

O ensaio imunológico de *western blotting* não apresentou nenhum sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras virais. Não houve hibridização nem com o controle positivo da renina (lisado renal). Como com essa técnica não foi obtido o resultado esperado, para reconhecimento da expressão da renina nas células, o método de *dot blot* foi empregado onde uma quantidade mais concentrada da amostra é submetida ao ensaio imunogênico, aumentando a chance de reconhecimento pelo anticorpo. Células Sf21 (Figura 60) e High five (Figura 61) foram utilizadas neste ensaio.

O ensaio imunológico de *dot blot* foi feito com a aplicação de amostras de células controle (intactas sem o vírus recombinante) (amostra 1), células intactas infectadas com o vírus recombinante vRen (amostra 2), células rompidas (por sonicador) infectadas com o vRen (amostra 3), sobrenadante das células infectadas com o vRen (amostra 4), sobrenadante das células controle (amostra 5), lisado tecidual de rim (controle positivo - amostra 6) e albumina (controle negativo - amostra 7), onde era esperado o reconhecimento pelo anticorpo para as amostras de células infectadas com o vRen (intactas e lisadas) e pelo lisado renal. Não era esperado o reconhecimento pelo anticorpo para as amostras de células controle, sobrenadantes e o controle negativo com albumina, já que estas amostras não possuem a inserção do gene da pré-pró-renina em seu DNA, impossibilitando a expressão da renina e seu reconhecimento pelo anticorpo. As células infectadas foram lisadas para facilitar o reconhecimento pelo anticorpo, pois poderia ser que as células intactas dificultassem esse reconhecimento. Os sobrenadantes foram utilizados para confirmar se a proteína está sendo retida nas células. A albumina foi utilizada como controle negativo por ser uma proteína que o anticorpo não deveria reconhecer. O resultado do ensaio imunológico de *dot blot* apresentou sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras de células infectadas com o vírus recombinante, entretanto, houve também sinal de reconhecimento nas células Sf21 não infectadas (*mock infected* – Figura 60, amostra 1). Este fato não era esperado e pode ter ocorrido devido ao anticorpo ser policlonal e estar reconhecendo alguma das proteínas celulares produzidas pelas células Sf21 de forma inespecífica. Esse efeito não ocorreu em células High five sem incubação com o vírus (*mock infected* – Figura 61, amostra 1). As amostras dos sobrenadantes das células não apresentaram reconhecimento pelos anticorpos, indicando que a renina não está sendo liberada no meio.

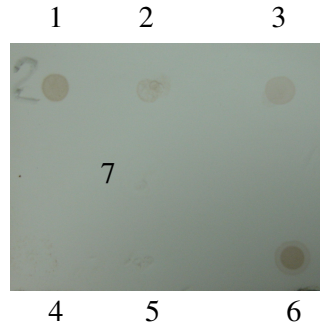


Figura 60 - Membrana de nitrocelulose onde foi feito *dot blot* das amostras recombinantes com vRen em células Sf21. Amostra 1- células; amostra 2- células infectadas com vRen intactas; amostra 3- células infectadas com vRen lisadas; amostra 4- sobrenadante de células infectadas com vRen; amostra 5- sobrenadante de células; amostra 6- lisado de tecido renal (controle positivo); amostra 7- Albumina (controle negativo).

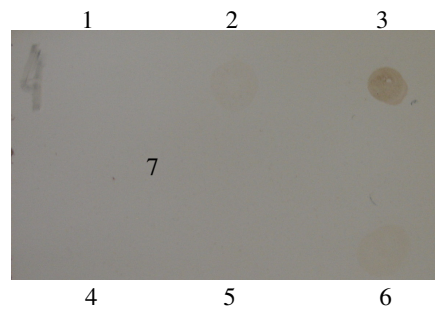


Figura 61 - Membrana de nitrocelulose onde foi feito *dot blot* das amostras recombinantes com vRen em células High five. Amostra 1- células; amostra 2- células infectadas com vRen intactas; amostra 3- células infectadas com vRen lisadas; amostra 4- sobrenadante de células infectadas com vRen; amostra 5- sobrenadante de células; amostra 6- lisado de tecido renal (controle positivo); amostra 7- Albumina (controle negativo).

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

A análise dos peptídeos das células saudáveis e das células infectadas com o vírus recombinante vRenbac, em gel de poliácridamida-SDS, é mostrado na Figura 62. Inúmeras bandas são observadas no precipitado das células saudáveis, infectadas com AcMNPV-L1, AgMNPV-2D, vRola e vRenbac (poços 2, 3, 4, 5 e 6). É possível observar uma banda em torno de 30 kDa que está presente nas células infectadas com o vírus AcMNPV-L1 (poço 3) e AgMNPV-2D (poço 4) e deve corresponder a poliedrina. Essa banda não está presente nas amostras dos vírus recombinantes vRola (poço 5) e vRenbac (poço 6), os quais são oclusos negativos. Há a presença de uma banda mais definida de cerca de 50 kDa nas células

infectadas com o vírus recombinante vRenbac (poço 6) indicando uma possível presença da pró-renina (tamanho esperado de 47 kDa) nas células. O perfil protéico para as células Sf21 e High five foram similares, por isso, apresentamos apenas amostras obtidas em Sf21.

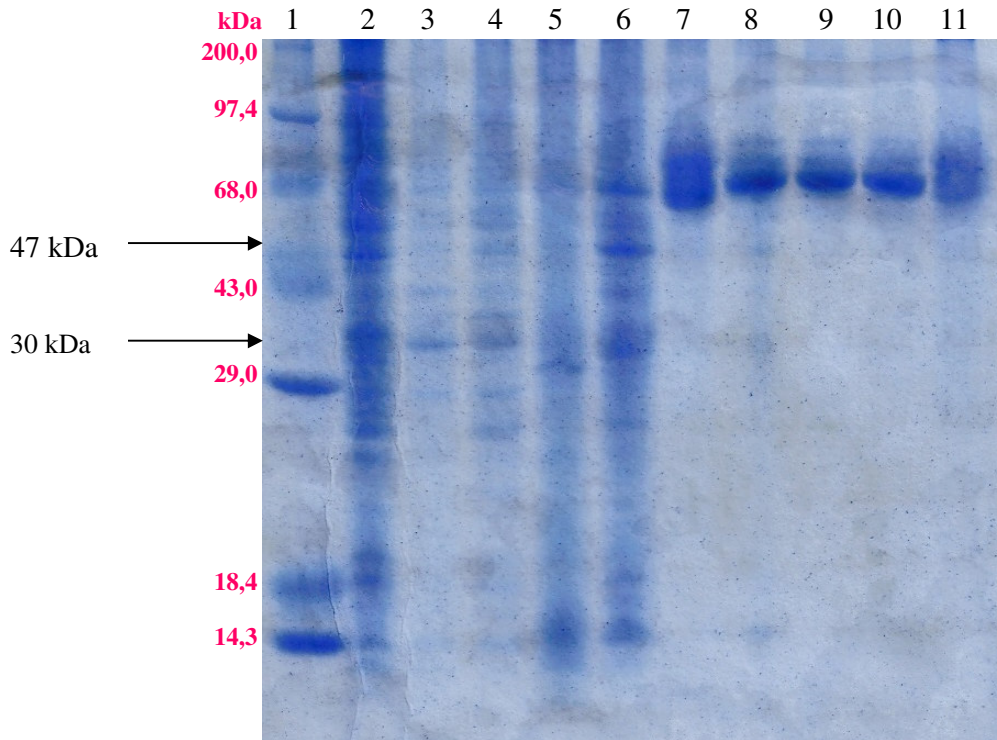


Figura 62 - Análise do perfil de proteínas de células Sf21 sadias e infectadas com vírus 72 hp.i. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%. Poço 1- *Protein High molecular weight (Life Technology)*; Poço 2- Células Sf21 (controle negativo); Poço 3- Células Sf21 infectadas com AcMNPV-L1; Poço 4- Células Sf21 infectadas com AgMNPV-2D; Poço 5- Células Sf21 infectadas com vírus vRola; Poço 6- Células Sf21 infectadas com vírus vRenbac; Poço 7- Sobrenadante de células Sf21; Poço 8- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com AcMNPV-L1; Poço 9- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com AgMNPV-2D; Poço 10- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com vírus vRola; Poço 11- Sobrenadante de células Sf21 infectadas com vírus vRen.

No ensaio de cinética da síntese de proteínas, foi possível ver mudança do perfil das proteínas sintetizadas pelas células para as proteínas sintetizadas pelo vírus vRenbac através de autoradiograma (Figura 63).

O perfil protéico das células controle (*mock infected* - poço 2) e incubadas com o vírus vRenbac a 0 hp.i. (poço 3) foi semelhante. Essas bandas foram melhor visualizadas quando esse mesmo gel radioativo foi exposto a filme de raio-X por um período menor (dado não apresentado). Uma mudança do perfil protéico é observada a 24 hp.i. (poço 4), entretanto, essa mudança é mais evidente no final do ciclo de infecção, as 48 hp.i. (poço 5) e as 72 hp.i.

(poço 6). Nesses períodos duas bandas de maior intensidade, com peso molecular de cerca de 40 kDa e 47 kDa, estavam presentes. Embora o vírus seja ocluso negativo, ele possui o promotor forte da poliedrina para expressão da proteína heteróloga. Pelo fato destas proteínas aparecerem na fase muito tardia da infecção, quando o promotor da poliedrina é ativado e encontra-se dirigindo a expressão do gene heterólogo, elas poderiam ser o precursor da renina (pró-renina), de cerca de 47 kDa e a renina, de cerca de 42 kDa. No entanto, esse dado só pode ser confirmado após ensaio imunológico com anticorpos específicos contra a renina. Esses resultados foram similares aos observados em células High five infectadas com o vírus vRenbac.

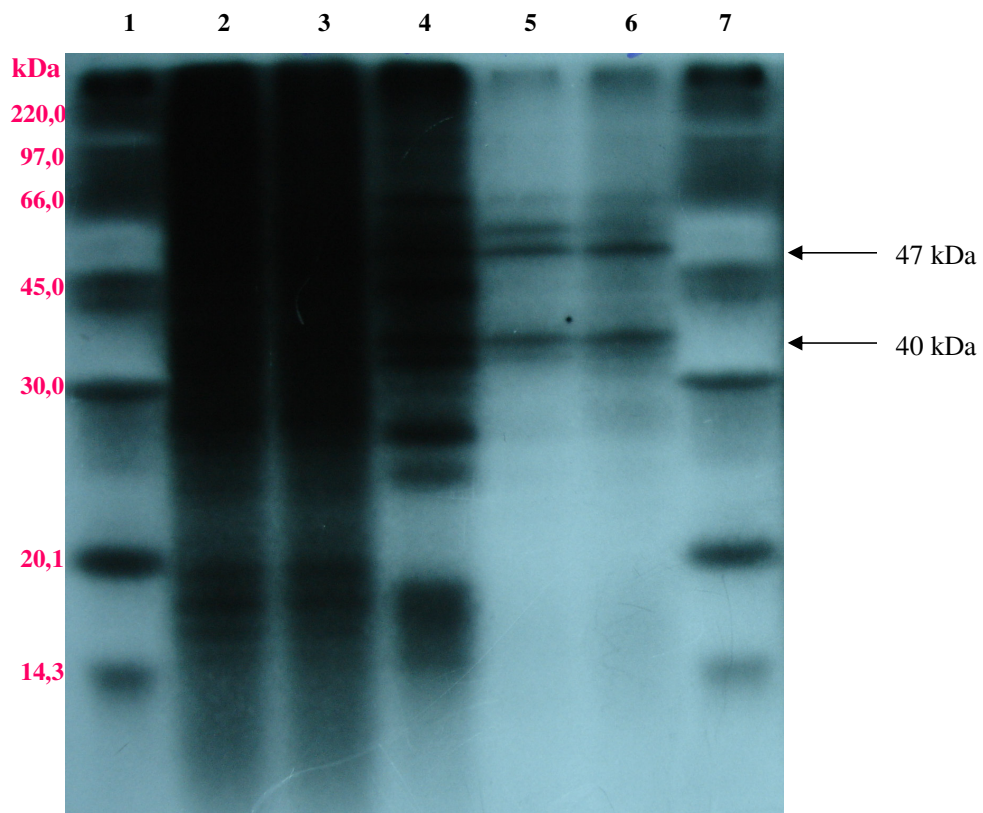


Figura 63 - Cinética da síntese de proteínas em células Sf21 infectadas com vRenbac. Poço 1- *Rainbow*TM [¹⁴C] *methylated protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences); Poço 2- Células Sf21 (controle negativo); Poço 3- Células Sf21 0 hp.i. com vRenbac; Poço 4- Células Sf21 24 hp.i. com vRenbac; Poço 5- Células Sf21 48 hp.i. com vRenbac; Poço 6- Células Sf21 72 hp.i. com vRenbac; Poço 7- *Rainbow*TM [¹⁴C] *methylated protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences).

O resultado do ensaio imunológico do *western blotting* não apresentou nenhum sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras virais. Não houve também a hibridização com o controle positivo da renina extraída do rim (lisado renal).

Como o ensaio de *western blotting* não deu o resultado esperado, foi utilizado, portanto, o método de *dot blot* para reconhecimento da pré-pró-renina, devido a maior concentração das amostras. Células Sf21 (Figura 64) e High five (Figura 65) foram utilizadas neste ensaio.

Da mesma forma que ocorreu com o vírus vRen, o resultado do ensaio imunológico do *dot blot* apresentou sinal de reconhecimento com o anticorpo da renina nas amostras esperadas, entretanto, houve também sinal de reconhecimento nas células Sf21 controle (hibridização inespecífica - Figura 64, amostra 1). Como esperado não houve sinal de hibridização com as células High five (*mock infected*), as amostras de sobrenadantes e com o controle negativo (albumina).

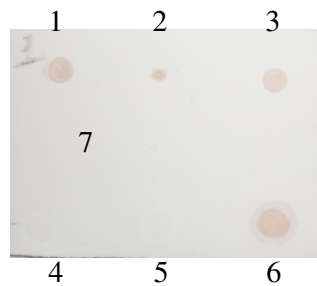


Figura 64 - Membrana de nitrocelulose onde foi realizado o *dot blot* das amostras recombinantes com vRenbac em células Sf21. Amostra 1- células; amostra 2- células infectadas com vRenbac intactas; amostra 3- células infectadas com vRenbac lisadas; amostra 4- sobrenadante de células infectadas com vRenbac; amostra 5- sobrenadante de células; amostra 6- lisado de tecido renal (controle positivo); amostra 7- Albumina (controle negativo).

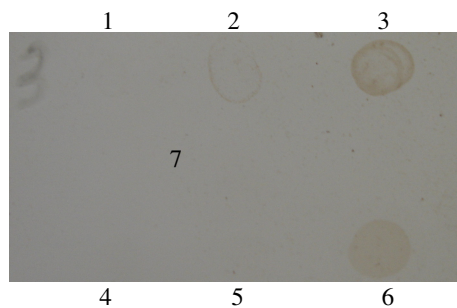


Figura 65 - Membrana de nitrocelulose onde foi realizado o *dot blot* das amostras recombinantes com vRenbac em células High five. Amostra 1- células; amostra 2- células infectadas com vRenbac intactas; amostra 3- células infectadas com vRenbac lisadas; amostra 4- sobrenadante de células infectadas com vRenbac; amostra 5- sobrenadante de células; amostra 6- lisado de tecido renal (controle positivo); amostra 7- Albumina (controle negativo).

10. Alterações morfológicas após infecção *in vivo*

Para a infecção de lagartas com o vírus selvagem AcMNPV-L1 (controle positivo) e com os vírus recombinantes vRen e vRenbac, duas espécies de insetos foram utilizadas (*Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*). Dois métodos de infecção foram empregados: injeção intrahemocélica do vírus na lagarta e infecção via oral (ingestão oral) por dieta inoculada com vírus.

- Ensaio *in vivo* com vírus recombinante vRen:

Foram observadas algumas alterações das lagartas infectadas com vírus vRen em relação às lagartas sem infecção (controle negativo) e às lagartas infectadas com AcMNPV-L1 (controle positivo). Os dados numéricos são apresentados nos gráficos das Figuras 66 e 67. As lagartas *S. frugiperda* infectadas com vRen através de injeção na hemocele, não apresentaram mudanças na coloração do tegumento, mas todas morreram ou apresentaram características de infecção como estado letárgico, com o tegumento mole e presença de poliedros quando analisadas em microscópio ótico de contraste de fase (Olympus CK-2), o mesmo foi observado para as lagartas infectadas por injeção intrahemocélica com o vírus AcMNPV-L1. Já as lagartas *S. frugiperda* infectadas com vírus vRen, por via oral, não apresentaram mudanças na coloração (Figura 68, C) e nem morreram, mas ao serem analisadas no microscópio ótico apresentaram muitos poliedros indicando que foram devidamente infectadas. O mesmo não foi observado nas lagartas infectadas por ingestão oral com o vírus selvagem AcMNPV-L1, onde as lagartas apresentaram características típicas de infecção e morreram (mortalidade de 90%) (Figura 68, B). As lagartas *A. gemmatalis*, infectadas por injeção intrahemocélica com vírus vRen, não mostraram mudanças na coloração do tegumento permanecendo esverdeadas, não cresceram muito e apresentaram uma mortalidade de 62,5% (Figura 67), enquanto que as infectadas com AcMNPV-L1 apresentaram uma mortalidade de 100% por injeção intrahemocélica e de 77% por ingestão oral além de apresentarem uma descoloração do tegumento da lagarta para uma coloração verde clara (Figura 68, E). Já as lagartas *A. gemmatalis* infectadas com vRen por ingestão da dieta contaminada apresentaram alteração na coloração ficando róseas (Figura 68, F) e não morreram, mas ao serem analisadas no microscópio ótico também apresentaram poliedros.

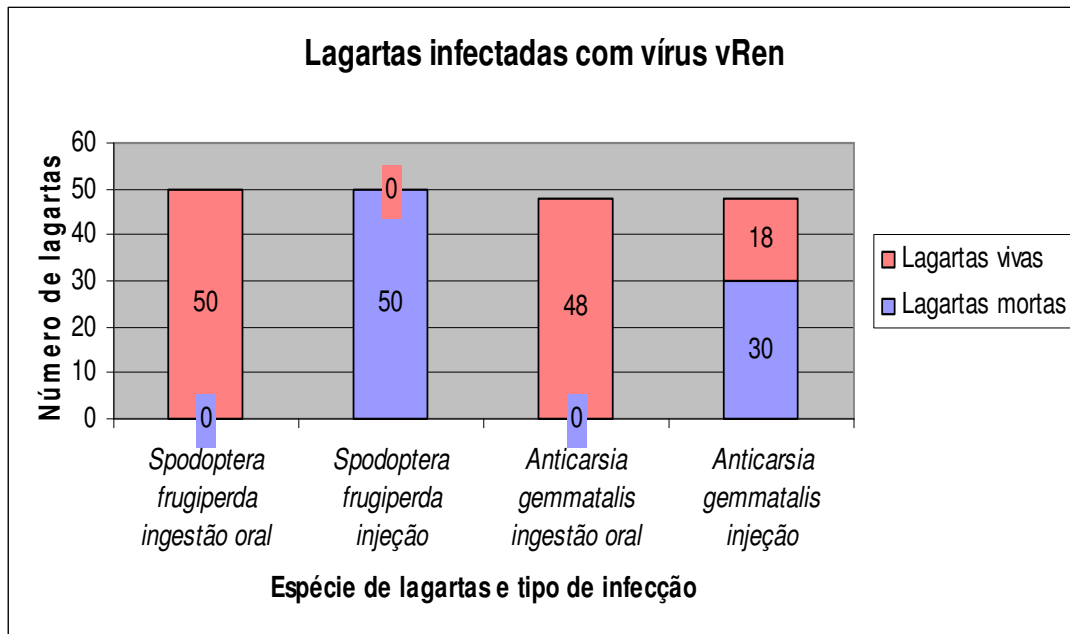


Figura 66 - Proporção de lagartas mortas e vivas quando infectadas com o vírus vRen por diferentes vias.

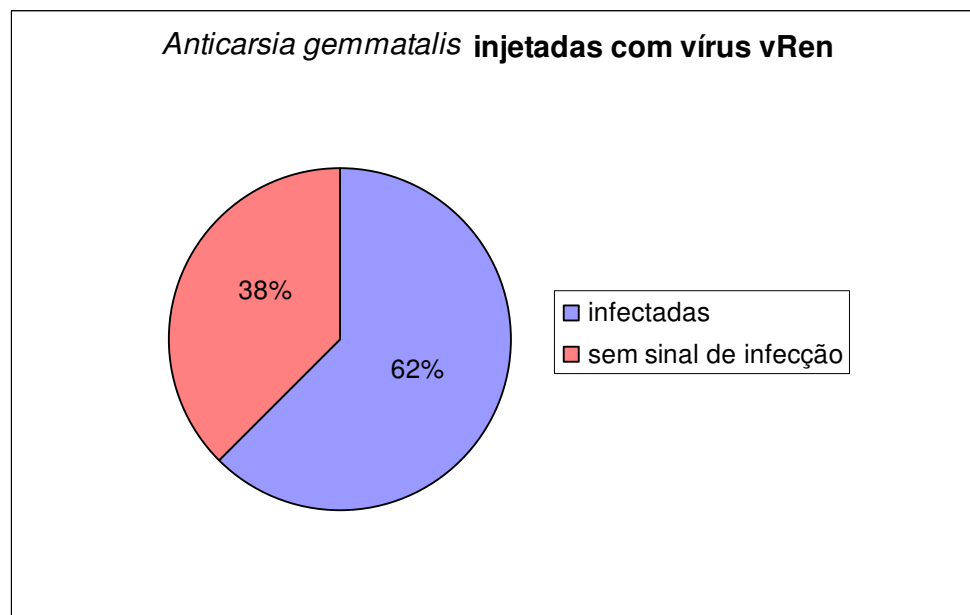


Figura 67 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* injetadas com vírus vRen x sem sinal de infecção.

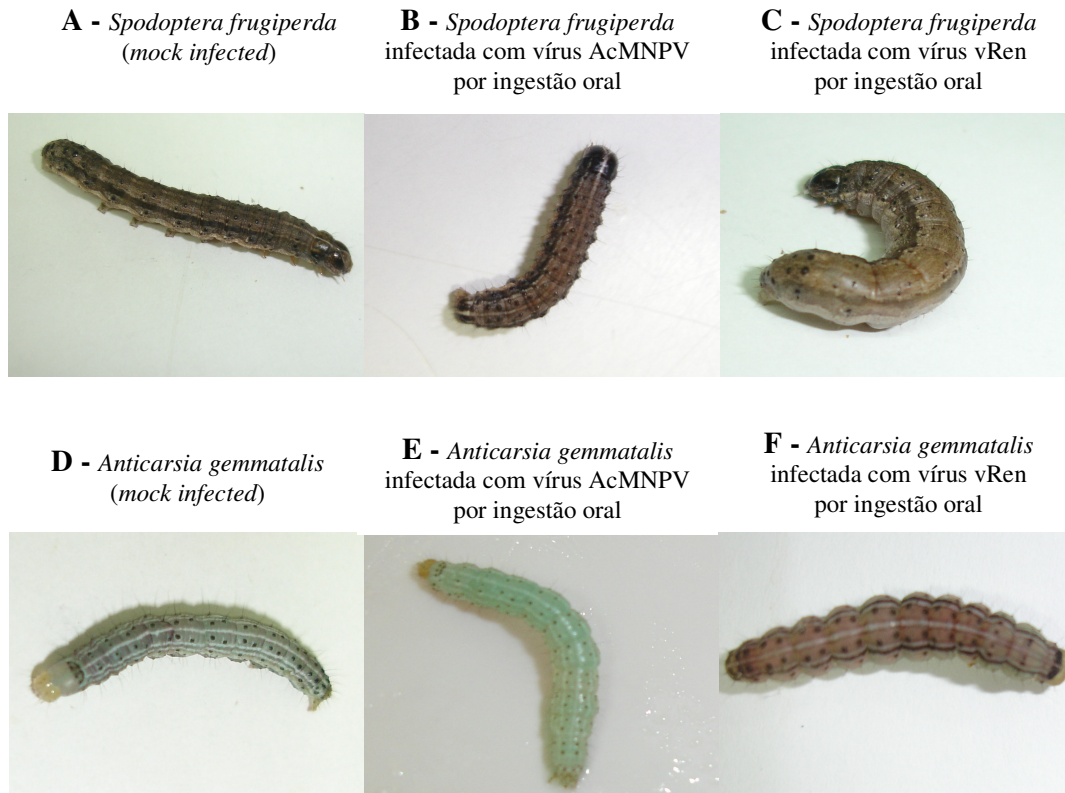


Figura 68 - Lagartas não infectadas e infectadas com vírus AcMNPV ou vRen.

- Ensaios *in vivo* com vírus recombinante vRenbac:

Foram observadas algumas alterações nas lagartas infectadas com vírus vRenbac (Figura 71, A e B) em relação às lagartas controle não infectadas (Figura 68, A e D) e às infectadas com AcMNPV-L1 (Figura 68, B e E). Os dados numéricos são apresentados nos gráficos das Figuras 69 e 70. As lagartas *S. frugiperda* infectadas com vRenbac através de injeção na hemocele, apresentaram mudanças na coloração ficando róseas (Figura 71, A) e todas morreram ou apresentaram características de infecção como estado letárgico e flacidez do tegumento (Figura 69). As lagartas *S. frugiperda* infectadas com AcMNPV-L1, através de injeção na hemocele, não apresentaram mudanças na coloração e todas morreram (mortalidade de 100%) e apresentaram características típicas de infecção. As lagartas *A. gemmatilis* apresentaram mudanças na coloração ficando róseas (Figura 71, B) e apresentaram uma mortalidade de 67,3% (Figura 70). As larvas *A. gemmatilis* infectadas com AcMNPV-L1, através de injeção na hemocele, apresentaram descoloração da cutícula e 100% de mortalidade.

Não foi feita infecção por ingestão oral com o vírus recombinante vRenbac por ele ser ocluso negativo e ao ser usado para infecção oral poderia ser inativado no interior da lagarta, já que os vírions não possuem a proteção da matriz protéica.

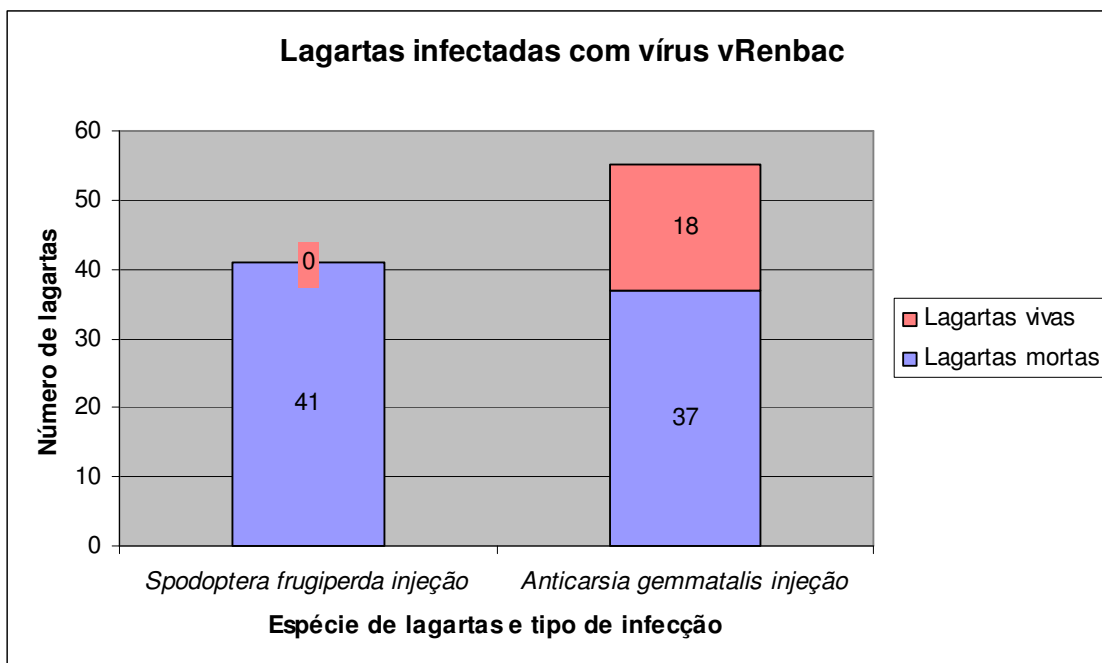


Figura 69 - Proporção de lagartas mortas e vivas quando infectadas com o vírus vRenbac para as duas espécies.

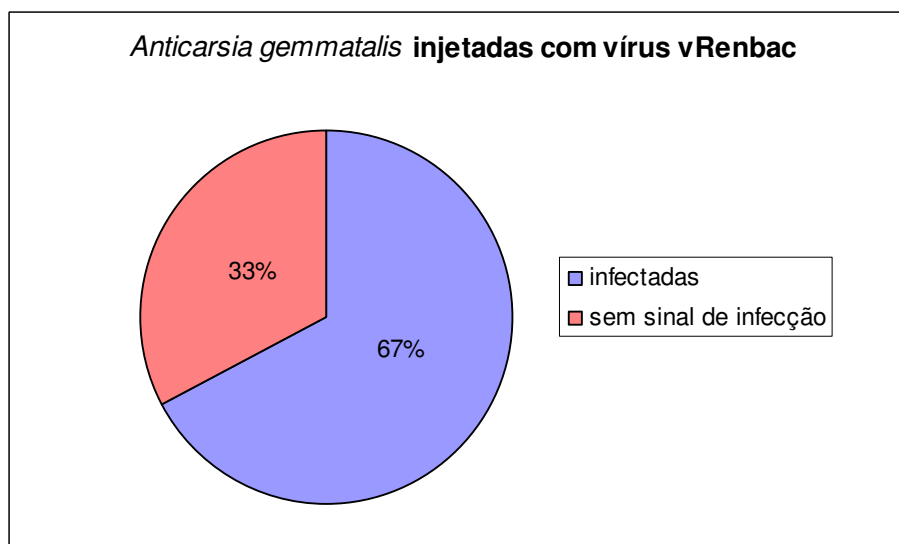


Figura 70 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* injetadas com vRenbac x sem sinal de infecção.

A - *Spodoptera frugiperda*
infectada com vRenbac
por injeção

B - *Anticarsia gemmatalis*
infectada com vRenbac
por injeção



Figura 71 - Lagartas infectadas com vírus vRenbac.

Foram feitos gráficos comparativos do efeito dos dois diferentes vírus recombinantes, vRen e vRenbac, em cada uma das espécies (Figura 72 e 73). Foi observado que as lagartas de *S. frugiperda* quando infectadas, por injeção, com o vRen ou com o vRenbac mostraram 100% de infecção (Figura 72). O número de lagartas inicialmente injetadas com o vírus vRen ou vRenbac foram iguais, a diferença do número total de lagartas apresentada no gráfico da Figura 72 para cada vírus se deve ao fato de algumas terem morrido por manipulação (no caso morreram 9 lagartas de *S. frugiperda* injetadas com o vírus vRenbac devido à manipulação). Foi observado que as lagartas de *A. gemmatalis* quando infectadas, por injeção, com o vRen mostraram uma mortalidade de 62,5% (Figura 67), enquanto que a mesma espécie de lagartas infectadas com o vRenbac mostraram 67,3% (Figura 70), não tendo sido observada uma diferença significativa entre a mortalidade provocada pelos dois vírus. Da mesma forma, o número de lagartas de *A. gemmatalis* inicialmente injetadas com o vírus vRen ou vRenbac também foram iguais, a diferença do número total de lagartas apresentada no gráfico da Figura 73 para cada vírus se deve ao fato de algumas terem morrido por manipulação. Os dados apresentados mostraram que larvas *S. frugiperda* são mais susceptíveis a infecção com vírus recombinantes do que as larvas de *A. gemmatalis*.

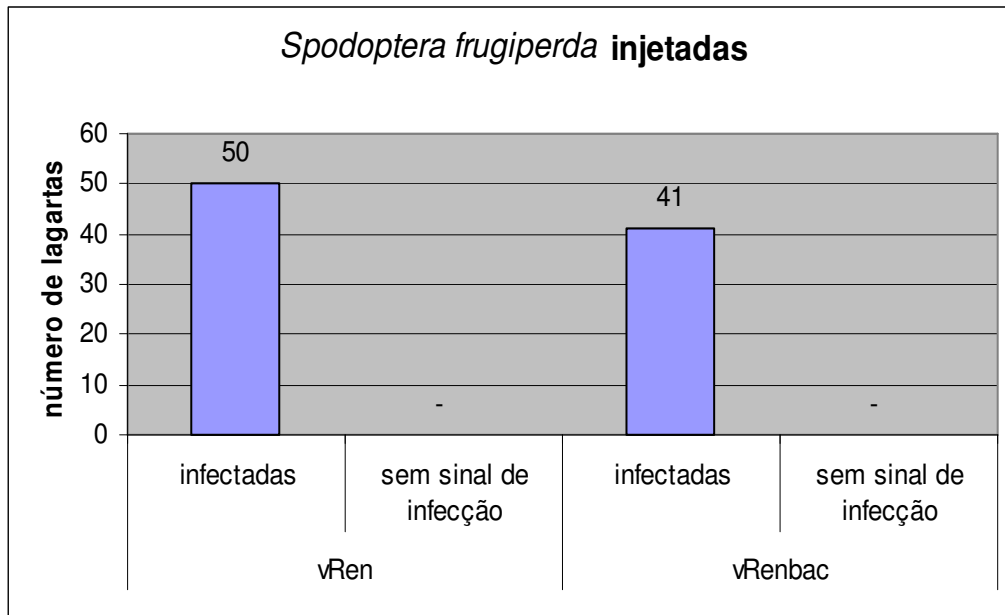


Figura 72 - Gráfico comparativo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* injetadas com vRen ou vRenbac infectadas x sem sinal de infecção.

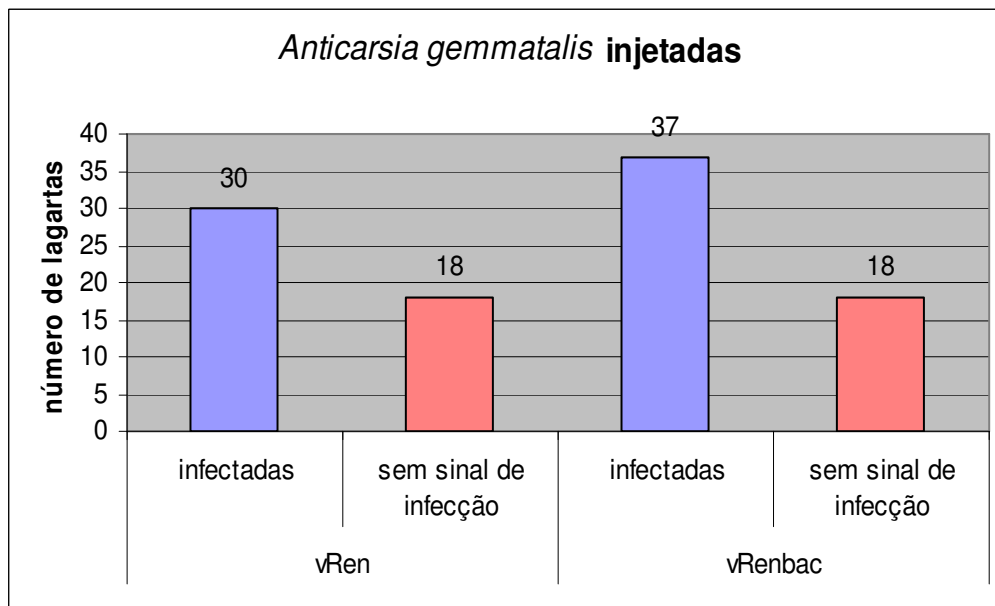


Figura 73 - Gráfico comparativo entre lagartas de *Anticarsia gemmatalis* injetadas com vRen ou vRenbac.

Discussão

Os baculovírus eram utilizados até duas décadas atrás apenas como agentes de controle de pragas agrícolas e florestais por serem vírus seguros ao homem e ao meio ambiente e apenas infectarem artrópodos, principalmente insetos e alguns crustáceos e aracnídeos. Devido a características peculiares como sua natureza bifásica e a existência de promotores fortes para a expressão de genes que não são essenciais para a sua multiplicação em cultura de células, descobriu-se que além de bioinseticidas os baculovírus poderiam ser empregados como vetores de expressão gênica. Inicialmente os estudos foram voltados para a construção de vírus com propriedades pesticidas melhoradas, baseadas no fato destes vírus possuírem promotores fortes como o da poliedrina e o da p10 (Wood & Granados, 1991; Possee *et al.*, 1993; Maeda, 1995; Bonning & Hammock, 1996). Em seguida, estudos foram feitos para expressar proteínas que não necessariamente melhorariam a capacidade pesticida do vírus, mas que proporcionariam um amplo uso na medicina (Miller, 1988; Luckow & Summers, 1988; Maeda, 1989; King & Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992).

Uma grande variedade de proteínas de importância na medicina e na agricultura foi expressa com níveis elevados em células de insetos usando baculovírus como vetores de expressão. Essas proteínas são, em sua maioria, biologicamente ativas e imunologicamente similares às proteínas naturais (O'Reilly *et al.*, 1992). Esse sistema fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas oferecendo condições para que ocorra o dobramento adequado das moléculas, formação de pontes dissulfídicas, oligomerizações e modificações pós-traducionais similares às produzidas em células de mamíferos. Entretanto, é importante reconhecer que há algumas exceções para essa generalização. Linhagens de células de inseto infectadas com vírus recombinante podem perder certas capacidades de processamento protéico como α -amidação e alvo lisossomal. Há também diferenças nas estruturas *N-linked glycans* encontradas na maioria das glicoproteínas recombinantes produzidas (Jarvis, 1997).

A N-glicosilação é responsável por alterações na conformação, estabilidade e funcionalidade de proteínas em eucariotos, sendo um fator determinante na escolha do vetor de expressão. Por permitir a expressão de proteínas eucarióticas similares às produzidas em células de mamíferos, o vetor baculovírus foi escolhido para expressar a renina, uma proteína proteolítica N-glicosilada de mamíferos.

A renina desenvolve uma função chave na regulação da pressão sanguínea e no balanço salino, sendo o rim sua principal fonte em humanos onde ela é inicialmente produzida em grande quantidade em instantes como pré-pró-renina. A síntese de renina é um fator limitante de todo o sistema renina-angiotensina, pois atua sobre o angiotensinogênio, seu substrato específico, promovendo a formação de angiotensina I (AI) a qual é convertida em angiotensina II (AII). Uma vez ativada a cascata, surgem a AI (10 aminoácidos) e a AII (8 aminoácidos), que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, adrenais e o sistema nervoso simpático.

A hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona culmina com a produção exacerbada de AII, que está intimamente relacionada ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares normalmente acompanhadas de modificações na arquitetura do tecido cardíaco e do tecido vascular, aumentando o grau de morbidade e de mortalidade da doença.

A produção da renina em sistema *in vitro* pode permitir o avanço de estudos de inibição uma vez que a especificidade da renina, assim como seu papel dominante na produção de AII faz com que ela seja um alvo promissor para inibição.

Dois diferentes sistemas foram utilizados, nesse trabalho, visando a expressão da renina. O primeiro, com base no vírus vSyn VI gal, permite a formação de baculovírus recombinantes ocluso positivos através de recombinação homóloga. O segundo, denominado Bac-to-Bac (Invitrogen), comercialmente disponível, permite a formação de baculovírus recombinantes ocluso negativos através de recombinação sítio-específica (transposição). Apesar do primeiro sistema ser mais fácil de ser detectado em células de inseto por produzirem poliedros visíveis em microscopia ótica, há relatos de que vírus não ocluídos podem ser mais potentes que os vírus ocluídos, e devem ser produzidos mais eficientemente *in vitro* desde que sua energia metabólica não seja desperdiçada na síntese de grandes quantidades de poliedrina (Palomares *et al.*, 2003). A construção dos dois vírus recombinantes (vRen e vRenbac) foi confirmada utilizando a técnica de PCR, pela amplificação do gene da renina com *primers* específicos.

Alterações ultraestruturais:

Por meio de análise por microscopia eletrônica foi possível visualizar efeitos citopáticos típicos de infecção por baculovírus, em células de inseto High five e Sf21, quando infectadas com o vírus recombinante vRen e com vRenbac.

Na análise das duas linhagens celulares infectadas com o vírus vRen foi observada, entretanto, uma alteração na montagem viral pois os poliedros formados apresentaram poucos

ou nenhum vírion incrustado na matriz protéica, composta principalmente pela poliedrina. Este fato indica que a presença do gene da pré-pró-renina no vírus poderia estar causando algum tipo de alteração na montagem viral, e uma das possibilidades seria que a expressão da renina, por ser uma proteína proteolítica, poderia estar causando a quebra de alguma das proteínas envolvidas no processo de oclusão dos vírions na matriz protéica. Interferência em outros níveis de regulação gênica, como por exemplo durante a transcrição, também não deve ser descartada. Outro fato que deve ser ressaltado é que a renina, hoje, é conhecida por ter como substrato específico o angiotensinogênio, não tendo dados disponíveis em que haja a referência da renina como tendo outro substrato natural ou sendo capaz de clivar outra proteína que não esta. Esse resultado estimula o desenvolvimento de investigações para descoberta de possíveis novos substratos.

Devido à semelhança com dados relatados para outros baculovírus, a região de estrutura fibrilar, mostrada nas micrografias, foi identificada como feixes de proteína P10. Essas estruturas são detectadas tanto no núcleo quanto no citoplasma e estão algumas vezes circundadas por espaçadores eletrodensos associados à formação do poliedro (falsa membrana do poliedro) (Van Oers *et al.*, 1993).

Da mesma forma, os dois cultivos celulares quando infectados com o vírus recombinante vRenbac mostraram alterações típicas de infecção com baculovírus como hipertrofia nuclear, formação do estroma virogênico e montagem das partículas virais (vírions). Por se tratar de um vírus ocluso negativo houve ausência de oclusão viral (poliedros).

Deteção de produto de expressão em células (*in vitro*):

Em geral, a renina apresenta peso molecular de ~42 kDa e a pró-renina de ~47 kDa, mas esses dados podem variar de organismo para organismo dependendo do número de açúcares que se ligam a renina e a perda ou não de seus sítios de glicosilação.

Na análise da cinética da síntese de proteínas em células Sf21 e High five infectadas com o vírus vRen marcadas com ³⁵S-metionina a 0, 24, 48 e 72 hp.i. foi notada a mudança no perfil de proteínas levando a síntese de uma banda de peso em torno de 30 kDa, peso esperado para a poliedrina, e outra de cerca de 40 kDa. Na análise da síntese protéica nessas duas linhagens infectadas com o vírus vRenbac, utilizando os mesmos pulsos de infecção com ³⁵S-metionina, foi notada a alteração do perfil da síntese de proteínas levando à produção de duas proteínas com banda de ~40 e 47 kDa, no final do ciclo de infecção. É possível que as proteínas de 40 e 47 kDa sejam a renina e a pró-renina ou formas da renina, com diferença de

glicosilação. Entretanto isso ainda não pôde ser confirmado por ensaio imunológico, provavelmente devido a inespecificidade do anticorpo policlonal. Além disso, os dados obtidos indicam que pode ter havido baixa expressão da síntese da renina. Desta forma, as vantagens de uma hiper expressão conduzida pelo promotor P_{synXIV}, se contrapõe à condição funcional das células. Diferenças de processamento das células de inseto e de eucariotos superiores podem explicar a não correta modificação pós-traducional esperada para a renina ou a interferência nos níveis de expressão dessa proteína.

A análise por *western blotting* desse gel não apresentou sinais de reconhecimento pelo anticorpo, inclusive do controle positivo, revelando portanto a ocorrência de problemas técnicos. Entretanto, utilizando o método de *dot blot*, no qual há maior concentração das amostras, foi obtida hibridização após a infecção com os vírus recombinantes indicando a expressão da renina nas duas linhagens celulares. De forma inesperada houve também hibridização com as células Sf21 controle. Este fato não ocorreu com as células High five, o que leva a crer que a hibridização em células Sf21 não infectadas seja decorrente de hibridização inespecífica, uma vez que o anticorpo é policlonal.

Em trabalhos anteriores a expressão da pró-renina e renina em baculovírus tem sido relatada. Mathews *et al.* (1996) revelaram a expressão da renina e da pró-renina humana em sistema baculovírus, utilizando duas construções gênicas: na primeira o gene da pré-pró-renina humana foi inserido no DNA do vírus e na segunda o peptídeo sinal do peptídeo secretor de gastrina, o qual sabe-se que é reconhecido e corretamente processado pela maquinaria da célula de inseto, foi fusionado diretamente a seqüência codificante da renina. Houve, entretanto, uma baixa expressão da renina (0,05 mg/L) e da pró-renina (0,5 mg/L). No presente trabalho indica também ter havido baixa expressão da renina devido à intensidade do sinal de hibridização quando foi utilizado ensaio imunológico *dot blot*.

Os estudos de Mathews e colaboradores revelaram também que o pró-peptídeo da renina não é necessário para a correta maturação e enovelamento da enzima ativa de seu precursor, mas é importante para a secreção da renina em sistemas celulares heterólogos (células Sf9 e CHO). Além disso, a renina recombinante demonstrou comportamento bioquímico similar ao da renina humana renal, clivando um substrato sintético gerando angiotensina I com metade da eficiência da renina humana e foi inibida por um mesmo inibidor.

Aeed & Elhammer (1994), utilizando experimentos de caracterização de oligossacarídeos, sugeriram que a pró-renina produzida em células Sf9 contém *high manose* e *high manose* truncada similar àquelas isoladas de outras glicoproteínas produzidas pelo

inseto. No presente trabalho, a utilização das linhagens celulares Sf21 e High five indicou ter havido processamento similar nos dois sistemas uma vez que houve a produção das mesmas bandas, com determinado vírus recombinante, pela análise da cinética da síntese de proteínas (SDS-PAGE). Além disso, permitiu verificar hibridização inespecífica em uma delas (Sf21). Essas linhagens serão importantes em experimentos futuros de imunoprecipitação para medida da expressão e especificidade da renina.

Efeito dos vírus recombinantes no inseto:

Além dos efeitos citopáticos típicos de infecção por baculovírus, foi observada a alteração da coloração do tegumento (cor rósea) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* injetadas com vírus vRenbac e de larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas por ingestão oral com o vírus vRen ou mesmo injetadas com o vírus vRenbac. Isso pode ser decorrente de mudanças metabólicas no inseto causadas pela infecção com o vírus recombinante devido a inserção do gene da pré-pró-renina e a possível expressão da renina. Essa modificação de coloração também foi observada na infecção de lagartas de *Spodoptera frugiperda* com um vírus, vSyn quitinase, que possui a inserção do gene da quitinase (prof. Bergmann Moraes Ribeiro – UnB, comunicação pessoal). A quitina está envolvida na liquidação da cutícula do inseto, portanto, a presença da renina poderia estar interferindo em processos metabólicos associados à degradação do tegumento larval.

A mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* foi similar quando injetadas com vírus vRen (62,5%) e vRenbac (67%). No entanto, as lagartas de *S. frugiperda* apresentaram 100% de mortalidade quando injetadas com os dois vírus recombinantes (construídos com base no vírus AcMNPV). Isso pode ser explicado pela diferença de susceptibilidade do inseto ao vírus AcMNPV. Esse vírus tem um largo espectro de hospedeiros e a *S. frugiperda* tem sido descrita como sendo um de seus hospedeiros naturais. Finalmente, embora tenha havido sinais evidentes de mudanças nas larvas, como formação de poliedros, a infecção por via oral foi menos eficiente pois não levou à mortalidade dos insetos. Esse resultado é compatível com os de microscopia eletrônica, onde os poliedros aparentemente não possuíam vírions em seu interior.

Conclusão e Considerações Finais

A utilização de baculovírus para expressão heteróloga da seqüência da pré-pró-renina nos levou às seguintes observações:

O vetor pSynRen contendo o fragmento da pré-pró-renina, sob o promotor P_{synXIV}, permitiu a recombinação homóloga com o DNA viral (vSyn VIgal) e a obtenção do vírus ocluso positivo vRen.

O vetor HTcRen contendo o fragmento da pré-pró-renina, sob o promotor da poliedrina, permitiu a recombinação sítio-específica com o DNA viral (bacmídeo) presente nas células DH10Bac e a obtenção do vírus ocluso negativo vRenbac. Ele apresentou características típicas de infecção com baculovírus sem a formação de poliedros e a produção de vírions livres no núcleo das células.

As células Sf21 e High five infectadas com o vírus vRen mostraram todas as características típicas de uma célula infectada com um vírus ocluso positivo (AcMNPV-L1 e AgMNPV-2D) exceto pela não imersão de vírions envelopados no interior de seus poliedros. Este fato é um indicativo que a renina estaria sendo expressa, uma vez que alguma proteína diferente das do vírus selvagem estaria levando a alterações na montagem do vírus. Outras etapas da regulação gênica poderiam estar envolvidas nesse processo. Além disso, esse vírus diferencia-se do vírus ocluso negativo (vRenbac) pelo fato de ter sido observado uma banda intensa de 40 kDa na fase tardia da infecção do vírus, enquanto na infecção com o vírus vRenbac duas bandas foram observadas (40 kDa e 47 kDa) após marcação radioativa e análise das proteínas por SDS-PAGE. As duas bandas encontradas devem corresponder a pró-renina (cerca de 47 kDa) e a renina (cerca de 42 kDa) ou a formas glicosiladas das mesmas. O ensaio imunológico por *dot blot* indicou haver a expressão da renina.

Houve alteração no tegumento das larvas infectadas com os vírus recombinantes, tanto de *Spodoptera frugiperda* quanto de *Anticarsia gemmatilis*, que passaram a apresentar coloração rosa. Esta alteração poderia estar relacionada com a expressão da renina, já que lagartas infectadas com o vírus selvagem não adquirem essa coloração em seu tegumento.

Embora os dados apresentados indiquem fortemente que está havendo expressão de uma proteína que estaria interferindo no processo de oclusão do vírus e na fisiologia do inseto, e que essa proteína teria o peso molecular esperado para a pró-renina e renina, para a confirmação de que houve realmente a expressão da renina, ensaios de imunoprecipitação e novos ensaios imunológicos (*western blotting*) deverão ser realizados.

Referências bibliográficas

ADAMS, J.R. & McCLINTOCK, J.T. (1991) **Baculoviridae**: Nuclear polyhedrosis viruses. *In*: Jean R. Adams & Jean R. Bonami (ed.). Atlas of Invertebrate Viruses. Cap. 6, Part 1. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida; p.87-226.

AEED, P.A. & ELHAMMER, A.P. (1994) **Glycosylation of recombinant prorenin in insect cells**: the insect cell line SF9 does not express the mannose 6-phosphate recognition signal. *Biochemistry* 33:8793-8797.

ALMEIDA, P. C.; OLIVEIRA, V.; CHAGAS, J. R.; MELDAL, M.; JULIANO, M. A. & JULIANO, L. (2000) **Hydrolysis by Cathepsin B of Fluorescent Peptides Derived From Human Prorenin**. *Hypertension* 35(6):1278 -1283.

ALVES, S. B. **Microrganismos associados a insetos**. *In*: Controle Microbiano de Insetos. 2 ed., Ed. Alves, S.B., Piracicaba-SP: Fealq, 1998, v. 1, p. 75-94.

ARAÚJO, M.A.; MENEZES, B.S.; LOURENÇO, C.; CORDEIRO, E.R.; GATTI, R.R. & GOULART, L.R. (2005). **O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio**. *Revista da Associação Médica Brasileira* 51(3):164-169.

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

BAXTER, J.; PERLOFF, D.; HSUEH, W. & BIGLIERI, E.G. (1995) **Endocrinology and Metabolism**. (P. Felig, JD Baxter, LA Frohman, eds.), 3th ed., p.749-853. McGraw-Hill, New York.

BAXTER, J.D.; DUNCAN, K.; CHU, W.; JAMES, M.N.; RUSSELL, R.B.; HAIDAR, M.A.; DeNOTO, F.M.; HSUEH, W. & REUDELHUBER, T.L. (1991) **Molecular biology of human renin and its gene**. *Recent Progress in Hormone Research* 47:211-257.

BENNETT, J. C. & PLUM, F. **Cecil. Tratado de medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

BERNE, R. M. & LEVY, M. N. **Fisiologia**. Editora Guanabara 3º Ed. p.253, 2000.

- BLISSARD, G.W. (1996) **Baculovirus-insect cell interactions**. Cytotechnology 20:73-93.
- BLISSARD, G.W. & ROHRMANN, G.F. (1990) **Baculovirus diversity and molecular biology**. Annual Review of Entomology 35:127-155.
- BONNING, B.C. & HAMMOCK, B.D. (1996) **Development of recombinant baculovirus for insect control**. Annual Review of Entomology 41:191-210.
- BRAUNAGEL, S.C.; RUSSELL, W.K.; ROSAS-ACOSTAS, G.; RUSSELL, D.H. & SUMMERS, M.D. (2003) **Determination of protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus**. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100:9797-9802.
- CHARLTON, C.A. & VOLKMAN, L.E. (1993) **Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces action cable formation**. Virology 197:245-254.
- CHISHOLM, G.E. & HENNER, D.J. (1988) **Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene**. Journal of Virology 62(9):3193-3200.
- CHU, W. N.; BAXTER, J. D. & REUDELHUBER, T. L. (1991) **A Targeting Sequence for Dense Secretory Granules Resides in the Active Renin Protein Moiety of Human Preprorenin**. Molecular Endocrinology. Vol. 4 n° 12. Recent Progress in Hormone Research 47:211-257.
- CLEM, R.J. (1997) **Regulation of programmed cell death by baculoviruses**. In: Miller, L.K. (ed.). The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p.237-266.
- CRAWFORD, A.M. & MILLER, L.K. (1988) **Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus**. Journal of Virology 62(8):2773-2781.
- CRITCHLEY, J.A.; ZHAO, H.L.; TOMLINSON, B.; LEUNG, W.; THOMAS, G.N.; CHAN, J.C.N. & COCKRAM, C.S. (2002) **Management of nephropathy in patients with type 2 diabetes**. Chinese Medical Journal (Engl) 115(1):129-135.
- CROOK, N.E.; CLEM, R.J. & MILLER, L.K. (1993) **An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif**. Journal of Virology 67(4):2168-2174.

D'AMICO, V. **Baculoviruses** (Baculoviridae). *In*: Weeden, C.R.; Shelton, A.M. & Hoffmann, M.P. (eds.), *Biological Control: A guide for natural enemies in north america*. Cornell University. Disponível em: <<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/baculoviruses.html>>

DUCKETT, C.S.; NAVA, V.E.; GEDRICH, R.W.; CLEM, R.J.; VAN DONGEN, J.L.; GILFILLAN, M.C.; SHIELDS, H.; HARDWICK, J.M. & THOMPSON, C.B. (1996) **A conserved family of cellular genes related to the baculovirus *iap* gene and encoding apoptosis inhibitors**. *The EMBO Journal* 15(11):2685-2694.

EGAN, D.A.; GRZEGORCZYK, V.; TRICARICO, K.A.; RUETER, A.; HOLLEMAN, W.H. & MARCOTTE, P.A. (1988) **Human placental chorionic renin**: production, purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 965:68-75.

ENGELHARD, E.K.; KAMMORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O. & VOLKMAN, L.E. (1994) **The insect tracheal system**: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:3224-3227.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (2005) **Virus Taxonomy**: classification and nomenclature of viruses. VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego: California.

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

FERRARIO, C.M. (2006) **Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease** – Therapeutic Implications of More Than a Century of Research. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (JRAAS)* 7(1):3-14.

FERRARIO, C.M.; SMITH, R.; LEVY, P. & STRAWN, W. (2002) **The hypertension-lipid connection**: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. *The American Journal of the Medical Sciences* 323:17-24.

FUNK, C.J.; BRAUNAGEL, S.C. & ROHRMANN, G.F. **Baculovirus Structure**. *In*: Miller, L.K. (ed.). *The baculoviruses*. New York: Plenum press, 1997. p.7-32.

GRANADOS, R.R.; GUOXUN, L.; DERKSSEN, A.C.G. & McKENNA, K.A. (1994) **A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus**. *Journal of Invertebrate Pathology* 64:260-266.

GRANADOS, R.R. & LAWLER, K.A. (1981) **In vivo pathway of *Autographa californica* invasion and infection.** Virology 108:297-308.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C. & DICKERSON, W.A. (1976) **Velvetbean caterpillar. A rearing procedure and artificial medium.** Journal of Economic Entomology 69:447-448.

GRÖNER, A. **Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses.** In: LACEY, L.; DAVISON, E.W. (Eds.). Safety of microbial insecticides. Boca Raton: CRC,1989. p.135-147.

HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MEIRELLES, M.N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M.J.; BARTH, O.M.; MACHADO, R.D.; SOUTO-PADRÓN, T. & SOUZA, W. (Ed). **Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 179p.

HARLOW, E. & LANE, D. (1988). **Antibodies: A Laboratory Manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 726 p.

HAWTIN, R.E.; ARNOLD, K.; AYRES, M.D.; ZANOTTO, P.M.A.; HOWARD, S.C.; GOODAY, G.W.; CHAPPELL, L.H.; KITTS, P.A.; KING, L.A. & POSSEE, R.D. (1995) **Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome.** Virology 212:673-685.

HINK, W.F. (1970) **Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.** Nature 226:466-467.

HOLMES, D.S. & QUIGLEY, M. (1981) **A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.** Analytical Biochemistry 114(1):193-197.

HOFFMANN, C.B.; OLIVEIRA, E.B. & MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*).** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985. 23 p. (Documentos, 10).

HORTON, M.H. & BURAND, J.P. (1993) **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion.** Journal of Virology 67(4):1860-1868.

HSUEH, W.A. (2002) **Treatment of type 2 diabetic nephropathy by blockade of the renin-angiotensin system: a comparison of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists.** Current Opinion in Pharmacology 2:182-188.

- HSUEH, W.A. & BAXTER, J.D. (1991) **Human prorenin**. *Hypertension* 17(4):469-479.
- JARVIS, D.L. (1997) **Baculovirus expression vectors**. *In*: Miller, L.K. (ed.). *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York, p.389-431.
- JARVIS, D.L.; OKER-BLOM, C. & SUMMERS, M.D. (1990) **Role of glycosylation in the transport of recombinant glycoproteins through the secretory pathway of lepidopteran insect cells**. *Journal of Cellular Biochemistry* 42(4):181-191.
- JARVIS, D.L.; FLEMING, J.A.; KOVACS, G.R.; SUMMERS, M.D. & GUARINO, L.A. (1990) **Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells**. *Nature Biotechnology* 8:950-955.
- JEHLE, L.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M. & VLAK, J.M. (2006) **On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision**. *Archives of Virology* 151:1257-1266.
- KALMAKOFF & WARD. (2003) **Baculovirus-Host Interactions**, University of Otago, Dunedin, New Zealand, Viewed 2 May 2005, (Programmed cell death). Disponível em: <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculohostinteract.html>>
- KABA, S.A.; MUSOKE, A.J.; SCHAAP, D.; VLAK, J.M. (2004) **Development of novel and effective subunit vaccines against East Coast Fever based on insect cell-derived T. parva sporozoite surface protein P67**. *In*: Book of Abstracts, SIP 2004, Helsinki, 1-6 August 2004. p.87-88.
- KING, L.A. & POSSEE R.D. (1992) **The baculovirus expression system, a laboratory guide**. Chapman & Hall.
- KNUDSON, D.L. & HARRAP, K.A. (1976) **Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: microscopy study of the sequence of events of the virus infection**. *Journal of Virology* 17(1):254-268.
- KOST, T.A.; CONDREAY, J.P. & JARVIS, D.L. (2005) **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells**. *Nature Biotechnology* 23(5):567-575.

KOST, T.A. (2000) **Application of recombinant baculovirus in biopharmaceutical research.** In: Cell Engineering (Vol. 2) (Al-Rubeai, M., ed.) p.1 - 28, Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.

LAEMMLI, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227(5259):680-685.

LEE, H.H. & MILLER, L.K. (1978) **Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Virology 27(3):754-767.

LONG, G.; PAN, X.; KORMELINK, R. & VLAK, J.M. (2006) **Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis.** Journal of Virology 80(17):8830-8833.

LUCKOW, V.A. & SUMMERS, M.D. (1988) **Trends in the development of baculovirus expression vectors.** Biotechnology 6:47-55.

MAEDA, S. (1995) **Further development of recombinant baculovirus insecticides.** Current Opinion in Biotechnology 6:313-319.

MAEDA, S. (1989) **Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors.** Annual Review of Entomology 34:351-372.

MANDEL, M. & HIGA, A. (1970) **Calcium dependent bacteriophage DNA infection.** Journal of Molecular Biology 53:154-158.

MARUNIAK, J.E. (1986). **Baculovirus structural proteins and proteins synthesis,** p.129-146. In: R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), The biology of baculoviruses, vol I, Boca Raton, CRC. Press, 275 p.

MARZ, L.; ALTMANN, F.; STAUDACHER, E. & KUBELKA, V. (1995) **Protein Glycosylation in Insects.** In: J. Motreuil, J. F. G. Vliegthart and H. Schachter (eds.). Glycoproteins. Vol. 29a, p.543-563, Elsevier, Amsterdam.

MATHEWS, M.B.; SONENBERG, N. & HERSHEY, J.W.B. **Origins and targets of translational control.** In: Hershey, J.W.B.; Mathews, M.B.; Sonenberg, N. (eds.) Translational Control. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1996. p.1-30.

MATHEWS, S.; DOBELI, H.; PRUSCHY, M.; BOSSER, R.; D'ARCY, A.; OEFNER, C.; ZULAUF, M.; GENTZ, R.; BREU, V.; MATILE, H.; SCHLAEGER, J. & FISCHLI, W. (1996) **Recombinant human renin produced in different expression systems: biochemical properties and 3D structure.** *Protein Expression and Purification* 7:81-91.

MATSUURA, Y.; POSSEE, R.D.; OVERTON, H.A. & BISHOP, D.H.L. (1987) **Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins.** *Journal of General Virology* 68:1233-1250.

MILLER, L.K. (1997) **Introduction to the baculoviruses.** *In: Miller, L.K. (ed.). The Baculoviruses.* Plenum Press, New York, p.1-6.

MILLER, L.K. (1988) **Baculovirus as gene expression vectors.** *Annual Review of Microbiology* 42:177-199.

MILLER, D.W.; SAFER, P. & MILLER, L.K. **An insect baculovirus host-vector for high-level expression of foreign genes.** *In: SETLOW, J.K.; HOLLAENDER, A. (eds.). Genetic engineering.* New York: Plenum, 1986. p.277-298.

MONSMA, S.A.; OOMENS, A.G.P. & BLISSARD, G.W. (1996) **The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection.** *Journal of Virology* 70(7):4607-4616.

MONTOR, W.R. & SOGAYAR, M.C. (2003) **Insetos como biofábricas de proteínas humanas.** *Ciência hoje, Biotecnologia* 33(196):16-23.

MORRIS, T.D. & MILLER, L.K. (1992) **Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines.** *Journal of Virology* 66(12):7397-7405.

MOSCARDI, F. & SOUZA, M.L. (2002) **Baculovirus para o Controle de Pragas. Panacéia ou realidade?** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 24:22-29

MOSCARDI, F. (1999) **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.

NEVES, F.A.; DUNCAN, K.G. & BAXTER, J.D. (1996) **Cathepsin B is a prorenin processing enzyme.** *Hypertension* 27:514-517.

NISSEN, M.S. & FRIESEN, P.D. (1989) **Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene.** Journal of Virology 63(2):493-503.

OIL, B.G.; RANKIN, C. & MILLER, L.K. (1989) **Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene.** Journal of Molecular Biology 210:721-736.

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

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. & LUCKOW, V.A. (1992) **Baculovirus expression vectors** - a laboratory manual. New York: W.H. Freeman and Company.

O'REILLY, D.R.; PASSARELLI, A.L.; GOLDMAN, I.F. & MILLER, L.K. (1990) **Characterization of the DA26 gene in a hypervariable region of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome.** Journal of General Virology 71:1029-1037.

O'REILLY, D.R. & MILLER, L.K. (1989) **A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase.** Science 245(4922):1110-1112.

PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S. & RAMÍREZ, O.T. **Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system.** In: Ozturk, S., Hu, W.S. (eds.). Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Therapies. Marcel Dekker: New York, 2003.

PALOMARES, L.A. & RAMÍREZ, O.T. (2002) **Complex N-glycosylation of Recombinant Proteins by Insect Cells.** Bioprocessing 1:70-73.

PAYNE, C.C. (1986) **Insect pathogenic viruses as pest control agents.** Fortschritte der Zoologie 32:183-200.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C. & MILLER, L.K. (1984) **Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector.** Molecular and Cellular Biology 4(3):399-406.

PORTO, Celmo Celeno (1997). **Semiologia médica.** Terceira Edição. Guanabara Koogan.

POSSEE, R.D.; BARNETT, A.L.; HAWTIN, R.E. & KING, L.A. (1997) **Engineered baculoviruses for pest-control.** Pesticide Science 51:462-470.

POSSEE, R.D.; CAYLEY, P.J.; CORY, J.S. & BISHOP, D.H.L. (1993) **Genetically engineered viral insecticides: new insecticides with improved phenotypes.** Pesticide Science 39:109-115.

RANKIN, C.; OIL, B.G. & MILLER, L.K. (1988) **Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression.** Gene 70:39-49.

REMUZZI, G.; RUGGENENTI, P. & PERICO, N. (2002) **Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition.** Annals of Internal Medicine 136:604-615.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L. & KITAJIMA, E.W. (1998) **Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus.** Organizado por: Sérgio Batista Alves. In: Controle Microbiano de Insetos. Ed. Sérgio Batista Alves. 2 ed.; Piracicaba, SP, Brasil, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, p.481-507.

RICHARDSON, C.D. (Ed.). **Baculovirus expression protocols.** Totowa: Humana, 1995. 418p. (Methods in Molecular Biology, 39).

ROHRMANN, G.F. (1986) **Evolution of occluded baculoviruses.** In: Granados, R.R & Frederici, B.A. (eds.). The biology of baculoviruses. Vol I, Chap. 10, 203-216.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning - A laboratory Manual.** 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHIFFRIN, E.L. (2002) **Vascular changes in hypertension in response to drug treatment: Effects of angiotensin receptor blockers.** The Canadian Journal of Cardiology 18 (A):15A-18A.

SEALEY, J.E. & LARAGH, J.H. (1990) **The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis.** In: J.H. Laragh and B.M. Brenner (eds.). Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management., p.1287-1318. New York: Raven Press.

SIELECKI, A.R.; HAYAKAWA, K.; FUJINAGA, M.; MURPHY, M.E.; FRASER, M.; MUIR, A.K.; CARILLI, C.T.; LEWICKI, J.A.; BAXTER, J.D. & JAMES, M.N. (1989) **Structure of Recombinant Human Renin, a Target for Cardiovascular-Active Drugs, at 2.5 Å Resolution.** Science 243(4896):1346-1351.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D. & FRASER, M.J. (1983) **Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector.** *Molecular and Cellular Biology* 3(12):2156-2165.

STOLTZ, D.; PAVAN, C. & Da CUNHA, A. (1973) **Nuclear polyhedrosis virus: a possible example of de novo intracellular membrane morphogenesis.** *Journal of General Virology* 19:145-150.

SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. (1987) **A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures.** Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N^o. 1555.

SUZUKI, F.; HAYAKAWA, M.; NAKAGAWA, T.; NASIR, U.M.; EBIHARA, A.; IWASAWA, A.; ISHIDA, Y.; NAKAMURA, Y. & MURAKAMI, K. (2003) **Human prorenin has “gate and handle” regions for its non-proteolytic activation.** *The Journal of Biological Chemistry* 278(25):22217-22222.

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I. & SOUZA, M.L. (2006) **Baculoviruses - Re-Emerging Biopesticides.** *Biotechnology Advances* 24:143-160.

TANADA, Y. & KAYA, H.K. (1993) **Insect pathology.** New York, Academic Press, 666 p.

TANI, H.; LIMN, C.K.; YAP, C.C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K. & MATSUURA, Y. (2003) ***In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses.** *Journal of Virology* 77(18):9799-9808.

THEILMANN, D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S. & VLAK, J.M. (2005) **Family Baculoviridae.** In: *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: pp. 177-185. Edited by Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. and Ball, L.A. New York: Springer.

THOMSEN, D.R.; POST, L.E. & ELHAMMER, A.P. (1990) **Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9.** *Journal of Cellular Biochemistry* 43:67-79.

VAN DEN EIJNDEN, M.M.; SARIS, J.J.; DE BRUIN, R.J.; DE WIT, E.; SLUITER, W.; REUDELHUBER, T.L.; SCHALEKAMP, M.A.D.H.; DERKX, F.H.M. & DANSER, A.H. (2001) **Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of**

mannose 6-phosphate receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 21:911-916.

VAN DER WILK, F.; VAN LENT, J.W.M. & VLAK, J.M. (1987) **Immunogold detection of polyhedrin p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells.** *Journal of General Virology* 68:2615-2624.

VAN OERS, M.M.; FLIPSEN, J.T.M.; REUSKEN, C.B.E.; SLIWINSKY, E.L.; GOLDBACH, R.W. & VLAK, J.M. (1993) **Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** *Journal of General Virology* 74:563-574.

VAUGHN, J.L.; GOODWIN, R.H.; TOMPKINS, G.J. & McCAWLEY, P. (1977) **The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *In Vitro* 13:213-217.

VLAK, J.M.; SCHOUTEN, A.; USMANY, M.; BELSHAM, G.J.; KLINGE-ROODE, E.C.; MAULE, A.J.; VAN LENT, J.W.M. & ZUIDEMA, D. (1990) **Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method.** *Virology* 179:312-320.

VLAK, J.M.; KLINKENBERG, F.A.; ZAAL, K.J.M.; USMANY, M.; KLINGE-ROODE, E.C.; GEERVLIT, J.B.F.; ROOSIEN, J. & VAN LENT, J.W.M. (1988) **Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene.** *Journal of General Virology* 69:765-776.

VOLKMAN, L.E. & KEDDIE, B.A. (1990) **Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis.** *Seminars in Virology* 1:249-259.

VOLKMAN, L.E. & GOLDSMITH, P.A. (1985) **Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis.** *Virology* 143:185-195.

VOLKMAN, L.E. & SUMMERS, M.D. (1975) ***Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms.** *Journal of Invertebrate Pathology* 30:102-103.

WANG, N.P.; OOI, B.G. & MILLER, L.K. (1991) **Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production.** *Gene* 100:131-137.

WHITFORD, M.; STEAWRT, S.; KUZIO, J. & FAULKNER, P. (1989) **Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Virology 63(3):1393-1399.

WILLIAMS, G.V. & FAULKNER, P. (1997) **Cytopathological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection.** *In: The Baculoviruses*, Ed. Miller, L.K. Plenum Press, New York, p.61-107.

WILLIAMS, G.V.; ROHEL, D.Z.; KUZIO, J. & FAULKNER, P. (1989) **A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants.** Journal of General Virology 70:187-202.

WOOD, A.W. & GRANADOS, R.R. (1991) **Genetically engineered baculovirus as agents for pest control.** Annual Review of Microbiology 45:69-87.

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