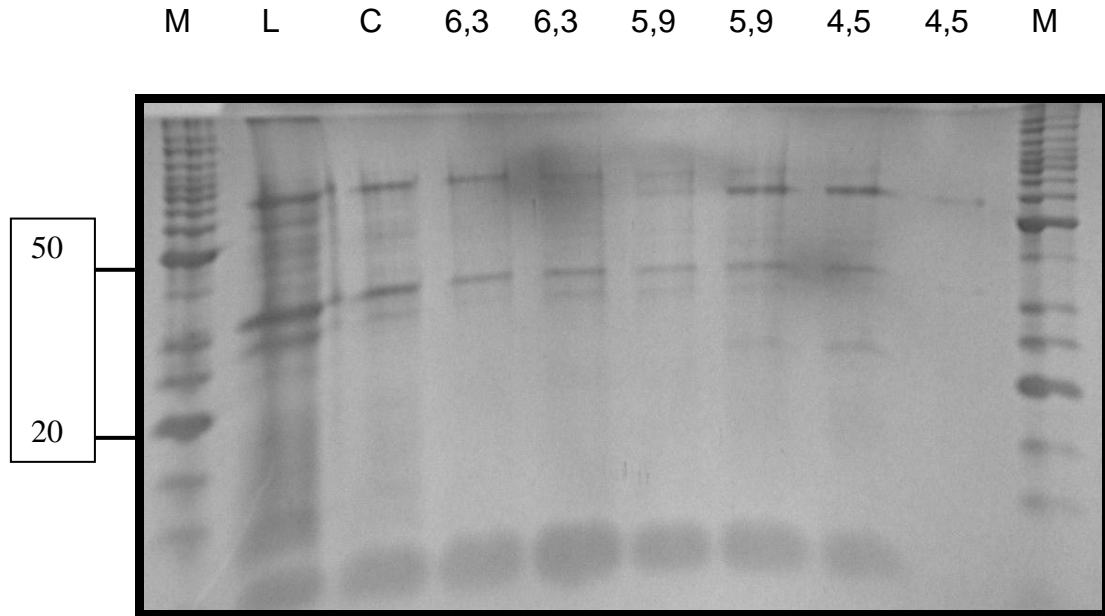
Ainda com a intenção de melhorar a qualidade do gel, e tornar a proteína mais visível, foi realizada outra infecção usando os mesmos critérios. Porém ao extrair, foi utilizado solução de uréia a 8M, como desproteinizante. Obteve-se uma melhor visualização da proteína N, com melhor caracterização da mesma (figura 10). Ainda assim foi observada grande quantidade de proteína (figura 11). Foram diminuídos os volumes a serem aplicados, e estes foram diluídos em 50%, utilizando-se água deionizada, aplicando-se apenas 15 uL no gel. Observou-se forte banda nas amostras 72 e 96 h, e pequena diminuição das proteínas inespecíficas.

#### 5.3.4 Purificação em Coluna de Níquel

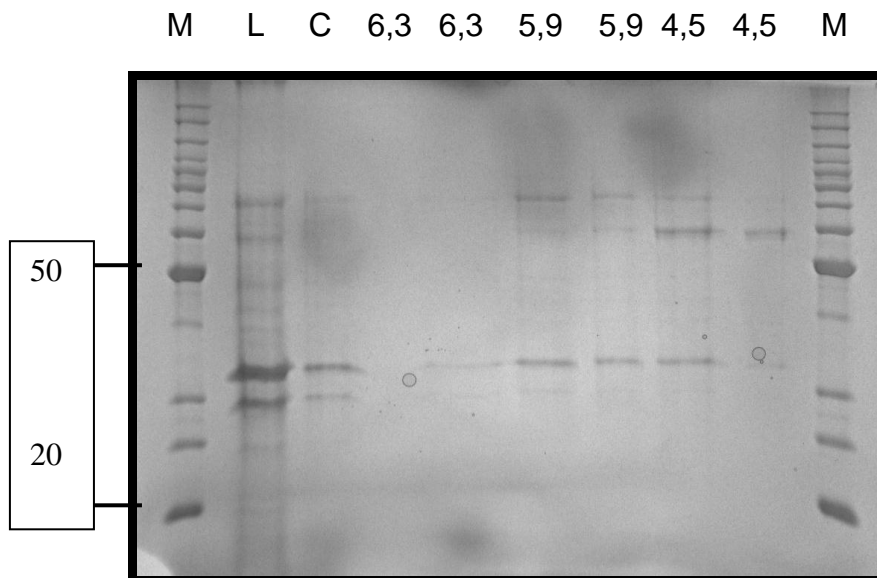


**Figura 12: PURIFICAÇÃO COM HIS-TAG** M- marcador; C- Controle proteína N, *Escherichia coli*; L1- 1º lavado 2 ml PBS 6M uréia, pH 5,9; L2- 2º lavado 2ml PBS 6M uréia, pH 5,9; F1- 1º coleta de material com 1 ml de PBS 6 M, pH 4,5; F2- 2º coleta de material com 1 ml de PBS 6 M, pH 4,5 , desproteinezada por aumento de temperatura, 3 min à 96º e extração realizada com PBS 8M uréia, pH 8,0, volume de aplicação fora de 15 L de amostras com 15 ul de água, controle 15 uL e 5 uL do marcador, corado por comassie blue, observa-se presença da banda de 56 kDa com ótima intensidade apenas na amostra F2, 96h de p.i.,

Na tentativa de melhorar a purificação da proteína, foi utilizado o kit His-tag, para o mesmo material extraído nas mesmas condições que para cromatografia de Ni 2+. Notou-se que não houve presença da proteína N (figura 12), enquanto que na cromatografia foi possível visualizar uma melhor concentração da proteína com diminuição acentuada das proteínas inespecíficas, além da forte presença da proteína N quando eluída em pH 4,5 (figuras 13 e 14).

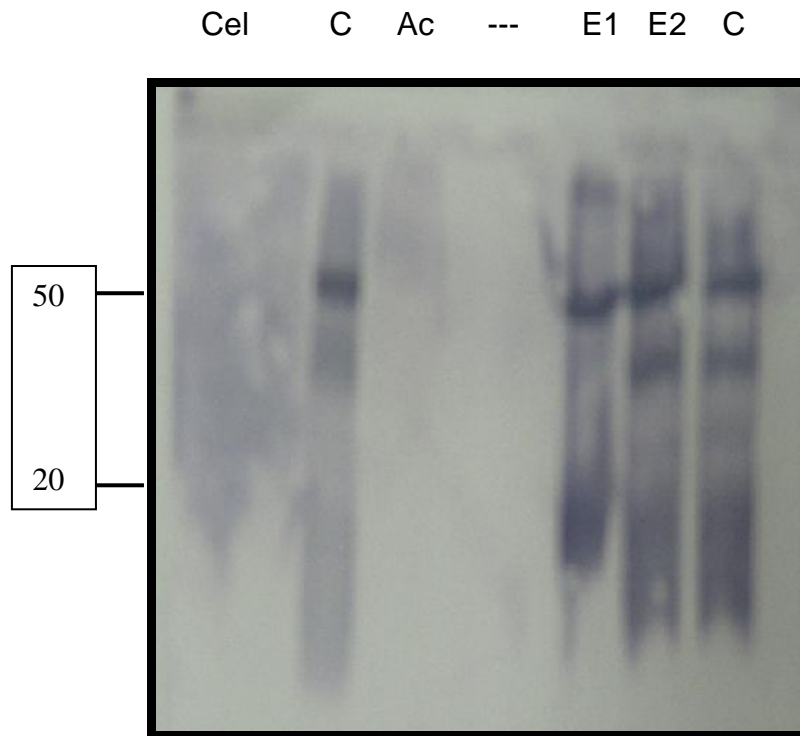


**Figura 13: 96h p.i. (Purificação da proteína N, cromatografia  $Ni^{2+}$ ).** M- marcador; L- lisado; C- controle proteína N (*Escherichia coli*); pH 6,3- 1º eluido com PBS 8M uréia pH 6,3; pH 6,3- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 6,3; pH 5,9- 1º eluido com PBS 8M uréia Ph 5,9; pH 5,9- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 5,9; pH 4,5- 1º eluido com PBS 8M uréia pH 4,5; pH 4,5- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 4,5; extração realizada com 96h p.i.; observa-se presença da banda de 56 kDa, praticamente em todas as aplicações, foram utilizados 20 ul das amostras e 5 ul de marcador.

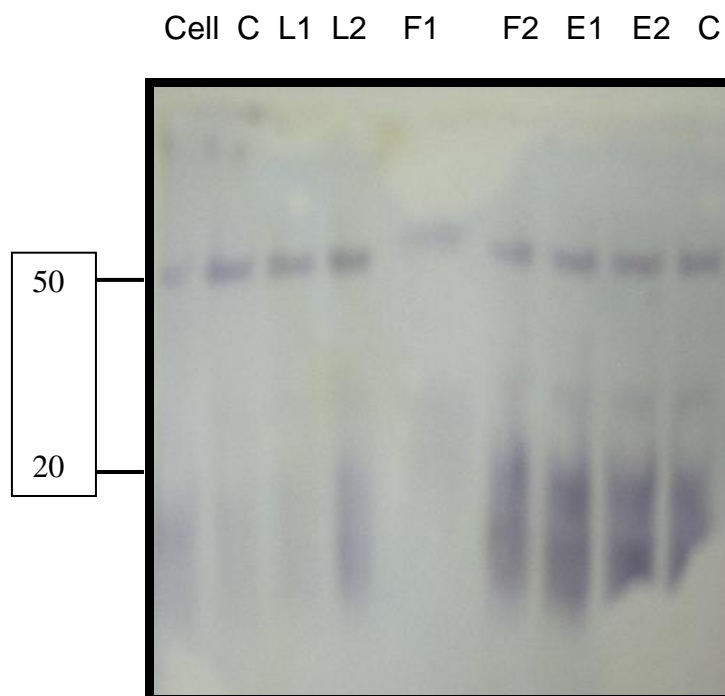


**Figura 14: 72h p.i. (Purificação da proteína N, cromatografia  $Ni^{2+}$ ).** M- marcador; L- lisado; C- controle proteína N (*Escherichia coli*); pH 6,3- 1º eluido com PBS 8M uréia pH 6,3; pH 6,3- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 6,3; pH 5,9- 1º eluido com PBS 8M uréia Ph 5,9; pH 5,9- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 5,9; pH 4,5- 1º eluido com PBS 8M uréia pH 4,5; pH 4,5- 2º eluido com PBS 8M uréia pH 4,5; extração realizada com 72h p.i.; observa-se presença da banda de 56 kDa, como maior intensidade nos 1º e 2º eluido pH 4,5; foram utilizados 20 ul das amostras e 5 ul de marcador.

### 5.3.5 Western Blotting



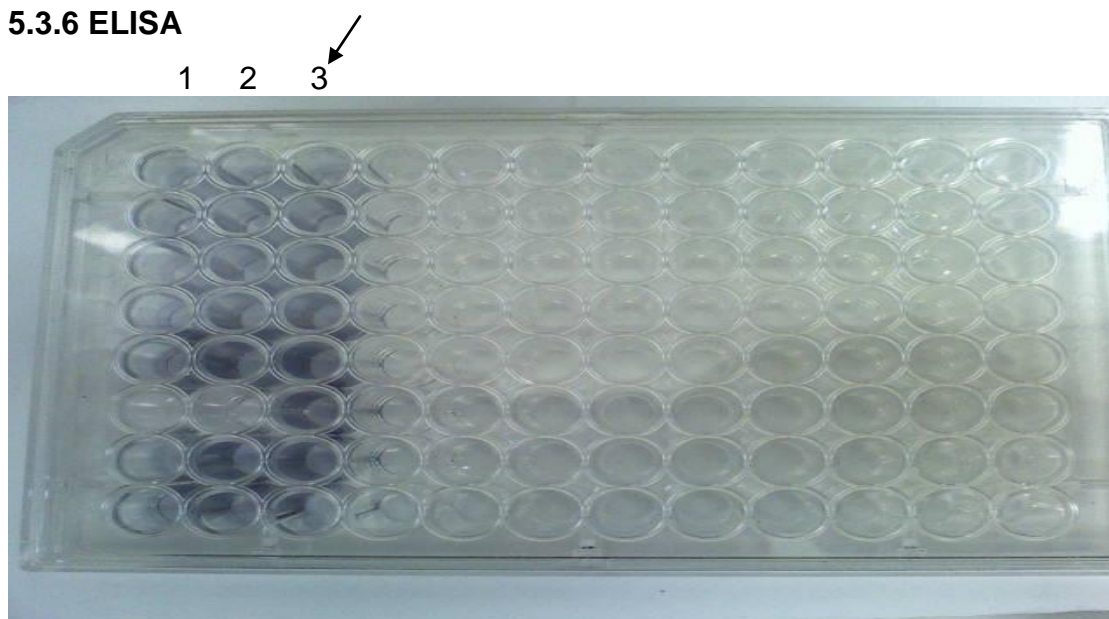
**Figura 15: Western Blot Resultados Pré-Purificação.** Cel- extrato celular; C- controle de proteína N (*Escherichia coli*); Ac- células infectadas com Acmpv; --- canaleta vazia; E1 1º eluido pH 4,5; E2 2º eluido pH 4,5, foram aplicados 20 ul de amostras, utilizado Kit Western Breezer;



**Figura 16: Western Blot Resultados Pós-Purificação.** Cell- extrato de células, C- controle proteína N (*Escherichia coli*); L1- 1º lavado com PBS 8M, pH 6,3; L2- 2º lavado com PBS 8M, pH 6,3; F1- 1º lavado com PBS 8M, pH 5,9; F2- 2º lavado com PBS 8M, pH 5,9; E1- 1º lavado com PBS 8M, pH 4,5; E2- 2º lavado com PBS 8M, pH 4,5; foram aplicadas 20 ul das amostras, este procedimento foi realizado com leite em pó e tween 20.

Devido a grande quantidade de proteínas inespecíficas contidas nas amostras optou-se por realizar um teste de especificidade na pré purificação, utilizando um kit da Western Breezer. Assim, notou-se que a qualidade do teste, mesmo apresentando reação positiva, possui muitas impurezas. A conclusão do teste estaria comprometida. O que ocorreu foi presença das proteínas inespecíficas, isto porque a solução do kit responsável por bloquear tais proteínas não era tão eficaz para este tipo de análise (figura 15). Sendo assim, alterou-se o procedimento adaptando e incrementando com tween e leite em pó, como bloqueadores. Neste teste foi utilizada amostra purificada e foi possível a observação (Figura 16) da melhora de aproximadamente 90% na qualidade do teste, sem proteínas inespecíficas e presença nítida da proteína de interesse. Foi alcançada total visibilidade e grande qualidade no teste, e mais interessante que ocorreu reação em praticamente todas as amostras mesmo que seja o lisado bruto ou nos eluidos sendo mais forte a expressão da banda no eluido de pH 4,5.

### 5.3.6 ELISA



**Figura 17: Teste ELISA com o vírus recombinante sendo utilizado como diagnóstico alternativo da Hantavirose.** Coluna 1 – controle negativo (lisado celular infectado com vSynGal); Coluna 2 – controle positivo (amostra de *Escherichia coli*); Coluna 3 (seta) – reação positiva no teste da amostra de paciente com diagnóstico de hantavirose.

O teste de ELISA empregado teve como finalidade a observação da reação da proteína N obtida a partir de um vírus recombinante e da proteína N obtida a partir de *Escherichia coli* (Figura 17). O controle negativo utilizado foi a base de

lisado celular infectado com vSynGal. Notou-se que em qualquer instante da reação a mesma apresentou coloração cromogênica, o que não podemos dizer das reações nas fileiras 2 e 3, enquanto que na fileira 2, temos uma coloração levemente roxa, nesta foram utilizadas amostras de proteína N, em *Escherichia coli*, e na fileira 3, foram utilizadas proteína N, vírus recombinante.

Quando iniciou-se os testes, podemos observar uma melhor reação da amostra produzida a partir do vírus recombinante, onde apresentou uma coloração mais intensa em um tempo consideravelmente menor, pois eram esperados 20 minutos e a mesma aconteceu aos 2 minutos atingindo seu pico máximo aos 5 minutos, assim analisamos que a qualidade da amostra obtida era muito boa. Quanto a reação com a proteína obtida a partir de *Escherichia coli*, teve seu pico de coloração com 18 minutos, e mesmo assim apresentando um tom inferior a outra amostra.

### **5.3.7 Dosagem da Proteína N**

Após, a investigação e identificação da proteína N, as amostras foram enviadas para o Instituto Adolfo Lutz, onde foram realizadas a comprovação, quantificação e especificidade da proteína, utilizando soro humano contendo anticorpos para hantavirus, em tese, a proteína N obtida de vírus recombinante em células SF9, apresentaram uma melhor qualidade nos testes, sendo com um elevado grau de pureza em 95%, o que aumentaria a especificidade, diminuindo a probabilidade de uma prova cruzada positiva, porém quanto a concentração, foram obtido na amostra algo em torno de 7,5 mg/dl.

Mas levando-se em conta a produção da proteína N, observamos que mesmo em lisado bruto tínhamos uma alta concentração de proteína N, com boa especificidade.

## **6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES**

### **6.1 CONFIRMAÇÃO DA CEPA VIRAL**

Com utilização da técnica de PCR, e conseqüente seqüenciamento, foi observada alteração na estrutura do DNA do baculovirus. Esta alteração representa a presença da proteína N do hantavirus em sua estrutura.

### **6.2 WESTERN BLOT**

A técnica de western blot foi realizada a fim de se confirmar a reatividade da proteína N inserida na estrutura do baculovirus. Este resultado foi superior em relação a purificação e eficiência obtidos em outros testes com soro positivo para hantavirus.

### **6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECOMBINANTE EM DIVERSOS PERÍODOS PÓS INFECÇÃO**

A extração foi realizada em intervalos de 48, 72, 96 e 120 h. No período de 96 h foi observado bom crescimento celular com formação de cristais de poliedrina. Nesse período a extração apresentou pouca formação de outras proteínas.

### **6.4 CULTURA CELULAR MONOCAMADA**

Neste tipo de cultura é observado bom desenvolvimento celular. Entretanto dados da literatura sugerem que o mesmo procedimento realizado com cultura celular em suspensão poderia apresentar aumento na concentração da proteína N.

## **6.5 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA: NUCLEOPROTEÍNA PURIFICADA X LISADO BRUTO**

Quando é usado lisado bruto deve ser considerada a possibilidade de haver reações cruzadas. Isto porque neste tipo de amostra existem várias proteínas capazes de reagir inespecificamente gerando resultados falsos. Esses obstáculos são evitados na utilização da nucleoproteína purificada.

## **6.6 ELISA**

O teste ELISA com o baculovírus recombinante apresenta vantagens sob o teste baseado na utilização da proteína extraída de *Escherichia coli*. Dentre essas vantagens está a melhor reatividade do teste ELISA num menor período de tempo mesmo que a concentração da proteína N obtida a partir do baculovírus recombinante tenha sido menor. A melhor reatividade obtida está relacionada principalmente ao alto teor de purificação da proteína N recombinante.

## **6.7 PRODUÇÃO (CUSTO X BENEFÍCIO)**

Para a produção de testes rápidos ou mesmo para ELISA concluiu-se que poderia ser utilizado até mesmo o lisado bruto celular. Quanto a purificação, a técnica se mostrou simples e barata. Além disso, o material obtido apresentou teor de purificação satisfatório.



## REFERÊNCIAS

Billecocq A., Coudrier D., Boue F., Combes B., Zeller H., Artois M., Bouloy M.; Expression of the nucleoprotein of the Puumala virus from the recombinant Semliki Forest virus replicon: characterization and use as a potential diagnostic tool. **Clin Diagn Lab Immunol.**; v. 10, n.4, p. 658-663, 2003.

Blissard, GW and Rohrmann Baculovirus diversity and molecular biology. **Annu Rev Entomol**, v. 35, p. 127-155, 1990

Hujakka H., Koistinenoistinen V., Eerikainen P., Kuronen I., Mononen I., Parviainen M., Lundkvist A., Vaheri A., Narvanen A., Vapalahti O., New Immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. **J. Clin. Microbiol.**; v. 39, n. 6, p. 2146-2150, 2001.

Laemmili, U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage **T. Nature**, v.277, p.680-685, 1970.

Luckow, VA, Protein production and processing from baculovirus expression vectors. in "Baculovirus Expression systems and vectors". Wiley-Lizz, Inc. p. 51-90, 1995.

Lundkvist A, Horling J, Niklasson B.,The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein specific immunoassays. **Arch Virol.** ; v.130, n1-2, p.121-130, 1993.

Maranga, L. ; Mendonça, R. ; Bengala, A. ; Peixoto, C. C. ; Moraes, R. H. P. ; Pereira, C. A. ; Carrondo, M. J. T., Enhancement of Sf9 cell growth and longevity through supplementation of culture médium with hemolymph.. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 58-63, 2003.

Martins, A. ; Figueiredo, L. T. ; Ribeiro, Bergmann Moraes ; Wolff, J. L. C. Nucleoprotein cloning of Araraquara Hantavirus in baculovirus aiming it's use as an antigen in diagnostic tests.. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, Campos do Jordão. Virus Reviews & Research,. Rio de Janeiro : **Sociedade Brasileira de Virologia**, v. 11. p. 49-50, 2006.

Morelli L. M., Sousa M. L. R., Figueiredo M. T. I. Detection of Brazilian Hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v.99, n.6; p. 633-638, 2004.

O. Ogonah, M. L. Shuler and R. R. Granados, Protein production (beta-galactosidase) from a baculovirus vector in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* cells in suspension culture [Biotechnology Letters Volume 13, Number 4](#), p.265-270, 1991.

O'Reilly D.R., and Miller L.K., Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual W. H. Freeman and Company, New York, 1992

Chang Shao-hua,\* Sun Hong-liang, and Li Zuo-hu, Effect of Temperature Oscillation on Insect Cell Growth and Baculovirus Replication Applied And Environmental Microbiology, v. 64, n. 6, p. 2237–2239, 1998.

Settergren B., Ahlm C., Juto P., Niklasson B. Specific Puumala IgG virus half a century after haemorrhagic fever with renal syndrome.Lancet. v. 6 n. 66, p. 338(8758), 1991.

Schmitt J., Hes H., Stunneberg H. G. Affinity purification of histidine-tagged protein. **Molecular Biology Reports**; v.18: 223-230, 1993.

Sjolander B. K., Elgh F., Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Hagglund M., Palmcrantz V., Juto P., Vaheri A., Nikklasson B., Lundkvist A. Evaluation of serological Methods for diagnosis of Puumala hantavirus infection (NE). **J. Clin. Microbiol.**: p.3264-3268, 1997.

Souza, R.L.M., Moreli, M.L., Borges, A.A., Campos, G.M., Pinto, A.A. e Figueiredo, L.T.M. Hantavirus infections in Wild Rodents captures in São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Virus reviews and research**, v. 09, p. 119, 2004.

Vapalahti O., Lundkvist A., Kallio-Kokko H., Paukku K., Julkunen I., Lankinen H., Vaheri A.. Antigenic properties and diagnostic potential of puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. **J. Clin. Microbiol.**; v.34, n.1, p:119-125, 1996.

Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friensen, P.D., Possee, R.D., and Theilmann, D.A. Baculoviridae. In "Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses". Murphy, F., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Jarvis, A.W., Martelly, G., Mayo, E, e Summers, MD, (eds.) **Archives of Virology Suppl.** v.10, p. 104-113, 1995.

Wang, X., Ooi, B. G.; Miller, L. K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, v.100. 131-137, 1991.

Zoller L., Yang S., Zeyer M. Jul Rapid diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome due to hantavirus. *Lancet*. v.20, n. 183, p.338(8760), Jul, 1991.

CURRENT Trends Licensure of Screening Tests for Antibody to Human T-Lymphotropic Virus Type I. **MMWR**, Atlanta, v.37, n.6, p.736-740, 1988. Disponível em 22/09/2008 <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00051521.htm>>.

## **ANEXO A - Preparação de gel de acrilamida**

- ⇒ preparar tampão *Upper Gel*
- ⇒ preparar tampão *Lower Gel*
- ⇒ PSA 10%
- ⇒ Acrilamida
- ⇒ Tampão de corrida SDS

Procedimento:

1 – preparar solução 01 (gel 12,5%) em tubo falcon 50 ml

1- 2,667 ml de água millq;

2- 2,0 ml de Tampão *Lower gel*;

3- 3,33 ml de acrilamida;

4- 100 ul PSA 10%;

5- 10 ul de temed;

Homogeneizar e transferir para placas devidamente montada;

2 – preparar solução 02 (*stanking gel*) em tubo falcon 50 ml

1- 2,0 ml de água millq;

2- 833 ul upper gel;

3- 417 ul acrilamida;

4- 100 ul PSA 10%;

5- 10 ul de Temed;

Homogeneizar e transferir para placa já montada com solução 01

Montar placa em cuba fazer pré corrida de 1 a 2 hs, 110 volts

## **ANEXO B - EXTRAÇÃO DE PROTEINA**

- ⇒ Fazer higienização da câmara de fluxo de ar laminado;
  - ⇒ Seleccionar garrafas para cultura T25 ou T75;
  - ⇒ Aliquotar 5 ou 13 ml de meio, dependendo da garrafa;
  - ⇒ Transferir para garrafa;
  - ⇒ Aguardar até que o meio esteja disponível para infecção (2 a 3 Dias), crescimento exponencial de mais ou menos 50%;
  - ⇒ Adicionar 0,1 ml ou 0,5 ml de meio líquido contendo vírus;
  - ⇒ Guardar garrafa infectada em estufa 26° C;
  - ⇒ Aguardar, crescimento de acordo com protocolo de extração;
  - ⇒ Retirar garrafa;
  - ⇒ Homogeneizar amostra;
  - ⇒ Transferir todo o material para tubo falcon;
  - ⇒ Centrifugar, a 2.300 rpm por 2 min em T.A.;
  - ⇒ Desprezar sobrenadante;
  - ⇒ Ressuspender pellet, homogeneizamento brando;
  - ⇒ Adicionar 5 ml de tampão PBS pH 7,4 ou água milliq;
  - ⇒ Centrifugar e desprezar sobrenadante;
  - ⇒ Ressuspender pellet;
  - ⇒ Transferir amostras para eppendorf contendo 1 ml de tampão de lise com 5% de beta-mercaptoetanol;
  - ⇒ Homogeneizar, tampar e congelar;
- Obs.: pode lavar com PBS pH 7,4 ou água milliq

**Tampões:****Tampão de lise**

- 2,9 ml de Tris 1 M pH 6,8;
- 0,8 g de SDS;
- 4 ml de glicerol 100%;
- 50 ul de azul de bromofenol;
- 500 ul de B-mercaptoetanol;

**Tampão PBS pH 7,4**

- 0,26 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 2,17 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O;
- 8,17 g de NaCl;
- 800 ml de H<sub>2</sub>O milliq;
- Ajuste pH para 7,4 utilizando HCl ou NaOH

**ANEXO C - PROCEDIMIENTO DE ELISA**



- ⇒ Preparar tampão 1 ( PBS pH 7,4)
- ⇒ Fazer diluição da amostra, (qdo não se tem concentração da mesma);
- ⇒ Transferir 100 ul da amostra para orifício em placa de Elisa;
- ⇒ Deixar kit em overnight a 4° C;
- ⇒ Preparar solução de bloqueio (1% de albumina bovina);
- ⇒ Adicionar a cada orifício, 200 ul de solução de bloqueio;
- ⇒ Deixar 01 hora, a 60 rpm, T.A;
- ⇒ Preparar tampão 3 (100 ul Tween 20 + 20 ml PBS pH 7,4);
- ⇒ Aliquotar 10 ml do tampão 3;
- ⇒ Adicionar 15 ul de ac primário a alíquota do tampão 3;
- ⇒ Pipetar 200 ul do tampão 3 com ac primário;
- ⇒ Transferir para orifício da placa, contendo amostra;
- ⇒ Deixar por 1 hora, 60 rpm, T.A.;
- ⇒ Lavar 3x com 200ul do tampão 3, 60 rpm, 5 min, T.A.;
- ⇒ Adicionar 100 ul do ac secundário;
- ⇒ Deixar 30 min, 60 rpm, T.A.;
- ⇒ Lavar 2x com 200 ul do tampão 3 (PBST), 60 rpm, 5 min, T.A.;
- ⇒ Lavar 2x com 200 ul do tampão 1 (PBS), 60 rpm, 5 min, T.A.;
- ⇒ Adicionar 50 ul de cromógeno em cada orifício;
- ⇒ Aguardar reação;

Obs.: para resultado positivo, irá mudar a coloração no orifício contendo amostra, esta será de acordo com o cromógeno utilizado.

**Tampão 1:**

0.26 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

2.17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;

8.71 g NaCl;

800 ml de H<sub>2</sub>O;

Ajuste pH 7,4 (com HCl ou NaOH), complete volume para 1 litro;

**Tampão 3:**

Tampão 1, contendo 0.05% Tween 20;

Anticorpo primário, fornecido pelo Kit;

Anticorpo secundário, fornecido pelo Kit;

Cromógeno, fornecido pelo Kit

## **ANEXO D - Extração de DNA viral dos BVs**

- ⇒ Centrifugar 1,5 ml de estoque viral (usar 4 frascos), 20.000xg, 30 minutos, 4° C;
- ⇒ Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 100 ul de “virus disruption buffer”;
- ⇒ Adicionar proteinase K para atingir concentração final de 500 mg/ml;
- ⇒ Incubar a 37° C, com agitação leve, até a solução ficar translúcida;
- ⇒ Passar na coluna centricon;

## **ANEXO E - Extração Fenol/Clorofórmio**

- ⇒ Adicionar 400 ul de fenol para cada 1 ml de amostra;
- ⇒ Agitar vortex;
- ⇒ Centrifugar por 5 minutos a 14,5 rpm;
- ⇒ Retirar sobrenadante e transferir para outro eppendorf, deixar uma camada fina de sobrenadante;
- ⇒ Guardar sobrenadante retirado;
- ⇒ Adicionar 100 ul de água milliq ao precipitado;
- ⇒ Agitar vortex;
- ⇒ Centrifugar por 5 minutos a 14,5 rpm;
- ⇒ Retirar o sobrenadante e junta-lo ao sobrenadante anterior;
- ⇒ Desprezar o precipitado;
- ⇒ Adicionar 400 ul de clorofórmio para 1 ml de amostra;
- ⇒ Agitar vortex;
- ⇒ Centrifugar por 5 minutos a 14,5 rpm;
- ⇒ Retirar sobrenadante e transferir para tubo falcon;
- ⇒ Deixar uma película;
- ⇒ Adicionar 100 ul de água ao eppendorf;
- ⇒ Agitar vortex;
- ⇒ Centrifugar por 5 minutos a 14,5 rpm;
- ⇒ Retirar sobrenadante e junta-lo a outra amostra;
- ⇒ Diluir para 10 ml de solução;
- ⇒ Passar no centricon;

**ANEXO F - Protocolo PCR**

- ⇒ Para volume de 15 ul;
- ⇒ Colocar em eppendorf de 1,5 ml;
- ⇒ Diluir DNA 1:50, Primers 1:10;
- ⇒ DNA 1,0 ul;
- ⇒ Primer 1 1,0 ul;
- ⇒ Primer 2 1,0 ul;
- ⇒ Dntp 1,0 ul;
- ⇒ Taq polimerase 0,5 ul;
- ⇒ Tampão 1,5 ul;
- ⇒ Água 9,0 ul;
- ⇒ Fazer um vortex;
- ⇒ Colocar no termociclador com programa de 94° C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94° C por 1 minuto; 60° C por 30 segundos; 72° C por 45 segundos;
- ⇒ Retirar correr gel de agarose;

## **ANEXO G - Purificação de proteína em condições desnaturantes**



- ⇒ Ressuspender pellet com 4 ml de tampão 1;
- ⇒ Homogeneizar “Ni-NTA His-bind” e remover 1,0 ml;
- ⇒ Adicionar a 4 ml do lisado celular;
- ⇒ Misturar por 30 minutos a 200 rpm, T.A.
- ⇒ Centrifugar a 1.660 rpm por 5 minutos;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 1);
  
- ⇒ Lavar com 4 ml de tampão 2;
- ⇒ Centrifugar a 1.660 rpm por 5 minutos;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 2);
- ⇒ Repetir lavagem anterior;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 3);
- ⇒ Lavar com 1 ml de tampão 3;
- ⇒ Centrifugar a 1.660 rpm por 5 minutos;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 4);
- ⇒ Repetir lavagem anterior;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 5);
- ⇒ Lavar com 1 ml de tampão 4;
- ⇒ Centrifugar a 1.660 rpm por 5 minutos;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 6);
- ⇒ Repetir lavagem anterior;
- ⇒ Remover sobrenadante para análise (tubo 7);
- ⇒ Congelar amostras;

**Tampão:**

PBS 1x;

**Tampão 1:** PBS 1x, pH 8,0;

**Tampão 2:** PBS 1x, pH 6,3;

**Tampão 3:** PBS 1x, pH 5,9;

**Tampão 4:** PBS 1x, pH 4,5;

## **ANEXO H - Purificação do DNA (kit Omega)**

- ⇒ Transferir amostra para eppendorf de 1,5 ml e adicionar tampão 6x o volume da amostra;
- ⇒ Aplicar amostra em uma coluna conectada ao tubo coletor e centrifugar a 1.000xg por 1 minuto, T.A., e depois a 10.000xg por minuto, T.A.;
- ⇒ Descartar sobrenadante;
- ⇒ Lavar coluna com 750 ul de wash buffer e centrifugar 10.000xg por 1 minuto;
- ⇒ Descartar sobrenadante;
- ⇒ Repetir lavagem;
- ⇒ Substituir tubo coletor por eppendorf;
- ⇒ Adicionar 35 ul de água direcionando para matriz;
- ⇒ Centrifugar por 1 minuto a 1.000xg e depois a 10.000xg por 1 minuto;
- ⇒ Congelar amostra;

**ANEXO I – WesternBreezer**

- ⇒ Transferir proteínas para membrana de nitrocelulose;
- ⇒ Colocar membrana em recipiente fornecido pelo kit;
- ⇒ Adicionar 10 ml de solução bloqueadora em um recipiente fornecido no kit. Incubar por 30 minutos em um shaker giratório ajustado em 1 volta/segundo. Decantar a solução de bloqueadora.
- ⇒ Enxaguar a membrana com 20 ml de água para 5 minutos, decantar então. Repetir uma vez.
- ⇒ Incubar a membrana com 10 ml de solução de anticorpo primário por 1 hora, Decantar então.
- ⇒ Lavar a membrana por 5 minutos com 20 ml de solução de anticorpo de lavagem preparada, decantar então. Repetir 3 vezes.
- ⇒ Incubar a membrana em 10 ml de solução de anticorpo secundário por 30 minutos, decantar então.
- ⇒ Lavar a membrana por 5 minutos com 20 ml de solução de anticorpo de lavagem preparada, decantar então. Repetir 3 vezes.
- ⇒ Enxaguar a membrana com 20 ml de água por 2 minutos, decantar então. Repetir duas vezes.
- ⇒ Colocar a membrana em uma folha de transparência plástico. Não permitir que a membrana seque.
- ⇒ Incubar a membrana em 5 ml de substrato cromogênico até bandas púrpuras aparecerem (de 1 até 60 min).
- ⇒ Lavar com 20 ml de água. repetir 2 vezes secar ou fixar em lâmpada UV.

**ANEXO J - Westen Blot**

- ⇒ Transferir as proteínas do gel.
- ⇒ Lavar o gel.
- ⇒ Bloquear a membrana LPD 5% (PBS 1 vez, 0,05% tween 20).
- ⇒ Lavar 3 vezes com tween 0,05% 5 min PBS 1 vez.
- ⇒ Incubar membrana AC 1º + (PBS 1 vez + tween 0,05% + 5% LPD).
- ⇒ Lavar 3 vezes com tween 0,05% 5 min .
- ⇒ Adicionar AC 2º .
- ⇒ Lavar 3 vezes com tween 0,05% e 2 vezes com PBS 1 vez.
- ⇒ Adicionar cromógeno.
- ⇒ Interromper com água.

# 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](#)