



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos  
baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do  
*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus***

**Anabele Azevedo Lima**

Brasília  
Junho/2008



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos  
baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do  
*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus***

**Anabele Azevedo Lima**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Molecular da Universidade de  
Brasília, como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular**

Orientador: Dr. Bergmann Morais Riberio

Co-orientadora: Dra. Maria Elita Batista de Castro

Brasília  
Junho/2008

**Anabele Azevedo Lima**

**Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos  
baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do  
*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Molecular da Universidade de  
Brasília, como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular**

Banca Examinadora:

---

Dra. Marlida Lobo de Souza – Embrapa/Cenargen

---

Dr. Tatsuya Nagata – Universidade de Brasília

---

Dr. Renato de Oliveira Resende (Suplente) – Universidade de Brasília



(Fonte: Breno Abreu)

*Em memória à minha avózinha, que  
estará sempre viva no meu coração.*

*Ofereço*

*Aos meus pais, Luetil e Fátima, por todos os esforços atribuídos à minha formação profissional e principalmente à formação humana, bem como pelas horas de incentivo, amor e confiança.*

***Dedico***

## Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

...A Deus, pois, sem sua ajuda, nada teria sido possível e por me dar forças para lutar pelo que acredito

...À minha querida família, pela confiança, pelo apoio, pelo amor e compreensão

...Ao Prof<sup>o</sup> e Dr. Renato de Oliveira Resende, do laboratório de Microscopia Elerônica, pela ajuda sempre que necessária, pelo carinho e pela atenção, pelas dicas e conselhos e principalmente pelo incentivo

...Aos amigos do laboratório, que me ensinaram muito, principalmente pela convivência agradável, pelo clima de companherismo e amigável que encontramos no nosso laboratório e pela contribuição de alguma forma com o meu crescimento pessoal e profissional. Amizades que estarão sempre no meu coração!!! Muito obrigada, Breno, Maria, Lorryne (Lozinha), Greice, Marcelo, Thiago, Fabrício, Roberto, Hugo, Paulo, Raimundo, Claudinha, Vitor, Juliana, Bruna, Daniel, Michele, Susane, Mariana Halwass, Tati e Bruno, por serem pessoas maravilhosas que eu sei que posso contar, estejam perto ou longe

...Às minhas amingas do coração, Glaucinha e Aline, pelos ensinamentos, pelo apoio em todos os momentos, pelos puxões de orelha que me fizeram amadurecer, pela cumplicidade, carinho e pelos momentos de diversão, principalmente quando se trata de comida

...À Érica e ao Vinícius, não poderia deixar de agradecer, por serem pessoas tão prestativas que me ajudaram muito e graças a uma mãozinha deles consegui os clones tão importantes para o meu trabalho; Ao Paulo pelo grande incentivo e pela amizade, afinal foi ele quem me levou para esse mundo encantador da biologia molecular!!!

...Às meninas do Laboratório de Vírus de Inseto (LVI) da EMBRAPA/Cenargen, Briana, Syomara, Juliana e Lorena por toda ajuda, por terem me recebido amigavelmente, pelos almoços e conversas muito agradáveis e pela amizade que pude construir

...À Dra. Marlinda e ao Dr. Tatsuya por aceitarem gentilmente a participar da minha defesa de dissertação e por contribuírem com o melhoramento do trabalho

...À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do trabalho

...A CAPES, pelo apoio financeiro

...A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação.

## **Agradecimento Especial**

Ao Prof<sup>o</sup> Bergmann Morais Ribeiro, por ter aceitado ser meu orientador, pela confiança, apoio, compreensão e enorme paciência, meus eternos agradecimentos e muito obrigada pela convivência agradável e por ter contribuído de forma tão significativa para o meu profissionalismo.

A Dra. Elita, por ter me recebido muito bem na EMBRAPA/Cenargen, no Laboratório de Vírus de Inseto (LVI), por também ter aceitado ser minha orientadora, pela ajuda, confiança, dedicação, apoio e também pelas conversas agradáveis e valiosas sugestões. Muito obrigada por tudo!!!

# Índice

Agradecimentos	vi
Agradecimento Especial	vii
Índice	ix
Índice de figuras	xii
Índice de tabelas	xiv
Abreviaturas e símbolos	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	12
2. Baculovírus	15
2.1 Classificação dos Baculovírus	15
2.2 Características gerais dos baculovírus	18
2.3 Infecção in vivo causada por baculovírus em larvas hospedeiras	20
2.4 Regulação da expressão gênica	23
2.5 Sistema de expressão dos Baculovírus	24
2.6 Controle de insetos utilizando o baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AgMNPV) no Brasil	26
2.7 Outras espécies de baculovírus que atacam insetos-praga	30
2.8 Genes virais quitinase e catepsina	32
3. Objetivos	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. Materiais e Métodos	38
4.1. Vírus, células e insetos	38
4.2. Purificação do DNA de BV em larga escala	39
4.3 Construção do plasmídeo p2100Ac.v- <i>chiA/v-cath</i>	40

<b>4.4. Construção do plasmídeo p2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>43</b>
<b>4.5 Construção dos vetores pGEMAc.v-<i>chiA</i>, pGEMAc.v-<i>cath</i>, pGEMCf.v-<i>chiA</i> e pGEMCf.v-<i>cath</i></b>	<b>46</b>
<b>4.6 Construção dos vetores de transferência pAgGalAc.v-<i>chiA</i>, pAgGalAc.v-<i>cath</i>, pAgGalCf.v-<i>chiA</i> e pAgGalCf.v-<i>cath</i></b>	<b>49</b>
<b>4.7 Confirmação da construção dos plasmídeos p2100Ac.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i> e p2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>50</b>
<b>4.8 Construção do baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>51</b>
<b>4.9 Confirmação da introdução dos genes v-<i>chiA</i> e v-<i>cath</i> no DNA genômico do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>52</b>
4.9.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	52
4.9.2 Construção de sonda não-radioativa	54
4.9.3 Hibridização não-radioativa do perfil de restrição viral e plasmidial:	54
<b>4.10 Análise transcricional (RT-PCR) dos genes v-<i>chiA</i> e v-<i>cath</i> em células de inseto infectadas com o vírus vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>56</b>
<b>4.11 Purificação dos corpos de oclusão (OB) a partir de insetos infectados com AgMNPV e vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i> seguido da contagem dos OB purificados</b>	<b>59</b>
<b>4.12 Bioensaios</b>	<b>61</b>
<b>4.13. Ensaio Enzimáticos</b>	<b>62</b>
4.13.1 Ensaio Quitinolítico	62
4.13.2 Ensaio Proteolítico	63
<b>5. Resultados</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Construção do plasmídeo p2100Ac.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>65</b>
<b>5.2 Construção do plasmídeo p2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>68</b>
<b>5.3 Confirmação da construção dos vetores pGEMAc.v-<i>chiA</i>, pGEMAc.v-<i>cath</i>, pGEMCf.v-<i>chiA</i> e pGEMCf.v-<i>cath</i></b>	<b>71</b>
<b>5.4 Construção dos vetores de transferência pAgGalAc.v-<i>chiA</i>, pAgGalAc.v-<i>cath</i>, pAgGalCf.v-<i>chiA</i> e pAgGalCf.v-<i>cath</i></b>	<b>75</b>
<b>5.5 Construção e confirmação do baculovírus AgMNPV recombinante (vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i>)</b>	<b>77</b>
<b>5.6 Análise transcricional dos genes quitinase (v-<i>chiA</i>) e catepsina (v-<i>cath</i>) do vírus vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i> expressos em células de inseto</b>	<b>82</b>

<b>5.7 Análise dos parâmetros de mortalidade a partir do vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i> e do AgMNPV</b>	<b>85</b>
<b>5.8 Análise da liquidação e da estrutural dos tecidos das larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas com AgMNPV e vAgp2100Cf.v-<i>chiA</i>/v-<i>cath</i></b>	<b>87</b>
<b>5.9 Ensaio enzimático</b>	<b>92</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>95</b>
<b>7. Conclusões e Perspectivas</b>	<b>106</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>107</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Planta da soja e os seus grãos.....	12
<b>Figura 2:</b> Árvore filogenética baseada na sequência dos genes <i>lef-8</i> e <i>ac22</i> de 39 vírus pertencentes à família Baculoviridae que infectam insetos de diferentes ordens de artrópodes..	17
<b>Figura 3:</b> Ultraestrutura de um baculovírus. (A) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma partícula viral extracelular ( <i>Budded vírus</i> – BV) entrando em uma célula por endocitose. (B) A figura mostra através de microscopia eletrônica de transmissão as partículas virais oclusas (ODV) em uma matriz protéica (corpo de oclusão ou OB).....	19
<b>Figura 4:</b> Esquema ilustrando o ciclo natural de infecção causado pelo baculovírus em larvas da ordem Lepidoptera. ....	22
<b>Figura 5:</b> (A) Larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (4º/5º instar) saudável. (B) Larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> morta por infecção causada pelo baculovírus AgMNPV.....	27
<b>Figura 6:</b> Fenograma mostrando a relação entre o AgMNPV e outros vinte e sete genomas completos de baculovírus. ....	29
<b>Figura 7:</b> Larva de <i>Autographa californica</i> (Lepidoptera: Noctuidae). ....	30
<b>Figura 8:</b> Larva de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Lepidoptera: Noctuidae). ....	31
<b>Figura 9:</b> Organização dos genes quitinase e catepsina no genoma do baculovírus AcMNPV. ....	41
<b>Figura 10:</b> Plasmídeo p2100linkerBglII. ....	42
<b>Figura 11:</b> Organização dos genes quitinase e catepsina no genoma do baculovírus CfDefNPV. ....	44
<b>Figura 12:</b> Plasmídeo p2100linkerHindIII. ....	45
<b>Figura 13:</b> Mapa do plasmídeo pAgGal mostrando a localização do promotor da poliedrina assim como a localização da região promotora do gene <i>gpt</i> antes do gene da $\beta$ -galactosidase ( <i>LacZ</i> ). ....	49
<b>Figura 14:</b> Perfil de restrição do DNA genômico do AcMNPV com a enzima de restrição BamHI. ....	65
<b>Figura 15:</b> Esquema da construção do plasmídeo p2100Ac.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> . ....	67
<b>Figura 16:</b> Análise eletroforética mostrando o perfil de restrição do plasmídeo construído p2100Ac.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> . ....	68
<b>Figura 17:</b> Perfil eletroforético da digestão do plasmídeo pCfDefNPVHindIIIQ com a enzima HindIII.....	69
<b>Figura 18:</b> Esquema da construção do plasmídeo p2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> . ....	70
<b>Figura 19:</b> Análise eletroforética do plasmídeo p2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> . ....	71
<b>Figura 20:</b> Análise eletroforética mostrando os fragmentos de PCR amplificados, referentes aos genes <i>v-<i>chiA</i></i> e <i>v-<i>cath</i></i> . ....	72

<b>Figura 21:</b> Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídeos pGEMAc.v- <i>chiA</i> e pGEMAc.v- <i>cath</i> . . . . .	73
<b>Figura 22:</b> Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídeos pGEMCf.v- <i>chiA</i> e pGEMCf.v- <i>cath</i> .....	74
<b>Figura 23:</b> Esquema da construção dos plasmídeos pAgGalCf.v- <i>chiA</i> , pAgGalCf.v- <i>cath</i> e pAgGalAc.v- <i>cath</i> .. . . .	76
<b>Figura 24:</b> Confirmação da clonagem dos genes catepsina do AcMNPV e CfDefNPV e do gene quitinase do CfDefNPV no vetor pAgGal.....	77
<b>Figura 25:</b> Esquema ilustrativo da construção e do isolamento do baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> pelo método de recombinação homóloga.....	79
<b>Figura 26:</b> Amplificação dos genes v- <i>chiA</i> e v- <i>cath</i> do vírus recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> .. . . .	80
<b>Figura 27:</b> Confirmação da inserção dos genes v- <i>chiA</i> e v- <i>cath</i> no genoma do baculovírus AgMNPV. . . . .	81
<b>Figura 28:</b> Análise transcricional dos genes quitinase e catepsina em células de inseto infectadas com o vírus recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> .....	83
<b>Figura 29:</b> Análise da PCR utilizada para identificar a especificidade dos fragmentos correspondente aos genes quitinase e catepsina do vírus recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> .....	84
<b>Figura 30:</b> Análise estrutural dos tecidos internos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas com o vírus aelvagem AgMNPV nas diferentes horas após infecção.....	88
<b>Figura 31:</b> Análise estrutural dos tecidos internos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> nas diferentes horas após infecção. . . . .	89
<b>Figura 32:</b> Larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> com diferentes h p.i.....	91
<b>Figura 33:</b> Larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas com o vírus AgMNPV com 10 dp.i. . . . .	92
<b>Figura 34:</b> Atividade quitinolítica detectada nos poliedros produzidos pelos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> a uma absorvância de 550 nm. . . . .	93
<b>Figura 35:</b> Atividade proteolítica detectada na hemolinfa extraída de larvas infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> , a uma absorvância de 595 nm.....	94
<b>Figura 36:</b> Atividade proteolítica detectada nos poliedros produzidos pelos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i> a uma absorvância de 595 nm. . . . .	94

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos usados nas PCR para detecção dos genes quitinase e catepsina no DNA dos plasmídeos.....	48
<b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeo usados nas PCR para construção do cDNA e para detecção do RNAm dos genes quitinase e catepsina no DNA do vírus recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA/v-cath</i> .....	58
<b>Tabela 3:</b> Concentração letal média para larvas <i>A. gemmatalis</i> infectadas oralmente com poliedros dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA/v-cath</i> . Método de Probit.....	85
<b>Tabela 4:</b> Tempo letal médio (TL <sub>50</sub> ) para larvas <i>A. gemmatalis</i> infectadas oralmente com poliedros dos vírus vAgp2100Cf.v- <i>chiA/v-cath</i> e AgMNPV. Método de Probit.....	86
<b>Tabela 5:</b> Mortalidade e tempo de morte de larvas <i>A. gemmatalis</i> infectadas oralmente com o recombinante vAgp2100Cf.v- <i>chiA/v-cath</i> e com o AgMNPV nas diferentes concentrações de poliedros.....	87

## Abreviaturas e símbolos

Amp	resistência à ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
dNTP	Deoxinucleotídeos
g	grama
h	hora
h p.i.	horas após infecção
HCl	ácido clorídrico
Kb	quilobase = 1000 pares de base
KDEL	possível sinal de localização no retículo endoplasmático (K - Lisina, D - 4ácido aspártico, E - ácido glutâmico e L - leucemia).
L	litro
M	molar: mol/L
mg	miligrama = 10 <sup>-6</sup> grama
µg	micrograma
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlítro
mm	milímetro
mM	milimolar
µM	micromolar (micromol por litro)

NaCl	Cloreto de sódio
ng	nano grama
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	transcriptase reversa- PCR
pfu	unidade formadora de placa
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
r.p.m.	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
TM	Tempo médio de morte
TL <sub>50</sub>	Tempo letal médio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
° C	grau Celsius

## Resumo

Baculovírus são vírus de DNA fita dupla, específicos de artrópodes, que têm sido utilizados, principalmente, como agentes de controle biológico de insetos-praga e como vetores de expressão de genes heterólogos. A utilização do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) no controle da lagarta da soja, *A. gemmatalis*, no Brasil, é o maior exemplo mundial de sucesso de um vírus utilizado como bioinseticida. Uma das características interessantes do genoma viral do AgMNPV está na ausência dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*), que por sua vez estão presentes na maioria dos genomas dos baculovírus pertencentes ao grupo I do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). A ausência dos genes *v-chiA* e *v-cath* pode ser responsável pela ausência de liquidação de larvas de *A. gemmatalis* mortas pela infecção do AgMNPV. Este trabalho teve como objetivo a construção de AgMNPV recombinantes com a introdução individual ou em conjunto dos genes *v-chiA* e *v-cath*, derivados dos vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV) no genoma viral, para a observação dos efeitos causados pela infecção viral em larvas de *A. gemmatalis*, comparativamente ao vírus AgMNPV selvagem. O DNA plasmidial do vetor de transferência, contendo os dois genes derivados do vírus CfDefNPV, foi co-transfectado com o DNA de um vírus recombinante derivado do AgMNPV, o vírus vAgGalA2, em células *A. gemmatalis* (UFL-AG-286). O novo vírus recombinante construído (vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath) foi isolado pelo método de diluição seriada, em placa de 96 poços. O vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath foi capaz de promover a liquidação do corpo das larvas de *A. gemmatalis* após a morte das mesmas. Porém, não houve diferenças significativas com relação à virulência, e conseqüentemente, o tempo de morte das larvas comparado com o AgMNPV selvagem. Os AgMNPV recombinantes

possuindo apenas um dos genes (*v-chiA* ou *v-cath*) ainda não foram isolados e, desta forma, não foi possível analisar o efeito causado por esses genes separadamente, em larvas de *A. gemmatalis*.

## Abstract

Baculoviruses are double-stranded DNA viruses, arthropod-specific that have been mainly used as biological-control agents of insect pests and as heterologous gene expression vectors. The use of the *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) in Brazil, for the control of the velvetbean caterpillar is the most successful example of a virus used as a biological pesticide. One of the interesting features of the AgMNPV genome is the absence of chitinase (*v-chiA*) e catepsin (*v-cath*) genes, which in turn are present in most of the genomes of baculoviruses belonging to group I of the *Nucleopolyhedrovirus* genus. The absence of *v-chiA* and *v-cath* genes may be responsible for the lack of liquefaction of *A. gemmatalis* larvae killed by AgMNPV. The aim of this work was the construction of recombinant AgMNPV with the introduction of each gene (*v-chiA* or *v-cath*) alone or both of them, derived from the baculoviruses *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) and *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV) into the AgMNPV genome and observation of the effects caused by the viral infection in *A. gemmatalis* larvae, compared with the wild-type AgMNPV infection. A recombinant transfer vector DNA, containing both genes derived from CfDefNPV, was co-transfected with DNA from vAgGalA2 virus, derived from AgMNPV, in *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) cells. The new recombinant AgMNPV virus construct (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*) was isolated using the serial dilution method in 96 well-plates. The vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* was able to promote liquefaction of infected *A. gemmatalis* larvae soon after death. However, we have not detected significant differences with regard to virulence, and consequently, the time of death, when compared with the wild-type AgMNPV. The AgMNPV recombinants, containing only one of the genes (*v-chiA* or *v-cath*) have not

been isolated yet, and therefore, it was not possible to analyse the effects caused from this genes separately in *A. gemmatalis* larvae.

## 1. Introdução

A soja (Figura 1), caracterizada por ser uma planta leguminosa de origem chinesa, apresentou seu primeiro registro no Brasil em 1982, no Estado da Bahia, passando a ser considerada um dos principais produtos rentáveis do País (Ferraz, 2001). Atualmente, o Brasil é considerado o segundo produtor mundial do grão de soja, responsável pela produção de mais de 58,39 milhões de toneladas de soja dos 20,930 milhões de hectares existentes (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - CONAB, 2008). O Estado do Mato Grosso é considerado o maior produtor brasileiro de soja produzindo 15,359 milhões de toneladas e o Estado do Paraná é considerado o segundo maior produtor brasileiro de soja produzindo 11,916 milhões de toneladas na safra de 2006/2007 (CONAB, 2007).



**Figura 1:** Planta da soja e os seus grãos. Adaptado do site: [http://www.kennislink.nl/upload/121175\\_962\\_1098360669291-soja\\_klein.jp](http://www.kennislink.nl/upload/121175_962_1098360669291-soja_klein.jp).

Estima-se que cerca de 15 % das perdas na agricultura, em todo o mundo, se devam unicamente ao ataque de insetos (Bravo & Quintero, 1993). Diferentes espécies de insetos atacam as culturas de soja durante o seu ciclo vegetativo e reprodutivo, principalmente em seu estágio larval, representando um importante fator que afeta a planta e a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, caso não

seja feito tratamento para controlar a população de pragas, que poderá tornar-se excessiva e causar perdas significativas no rendimento da cultura (Turnipseed & Kogan, 1987).

O controle de insetos-praga tem sido feito predominantemente com uso de inseticidas químicos. Entretanto, existe uma tendência em reduzir os investimentos e consumo destes produtos químicos, uma vez que se adquire o desenvolvimento de resistência aos princípios ativos pelos insetos, além das fortes pressões sociais para a conservação ambiental. Sendo assim, embora o controle químico seja importante para reduzir o risco de danos econômicos em lavouras, a sua utilização apresenta alta toxicidade e pode resultar em efeitos adversos ao homem e ao ambiente (Moscardi & Sousa, 2002). O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e a tendência ao longo dos anos é estar sempre aumentando, devido à necessidade de novas formulações mais adequadas às pragas, que se tornam mais resistentes ao seu uso. Diante de tais limitações, o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos tem crescido, como por exemplo, os bioinseticidas (Almeida & Batista Filho, 2001).

Dependendo do bioinseticida a ser utilizado, pode apresentar um custo menor e tempo de vida útil maior que os inseticidas químicos, levando em consideração a dificuldade da praga se tornar resistente ao seu uso, além de serem mais específicos e menos poluentes. A utilização de patógenos em programas de controle representa atualmente, mais de 2 % dos agentes de controle de insetos usados em todo o mundo (Ribeiro *et alli*, 2001). Entre os métodos aplicados ao controle biológico de pragas destacam-se a utilização de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (Souza *et alli*, 2002).

O baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é capaz de controlar populações de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga da soja que provoca o desfolhamento da soja. Como bioinseticida, os baculovírus podem ser aplicados em forma de pó (um produto formulado) sobre a cultura para serem ingeridos pelas lagartas-alvo. Dentre as vantagens da utilização dos baculovírus como bioinseticida destacam-se (Ramachandran *et alli*, 2001):

1. A ação específica dos baculovírus sobre o inseto-alvo;
2. É considerado um método seguro para o manuseio;
3. Apresenta vantagem de não poluir o meio ambiente;

Embora existam algumas limitações, com relação ao seu uso que ainda é muito pequeno nas lavouras e o longo período entre a infecção e a morte do inseto alvo (4-14 dias), permitindo que o inseto ainda cause dano à lavoura antes de sua morte.

Há alguns anos, a eficiência da utilização de vírus nos programas de controle de insetos-praga, no Brasil, tem sido demonstrada. Vários programas de controle biológico são aplicados no Brasil em culturas como a soja, milho e mandioca, uma vez controladas com os baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*, *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* e *Erinnys ello granulovirus*, respectivamente. Outros vírus têm sido isolados de pragas de grande importância com potencial de uso nas culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestas (Ribeiro *et alli*, 1998).

A utilização da Engenharia Genética permitiu a construção de baculovírus recombinantes visando o melhoramento da sua virulência pela inserção de diferentes

genes codificantes de proteínas inseticidas (Ghosh *et alli*, 2002) no genoma dos baculovírus, conseqüentemente aumentando a patogenicidade viral contra seus hospedeiros, para futuras aplicações nos programas de controle biológico.

## **2. Baculovírus**

### **2.1 Classificação dos Baculovírus**

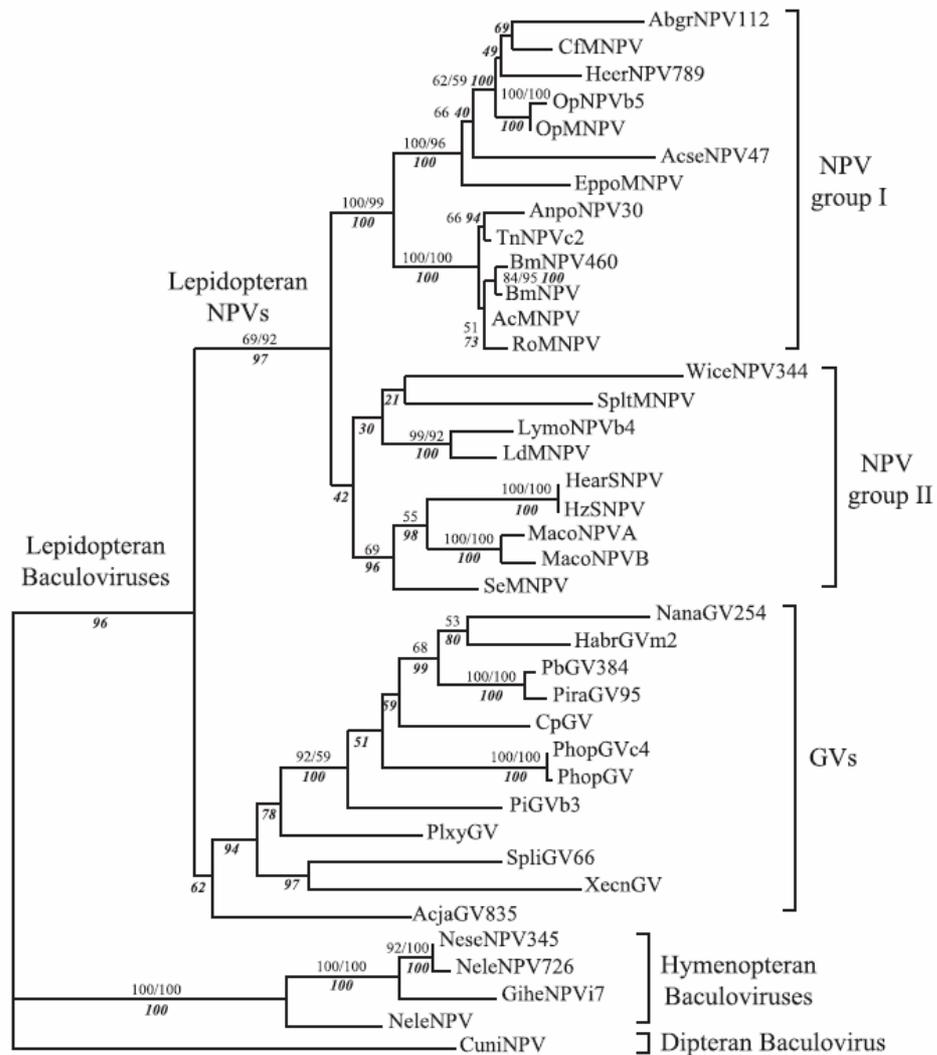
De acordo com o sistema de classificação hierárquica proposto, por volta de 1960, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. São vírus de DNA circular, fita dupla, apresentando tamanho entre 80 e 200 mil pares de bases (pb) como material genético, e está envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete (apresentando cerca de 40-50 nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento), que por sua vez constitui a unidade infectiva do vírus, denominado nucleocapsídeo (Arif, 1986; O'Reilly *et alli*, 1992; Maruniak *et alli*, 2004).

Entre os vírus de inseto, os baculovírus são os mais estudados e utilizados para controlar insetos-praga. Foram relatadas mais de 700 espécies de artrópodes infectados naturalmente por baculovírus, sendo que 90% dos baculovírus foram isolados a partir de espécies de Lepidoptera (Jehle *et alli*, 2006), embora possam ser encontrados em outras ordens como, Díptera e Hymenoptera (Theilmann *et alli*, 2005).

A classificação da família *Baculoviridae* em dois gêneros, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV), é baseada principalmente na morfologia de seus corpos de oclusão (OB), tamanho e sua constituição protéica. Dados filogenéticos baseados na comparação das sequências de determinados genes ou a partir do genoma completo desses vírus estão sendo usados para refinar a classificação entre os NPV e GV. Como

exemplo, podem ser citados os genes da poliedrina e da granulina que foram utilizados em vários estudos filogenéticos de espécies de baculovírus, por serem considerados um dos genes mais conservados entre as espécies de baculovírus da ordem Lepidoptera resultando na separação das espécies pertencentes ao gênero NPV em grupo I e grupo II (Zanotto *et alli*, 1993).

Baseado em métodos de análises filogenéticas produzidos por Herniou *et alli* (2004), a filogenia da família *Baculoviridae*, incluindo 39 vírus, distribuídos entre o gênero NPV e GV, que infectam hospedeiros da ordem Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera, foi reconstruída baseada na seqüência dos genes *lef-8* e *ac22*. Esses genes são altamente conservados no genoma da maioria dos vírus onde o estudo gerou uma árvore filogenética que mostra claramente a divisão dos baculovírus de acordo com a ordem do seu hospedeiro (Figura 2).



**Figura 2:** Árvore filogenética baseada na seqüência dos genes *lef-8* e *ac22* de 39 vírus pertencentes à família *Baculoviridae* que infectam insetos de diferentes ordens de artrópodes. Adaptado de Herniou *et alli* (2004).

Os baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, também denominados de “*nuclear polyhedrosis viruses - NPV*” (vírus da poliedrose nuclear) caracterizam-se por produzirem grandes corpos de oclusão, chamados de poliedros, variando de 0,5 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo composto principalmente de uma proteína, denominada poliedrina de peso molecular em torno de 29 kDa (Bilimoria *et alli*, 1991). Os NPV podem apresentar partículas virais contendo mais de um nucleocapsídeo envolvido por um envelope, denominados MNPV, ou ainda possuírem partículas virais contendo somente um nucleocapsídeo por envelope, denominados SNPV (Bilimoria *et alli*, 1991; Van Regenmortel *et alli*, 2000).

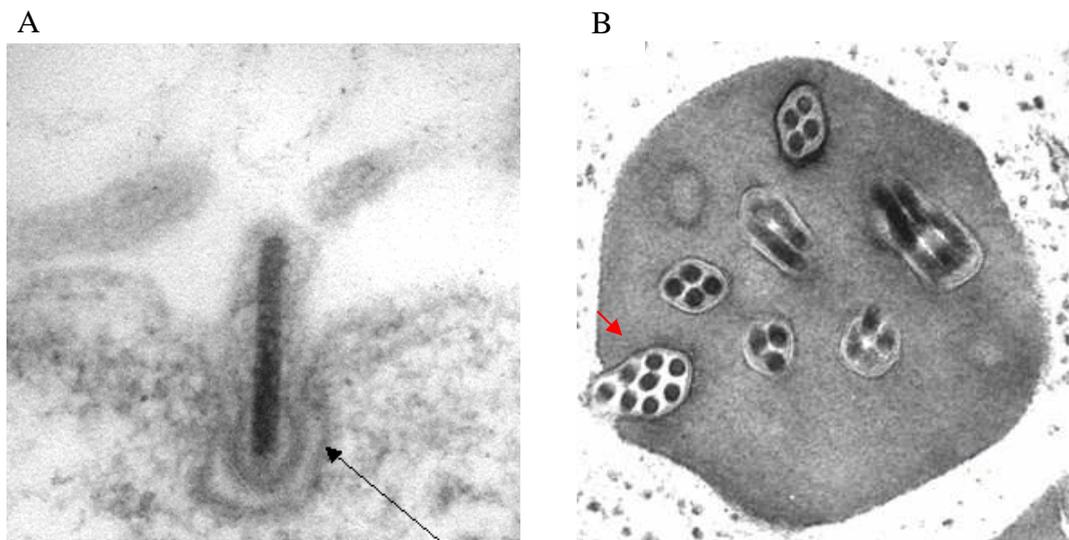
Os baculovírus do gênero *Granulovirus* são também denominados de *granulosis viruses* (vírus da granulose - GV). Já o corpo de oclusão dos GV, denominado grânulo, pode variar entre 0,15 a 0,5 µm de diâmetro apresentando forma ovicilíndrica, composto principalmente pela proteína granulina com peso similar ao da poliedrina e geralmente contém um único vírion, e ao contrário dos NPV, os GV foram isolados apenas de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera (Theilmann *et alli*, 2005). Devido às limitações apresentadas pelo GV durante a replicação em cultura de células e pela pequena gama de insetos hospedeiros, esses vírus ainda são pouco estudados (Hilton & Winstanley, 2007). Ao contrário, os NPV são encontrados em centenas de espécies hospedeiras (Federici, 1997) e existem diferentes linhagens de culturas de células de insetos susceptíveis a esses vírus (Miller, 1997).

## 2.2 Características gerais dos baculovírus

A origem da palavra Baculovírus vem do latim *baculum* (em português: bastão) por se referir à forma estrutural do capsídeo viral apresentado por esse grupo de vírus (Fields *et alli*, 2001).

Uma peculiaridade dos baculovírus é a produção de dois tipos de vírus fenotipicamente distintos durante a infecção: os vírus extracelulares, também conhecidos como BV (do inglês: *budded viruses*) e os vírus ocluídos, conhecidos como OB (do inglês: *occlusion bodies*) ou ainda, poliedros ou grânulos, dependendo do gênero (Murphy *et alli*, 1995). Nestes, um ou vários nucleocapsídeos estão imersos em uma matriz protéica cristalina. Uma vez livres desta matriz, estes vírions constituem os vírus derivados de corpos de oclusão ou ODV (do inglês: *occlusion derived viruses*).

Os BV são produzidos por volta de 12 a 24 h após a infecção (h p.i.), na fase precoce. A transmissão dos BV ocorre de forma sistêmica, ou seja, os BV produzidos são responsáveis pela disseminação do vírus de célula a célula, dentro de um mesmo indivíduo. Esse fenótipo caracteriza-se pela presença de um nucleocapsídeo simples envolto por um envelope, derivado da membrana plasmática (Figura 3 A). Já a proteína poliedrina, responsável pela formação ocluída do vírus é produzida no núcleo da célula na última fase da infecção, e a partir de 36 h p.i. os poliedros passam a ser produzidos. Os corpos de oclusão ou OB são formados a partir de uma matriz protéica que confere proteção às partículas virais no ambiente (Figura 3 B). A transmissão dos OB ocorre horizontalmente, de inseto para inseto, por via oral (Volkman & Keddie, 1990).



**Figura 3:** Ultraestrutura de um baculovírus. (A) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma partícula viral extracelular (*Budded virus* – BV) entrando em uma célula por endocitose. (B) A figura mostra através de microscopia eletrônica de transmissão as partículas virais ocluídas (ODV) em uma matriz protéica (corpo de oclusão ou OB). (Fontes: foto A: adaptada de <http://www.checue.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo2.gif> e foto B: cedida pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro).

### **2.3 Infecção *in vivo* causada por baculovírus em larvas hospedeiras**

A replicação dos baculovírus caracteriza-se pela produção de dois tipos de progênes infecciosas, citados anteriormente, apresentando funções diferentes, porém necessárias para a sua propagação natural (Granados & Federici, 1986 citado por Castro *et alli*, 1999).

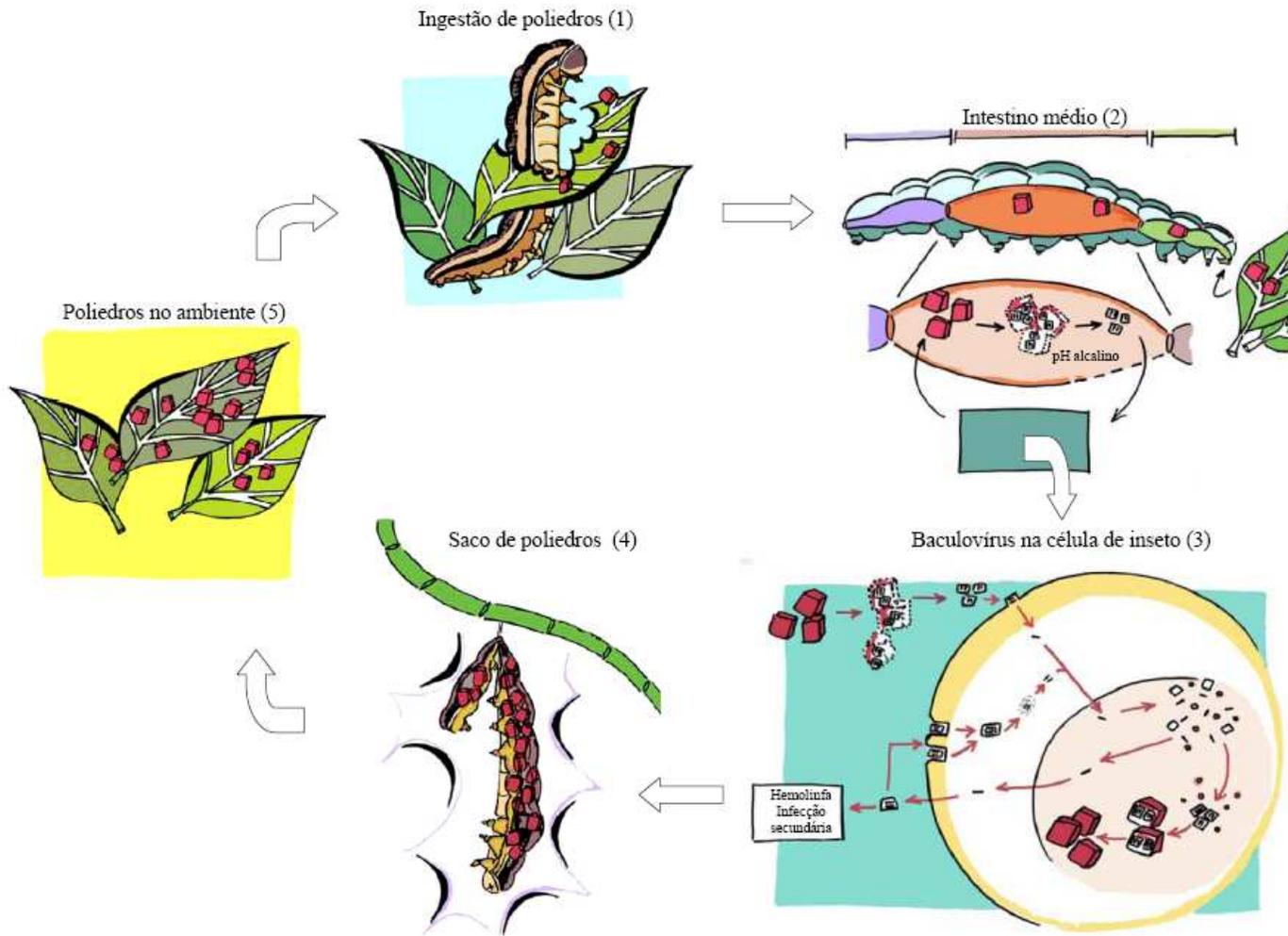
A lagarta ao se alimentar de partes da planta hospedeira contaminada com poliedros, presentes naturalmente no meio ambiente, proporciona a penetração desses corpos de oclusão no seu sistema digestório. Ao atingir o intestino médio da lagarta, o vírus é submetido a um pH alcalino (variando de 9,5 a 11,5) onde a matriz protéica do corpo de oclusão é solubilizada, liberando assim, as partículas virais denominadas de vírus derivados da oclusão (ODV). Essas partículas darão início à infecção denominada primária de maneira que as partículas virais atravessam a membrana peritrófica e os nucleocapsídeos virais se fundem às membranas das microvilosidades das células colunares do intestino médio, mediada por receptores presentes no envelope lipoprotéico das células (Horton & Burand, 1993; Haas-Stapleton *et alli*, 2004). Em seguida, os nucleocapsídeos são transportados via citoesqueleto até penetrarem nos poros nucleares, atingindo o núcleo, onde o material genético viral é liberado dando início à transcrição dos genes virais e a replicação do seu genoma. Novos nucleocapsídeos são então produzidos e transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio, sendo em seguida liberados para infectar células do sistema traqueal ou se disseminar pela hemolinfa do inseto hospedeiro (Funk *et alli*, 1997; Castro *et alli*, 1999).

Outra via alternativa é o transporte de partículas virais diretamente para as células do sistema traqueal e/ou hemolinfa. Essa disseminação para outros tecidos

caracteriza a infecção secundária e as células epiteliais infectadas produzem o fenótipo BV, que irá infectar outras células por endocitose mediada por receptores. A proteína viral GP64, presente no envelope do vírus é reconhecida por receptores celulares e após a endocitose, essa proteína medeia a fusão da membrana viral com a membrana endocítica, culminando com o escape do vírus para o citoplasma da célula infectada (Engelhard *et alli*, 1994; Volkman & Hom, 2000).

Durante a infecção, o inseto fica debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, ocorre também o clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus no núcleo das células epidermais e adiposas, além de afetar o desenvolvimento da larva parando seu crescimento (Federici, 1997).

Quando a larva do inseto infectada pelo vírus morre, o seu tegumento se desintegra facilmente, liberando grande quantidade de OB no meio ambiente, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros (Volkman & Keddie, 1990) (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema ilustrando o ciclo natural de infecção causado pelo baculovírus em larvas da ordem Lepidoptera. (A) Primeiramente ocorre a ingestão de poliedros (OB), presentes na superfície da planta, pela larva do inseto. Após a ingestão, os OB atingem o intestino médio da larva (B) onde sofrem dissolução devido ao pH, liberando as partículas virais. Ao atravessar a membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares, caracterizando a infecção primária. (C) Em seguida, ocorre a infecção de outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus através da hemolinfa (caracterizando a infecção secundária). (D) A infecção viral se espalha, levando a larva à morte, de maneira que seu corpo se torna um “saco” contendo milhares de OB, que se rompe, liberando os OB no meio ambiente, e assim, dar continuidade ao ciclo de infecção (E) (Barros, 2007).

## 2.4 Regulação da expressão gênica

Uma vez iniciada o processo de infecção, a expressão gênica ocorre, ordenadamente, em cascata (O'Reilly *et alli*, 1992), indicando um controle em nível transcricional, no qual os genes expressos em uma classe temporal regulam os genes expressos na fase subsequente (Blissard & Rohrmann, 1990). A expressão gênica viral pode ser dividida em dois estágios principais: a etapa precoce (fase *early*) caracterizada pelos eventos que precedem à replicação do DNA viral e a etapa tardia (fase *late*), caracterizada pela expressão de genes pós-replicação do DNA viral (Blissard & Rohrmann, 1990). Além disso, as fases precoce e tardia podem ser divididas em fase precoce imediata (*immediate early*, IE), correspondendo a genes expressos logo após a descapsidação viral, nas primeiras horas de infecção e a fase de expressão muito tardia (*very late*) de genes que são expressos a partir de 18 h p.i (Xu *et alli*, 1995; Guarino *et alli*, 1998)

A fase precoce da expressão inicia 30 min após a infecção se estendendo até aproximadamente 8 h p.i. (Gross & Shuman, 1998. Guarino *et alli*, 1998). O DNA viral começa a ser transcrito causando rearranjo do citoesqueleto e a dispersão da cromatina no núcleo da célula hospedeira. A fase tardia se inicia com a replicação do DNA viral e é completamente dependente da expressão de genes da fase precoce, e a partir de 8 a 10 h p.i., à produção das partículas virais extracelulares (BV). Esta fase também caracteriza-se pela parada na síntese de proteínas celulares (Lu & Miller, 1997).

A fase tardia é subdividida em tardia ou *late* (6 a 18 h p.i.) e muito tardia ou *very late* (18 h p.i. em diante) (Blissard & Rohrmann, 1990). A fase muito tardia (*very late*) caracteriza-se pela produção da proteína poliedrina, principal proteína que compõe a matriz

protéica do OB, durante a sua montagem que ocorre no núcleo e pela produção da proteína P10, que forma agregados fibrilares no núcleo e no citoplasma e está envolvida no processo de oclusão das partículas virais, assim como, na lise celular com aproximadamente 72 h p.i. (Williams & Faulkner, 1997).

## **2.5 Sistema de expressão dos Baculovírus**

Além de serem eficientes como bioinseticidas, os baculovírus são também utilizados como sistema de expressão, ou seja, podem expressar genes heterólogos com eficiência. O sistema baseia-se na introdução de genes exógenos no genoma de algum baculovírus de interesse no lugar de um gene não essencial para a replicação, sempre comandado por um promotor considerado forte.

Smith *et alli* (1983) e Pennock *et alli* (1984) publicaram os primeiros trabalhos utilizando o baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMPNV) como vetor de expressão para produzir  $\beta$ -interferon e  $\beta$ -galactosidase em cultura de células de *S. frugiperda* (IPLB SF-21 AE). Proteínas de importância em diversas áreas, como por exemplo, na medicina e na agricultura, foram expressas em grande quantidade, em cultura de células de insetos usando os baculovírus como vetores de expressão (Ribeiro *et alli*, 1998)

Comparado com outros sistemas de expressão, as vantagens para utilização desses vetores são: potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis; alta especificidade dos baculovírus, tornando-se um sistema seguro para ser utilizado; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção sem interferência no ciclo viral; capacidade para clonagem de grandes inserções; co-expressão

de dois ou mais genes; ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas de eucariotos; simplicidade de manipulação (Ribeiro *et alli*, 1998).

O modelo mais simples desse sistema consiste na troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo de interesse sob o comando do promotor da poliedrina (Smith *et alli*, 1983). A produção de um vírus capaz de se replicar em células de inseto pela inativação do gene da poliedrina por deleção ou inserção de um novo gene impede a formação da poliedrina e conseqüentemente a formação dos corpos de oclusão (Possee, 1997). Da mesma maneira, a produção de vírus recombinantes construídos a partir da deleção de outros genes como o da quitinase do baculovírus AcMNPV não afeta a replicação viral em cultura de células ou em insetos, porém perde a capacidade de derreter ou liquefazer o corpo da larva (Hawtin *et alli.*, 1997). Um efeito similar foi observado quando deletou-se o gene catepsina do genoma do baculovírus AcMNPV (Slack & Faulkner, 1995).

Existem vários métodos para construir um baculovírus recombinante, entre eles a inserção de genes heterólogos em baculovírus por recombinação homóloga que ocorre quando um vetor de transferência, contendo o gene de interesse, e seqüências flanqueando o gene homólogo à seqüência é introduzido juntamente com um DNA viral dentro de células de inseto. Assim que são submetidos à co-transfecção em célula de inseto, ocorre uma troca de insertos, por recombinação homóloga, resultando na substituição do gene original no vírus pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Nas células serão produzidos vírus selvagem e recombinantes sendo que esse último será isolado por purificação em diluição seriada em placas de 96 poços contendo células de inseto infectadas (Castro *et alli*, 1999).

Um outro método muito utilizado para construir baculovírus recombinantes se dá pela transposição sítio específica de um cassete de expressão para o genoma do baculovírus

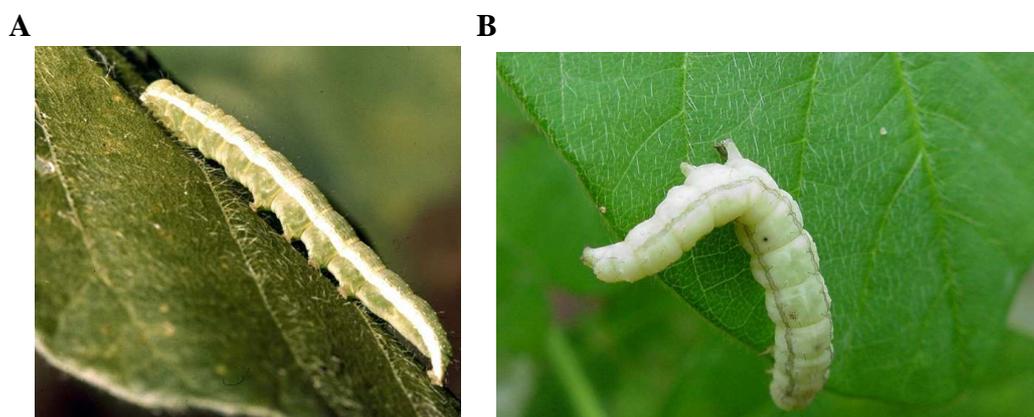
propagado em células de *Escherichia coli* DH10Bac<sup>TM</sup> (Invitrogen), que por sua vez possui além do genoma do baculovírus, um plasmídeo *helper* responsável pela codificação de uma transposase bacteriana que reconhece seqüências repetidas invertidas que flanqueiam o gene exógeno no vetor pFastBac (Luckow *et alli*, 1993). Este método consiste de um vetor de transferência pFastBac que contém o gene de interesse sob o comando de um promotor específico do baculovírus e quando propagados em células de *Escherichia coli* DH10Bac<sup>TM</sup> ocorre a transposição do cassete de expressão do gene heterólogo para o Bacmid dentro da célula hospedeira.

## **2.6 Controle de insetos utilizando o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) no Brasil**

A larva de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja, é considerada uma praga-chave da sojicultura, ocorrendo desde a Argentina até o Sudeste dos EUA, podendo causar diminuição significativa na produção de soja, tornando-se economicamente importante (Gallo *et alli*, 2002). A ocorrência da lagarta da soja nas culturas de soja no Brasil varia entre o período de novembro a março, apresentando picos populacionais a partir de janeiro conforme a região (Andrade *et alli*, 2004). Na fase larval de *A. gemmatalis*, as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja causando prejuízo considerável à medida que crescem, tornando-se responsáveis por importantes danos à cultura de soja. Com o objetivo de atingir o seu desenvolvimento máximo, estágio de pupa, as lagartas podem comprometer até 100% da cultura de soja, pelo desfolhamento, comendo tanto o limbo como as nervuras da planta. O

consumo médio da lagarta é de 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (Gallo *et alli*, 2002).

Visando o combate às pragas que atacam a soja, vários países produtores dessa leguminosa, e entre eles o Brasil, estão empregando investimentos tecnológicos de alto nível. Desde a década de 1970, o Brasil vem desenvolvendo e aprimorando programas visando a excelência da qualidade e produtividade desta leguminosa. Entre esses programas destaca-se o maior programa mundial de controle de uma praga usando um vírus, desenvolvido pela Embrapa Soja (Londrina-PR), implantado no início da década de 1980, que utiliza o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), que foi isolado pela primeira vez de larvas do inseto *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Allen & Knell, 1977) (Figura 5).

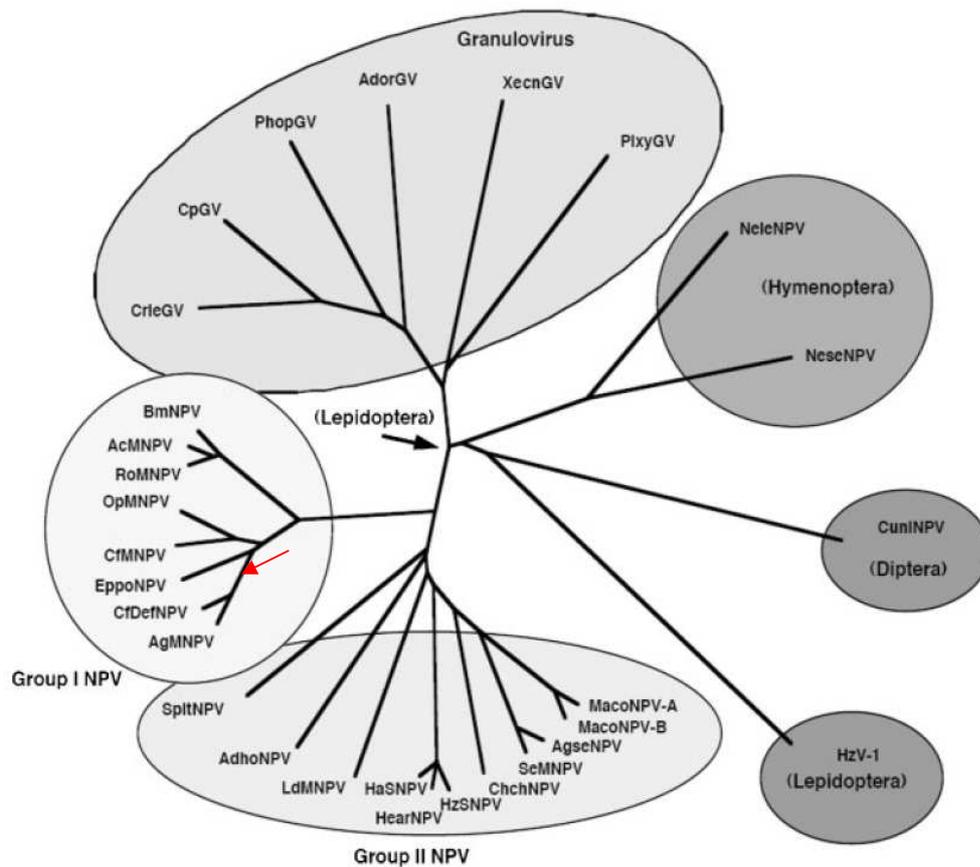


**Figura 5:** (A) Larva de *Anticarsia gemmatalis* (4º/5º ínstar) saudável. (B) Larva de *Anticarsia gemmatalis* morta por infecção causada pelo baculovírus AgMNPV. (Adaptado de: <http://www.forestryimages.org/images/192x128/1235190.jpg> e <http://www.embrapa.gov.br>).

O uso efetivo do AgMNPV em culturas de soja chegou a atingir cerca de 2 milhões de hectares de soja, esse fato indica que a utilização de grandes quantidades de inseticidas químicos deixaram de ser aplicados no meio ambiente. Esse vírus é considerado um

excelente agente de controle biológico por ser altamente específico e por conseguir driblar com eficiência os mecanismos de defesa da lagarta (Moscardi, 1998; Ribeiro & Pinedo, 2001).

Oliveira *et alli* (2006) publicaram recentemente o genoma completo do baculovírus AgMNPV, apresentando um DNA genômico com 132.239 pares de bases (pb). A análise inicial revelou que o AgMNPV pertence ao grupo I do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), apresentando uma maior identidade de seqüências e organização genômica com os baculovírus *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV), *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (EppoNPV), *Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV) e *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) (Figura 6).



**Figura 6:** Fenograma mostrando a relação entre o AgMNPV e outros vinte e sete genomas completos de baculovírus (Oliveira *et alli*, 2006).

*In vitro*, o AgMNPV é capaz de se replicar melhor em cultura de células de *A. gemmatalis* (UFL-AG- 286) (Sieburth & Maruniak, 1988) embora possa se replicar em outras linhagens celulares de *S. frugiperda* (IPLB-Sf21-AE) (Vaughn *et alli*, 1977) *T. ni* (Tn368) (Clem *et alli*, 1994) e BTI-Tn5B1-4 (Granados *et alli*, 1994).

## 2.7 Outras espécies de baculovírus que atacam insetos-praga

Entre outras espécies de larvas de insetos que atacam plantações no mundo encontram-se as larvas de *Autographa californica* encontradas na América do Norte, sendo nativas desta área. Alimentam-se da folhagem de uma variedade de cultura de plantas hospedeiras, tais como a planta da batata (Brewer, 1995).



**Figura 7:** Larva de *Autographa californica* (Lepidoptea: Noctuidae). (Adaptado de: <http://www.forestryimages.org/images/192x128/1355055.jpg>)

Essas larvas também são susceptíveis a vírus específicos de insetos que ocorrem naturalmente, como por exemplo, o baculovírus AcMNPV (Brewer, 1995). A espécie *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) que se encontra agrupada ao grupo I do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, é o baculovírus mais estudado atualmente no mundo (Ribeiro *et alli*, 2001) sendo o primeiro baculovírus a ter seu genoma completamente seqüenciado, com um tamanho de 133.894 pb (Ayres *et alli*, 1994). Além do seu ciclo de infecção, que tem sido extensivamente estudado tanto *in vivo* como *in vitro*.

Uma outra importante praga que ataca florestas na América do Norte, *Choristoneura fumiferana*, foi responsável pela destruição de cerca de 4,4 milhões de

hectares de floresta por ano no Canadá, no período de 1990 a 2001 (National Forestry Database; [http://nfdp.ccfm.org/index\\_e.php](http://nfdp.ccfm.org/index_e.php)) (Lauzon *et alli*, 2005).



**Figura 8:** Larva de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Noctuidae). (Adaptado de: <http://www.forestpests.org/caterpillars/sprucebudworm.cfm>).

Atualmente, não existe nenhum agente biológico capaz de controlar com eficácia as infestações das larvas *C. fumiferana*. Arif *et alli* (1984) descreveram o isolamento e a purificação de uma linhagem irlandesa do baculovírus *C. fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV), a partir de uma população de vírus selvagem.

O vírus selvagem isolado é constituído por dois vírus diferentes, o *C. fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV) e outro denominado *C. fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV). O último foi considerado defeituoso devido a sua incapacidade de infectar larvas de *C. fumiferana* pela rota natural de infecção, *per os*, ele só se torna infectivo quando injetado na hemolinfa do inseto hospedeiro. Entretanto, na presença do CfMNPV, o vírus CfDefNPV pode infectar larvas hospedeiras de *C. fumiferana per os* (Lauzon, *et alli*, 2005). Os dois vírus são considerados espécies distintas após análise com endonuclease de restrição e estudos de hibridização cruzada. O genoma do *C. fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV) possui 131.160 pb e

apresenta 149 ORFs (Lauzon, *et alli*, 2005). Enquanto o genoma do CfMNPV consiste em 129.593 pb apresentando um total de 146 ORFs (Jong *et alli*, 2005).

Após o seqüenciamento completo do genoma do baculovírus AgMNPV, a sua análise inicial revelou que esse vírus possui uma maior identidade de seqüência e organização genômica, com o vírus *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV). Um dos fatores interessantes do genoma viral do AgMNPV está na ausência dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*), que por sua vez estão presentes no genomas dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV, entre outros (Oliveira *et alli*, 2006).

## 2.8 Genes virais quitinase e catepsina

Os genomas dos baculovírus codificam genes auxiliares que não são essenciais para a replicação, porém conferem vantagem seletiva ao vírus. Uma vez que os baculovírus replicam seu genoma dentro do núcleo das células do hospedeiro, eles estão susceptíveis a adquirir seqüências de nucleotídeos a partir do hospedeiro. Sendo assim, alguns dos genes auxiliares existentes, como por exemplo, *iap*, *egt*, *ptp*, *fibroblast growth factor (v-fgf)*, *ubiquitin (v-ubi)* e *superoxide dismutase (v-sod)*, podem ter sido adquiridos a partir do inseto hospedeiro pela transferência horizontal de genes (Hughes, *et alli*, 2003).

Alguns estudos demonstram que os genes auxiliares são utilizados para controlar a fisiologia, o desenvolvimento e o comportamento do inseto hospedeiro (O'Reilly *et alli*, 1997), por exemplo, os genes *iap* (inibidor de apoptose) bloqueia a resposta apoptótica das células do hospedeiro infectadas (Clem *et alli*, 1991), o gene *egt* inativa alguns hormônios

do inseto hospedeiro (O'Reilly & Miller, 1989) e o gene *ptp* induz um comportamento diferente, com relação ao esforço da atividade locomotora exercida pelas larvas infectadas que ocorre na fase tardia da infecção (Kamita *et alli*, 2005).

Outros exemplos de genes auxiliares que conferem uma vantagem seletiva para os baculovírus são os genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*) (Daimon *et alli*, 2006), encontrados na sequência genômica dos baculovírus *EppoNPV*, *OpMNPV*, *AcMNPV*, *RaouMNPV*, *BmNPV*, *CfMNPV*, *HycuNPV*, *CfDefNPV* e *AnpeNPV* pertencentes ao grupo I do gênero NPV, com exceção do baculovírus *AgMNPV*, que apresenta no seu genoma a ausência de uma região de 3.0 pares de quilobases (pKbs) conservada a montante (*downstream*) ao gene *gp64* (Slack *et alli*, 2004). A expressão do gene quitinase de *AcMNPV* ocorre na fase tardia da replicação do vírus e em conjunto com a catepsina viral promove a liquidação ou derretimento do corpo do hospedeiro nos estágios tardios da infecção (Hawtin *et alli*, 1997). A ausência dos genes quitinase e catepsina no genoma do *AgMNPV* podem ser responsáveis pela larva infectada com o baculovírus *AgMNPV* não apresentar a característica de liquidação do corpo da larva logo após sua morte.

Alguns patógenos de insetos, tais como os baculovírus, produzem quitinases para dissolver ou liquefazer o corpo do inseto hospedeiro depois da morte provocada pela infecção viral (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Enzimas quitinolíticas, como a quitinase, catalisam a hidrólise de quitina, um polissacarídeo formado por polímeros de  $\beta$ -1, 4-N-acetyl-D-glucosamina. Um estudo imunohistoquímico da quitinase de *C. fumiferana* (Zheng *et alli*, 2003), um ortólogo da quitinase de *M. sexta* e de *B. mori*, revelou que a quitinase participa da degradação da quitina durante o processo de muda dos insetos (Merzendorfer & Zimoch, 2003).

Acredita-se que a liquificação do tecido do inseto hospedeiro após a morte facilita a dispersão da progênie viral no meio ambiente (Federici, 1997) e vários estudos indicam a identificação que dois produtos de genes virais, codificados por algumas espécies de baculovírus, que são essenciais para promover esse processo de liquificação: uma quitinase (*chiA*) e uma cisteína protease (*v-cath*) (Slack *et alli*, 1995; Hawtin *et alli*, 1997).

O gene *chiA*, presente no genoma dos baculovírus AcMNPV e BmNPV são essenciais para induzir a liquificação terminal da larva infectada com baculovírus somente após a morte da larva (Hawtin *et alli*, 1997; Wang *et alli*, 2005). Acredita-se que esse sintoma promova a transferência horizontal da progênie do vírus na natureza (O'Reilly, *et alli*, 1997; Hawtin *et alli*, 1997). Katsuma *et alli* (2004) observaram que não houve liquificação das larvas *B. mori* infectadas quando o gene *chiA* foi deletado do genoma do baculovírus BmNPV, indicando que *chiA* é um gene essencial para promover a liquificação terminal do hospedeiro. Desta forma, esses estudos indicam que o produto do gene *chiA* está envolvido na degradação da cutícula do hospedeiro durante o processo de liquificação do hospedeiro (Hawtin *et alli*, 1997). Em suporte a esta hipótese, AcMNPV apresentando mutações nos resíduos do sítio ativo de V-CHIA apresenta menor habilidade para liquificar a larva (Thomas *et alli*, 2000).

O gene *chiA* do AcMNPV apresenta ambas atividades exo e endo quitinase (Hawtin *et alli*, 1997) e está localizada no retículo endoplasmático (RE) de células de insetos devido a presença de um motivo de retenção (KDEL) C-terminal. Segundo Thomas *et alli* (2000), a atividade quitinolítica do *chiA* do AcMNPV é essencial para causar a liquificação do hospedeiro e a deleção deste motivo KDEL resultou na secreção inicial da enzima a partir de células infectadas (Saville *et alli*, 2002).

Uma hipótese atual da origem dos genes *chiAs* é que eles foram transferidos horizontalmente a partir de bactérias para os baculovírus. Essa hipótese é baseada em estudos feitos a partir de suas estruturas e filogenia (Hawtin *et alli*, 1995; Hughes *et alli*, 2003). Entretanto, recentemente identificaram um ortólogo de *chiA*, o BmChi-h, a partir da larva *Bombyx mori* apresentando alta homologia entre as seqüências do V-CHIA (63 % de identidade com CHIA do AcMNPV) e quitinase de bactérias (73 % de identidade com *chiA* de *Serratia marcescens*) (Daimon *et alli*, 2003). BmChi-h está envolvido na degradação da quitina durante o processo de infecção e estes ortólogos são altamente conservados entre os insetos de lepidópteras (Daimon *et alli*, 2006).

Outra proposta funcional do gene *chiA* do AcMNPV está no auxílio em processar uma cisteíno protease, denominada catepsina (V-CATH), codificada pelo vírus (Hom *et alli*, 2002). Os genes *v-cath* codificam uma cisteíno protease do tipo papaína com alta homologia de seqüência a uma cisteíno protease lisossomal, catepsina L. (Ohkawa *et alli*, 1994; Slack *et alli*, 1995). O produto do gene *v-cath* do AcMNPV tem 35,5 kDa e uma forma precursora de 32 kDa (pro-V-CATH) que são ambas processadas a uma forma madura de 27,5 kDa de forma similar a catepsina L (Slack *et alli*, 1995). Entretanto, Hom e Volkman (2000) encontraram que, na ausência do gene *v-chiA* no genoma do AcMNPV, proV-CATH não é processada na forma madura, formando agregados insolúveis dentro de células infectadas.

Estudos comprovaram que mutantes de BmNPV e AcMNPV, incapazes de produzir V-CATH, também não causam a liquificação terminal do inseto hospedeiro (Ohkawa *et alli*, 1994; Slack *et alli*, 1995; Daimon *et alli*, 2006).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo Geral

Considerando que a maioria dos baculovirus NPV possui em seu genoma os genes da catepsina e quitinase e diante da importância da ação dessas proteínas na interação vírus e hospedeiro resultando na liquefação final do inseto e em maior disseminação da progênie viral, o presente trabalho propõe construir vírus recombinantes com base na inserção dos genes *v-chiA* e *v-cath* dos vírus CfDefNPV e AcMNPV no genoma do AgMNPV e avaliar a capacidade desses vírus recombinantes em promover a liquefação de larvas de *A. gemmatalis* infectadas.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Clonagem dos genes quitinase e catepsina dos baculovírus AcMNPV e CfDefNPV no vetor de transferência p2100;
- Clonagem individual dos genes quitinase e catepsina, tanto do AcMNPV quanto do CfDefNPV, nos vetores pGEM T-easy e pAgGal;
- Construção do vírus recombinantes *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* pela co-transfecção do DNA do plasmídeo p2100Cf.*v-chiA/v-cath* com o DNA do vírus recombinante *vAgGalA2*, separadamente em cultura de células de inseto;

- Análise transcricional dos genes heterólogos do vírus recombinante vAgp2100Cf.*chiA/v-cath* e via RT-PCR;
- Análise dos efeitos causados pelo vírus recombinante vAgp2100Cf.*chiA/v-cath* em larvas de *A. gemmatalis* com base na determinação de parâmetros de mortalidade (bioensaios);
- Ensaios enzimáticos para avaliar a atividade enzimática da enzima quitinase e de cisteíno-proteases (catepsina);

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Vírus, células e insetos

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, duas linhagens celulares derivadas de insetos foram utilizadas: células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (Granados *et alli*, 1994) foram infectadas com o baculovírus selvagem AcMNPV L-1 (Lee & Miller, 1978) e outra linhagem celular proveniente das células de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth & Maruniak, 1988) foram utilizadas para propagar o baculovírus selvagem *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV, isolado 2D) (Johnson & Maruniak, 1989) assim como, os vírus recombinantes vAgGalA2, construído a partir do AgMNPV, caracterizando-se pela presença do gene repórter *lacZ* comandado pelo promotor da poliedrina (*polh*) (Ribeiro *et alli*, 2001) e o vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* (construído neste trabalho). As células foram conservadas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mantidas a 26° C.

Lagartas *A. gemmatalis* (Hübner, 1818) foram utilizadas no presente trabalho para amplificar o vírus selvagem (AgMNPV) e o vírus recombinante construído (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*), bem como para a realização de bioensaios e de ensaios enzimáticos. As larvas foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Elita Batista de Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN).

## 4.2. Purificação do DNA de BV em larga escala

Os vírus purificados durante o desenvolvimento do trabalho foram os vírus selvagens AcMNPV e AgMNPV e os vírus recombinantes vAgGalA2 e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*. A purificação do DNA dos vírus utilizados foi realizada de acordo com o procedimento descrito em O'Reilly *et alli* (1992) detalhado a seguir:

Foram colocados 30 mL do vírus em um tubo de ultracentrífuga (pollyalomer, Beckman) de 38 mL. Foram acrescentados 3 mL de colchão de sacarose 25 % no fundo do tubo e completou-se com PBS (Tris-HCL 1 M, pH 7,5; NaCl 5 M). Este material foi centrifugado a 24.000 r.p.m. por 75 min a 4° C no rotor SW28 (Beckman L8-70 M). Em seguida, o sobrenadante foi descartado removendo-se os traços de sacarose. Acrescentou-se 1 mL de tampão *virus disruption buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 0,25% SDS) e o sedimento foi ressuspensão cuidadosamente por pipetagem. Acrescentou-se proteinase K (500 µg/ml) e incubou-se a 37° C por no mínimo 16 h.

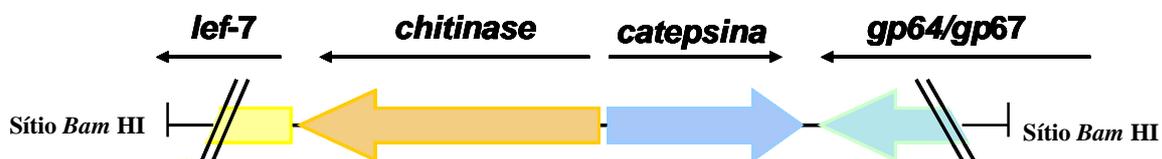
Quando a solução clareou, purificou-se o DNA viral adicionando o mesmo volume do sobrenadante (v/v) da solução de fenol: clorofórmio (24:1), seguido de centrifugação a 14.000 r.p.m. por 5 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C). O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo microtubo. Foi adicionado ao sobrenadante a mesma quantidade de clorofórmio, centrifugando novamente a 14.000 r.p.m. por 5 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C). O sobrenadante foi transferido para em um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se ao sobrenadante 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 5.2), 2x o volume de etanol absoluto para precipitar o DNA viral extraído, e incubado a -80° C durante 1 h. Na seqüência, a amostra foi centrifugada a 14.000 r.p.m. por 30 min e o

sedimento lavado com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %, seguido de uma nova centrifugação de 14.000 r.p.m. por 5 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C). Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água “milli-Q”.

### **4.3 Construção do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA*/v-*cath***

Células de *T. ni* (BTI-Tn5B1-4),  $5 \times 10^6$ / placa de 100 mm, foram infectadas com o baculovírus selvagem AcMNPV, 10 unidades formadoras de placas (pfu) / célula, e incubadas a 26° C. Após cinco dias de infecção, o sobrenadante da cultura de células foi removido para extração do DNA de BV produzidos. Após extração e purificação do DNA do vírus selvagem AcMNPV, de acordo com o procedimento detalhado no item 4.2, fez-se uma digestão utilizando a enzima de restrição *Bam*HI (Invitrogen) com o objetivo de retirar as regiões flanqueadoras dos genes quitinase e catepsina presentes no genoma do vírus selvagem AcMNPV (Figura 9). Para uma reação de digestão contendo um volume final de 30  $\mu\text{L}$  foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  do DNA purificado (cerca de 100  $\eta\text{g}$ ), 3  $\mu\text{L}$  do tampão 10X React 3 (Invitrogen), 2 U da enzima *Bam*HI e 16  $\mu\text{L}$  de água “milli-Q”. Em seguida, o sistema de digestão foi incubado a 37° C durante 3 h.

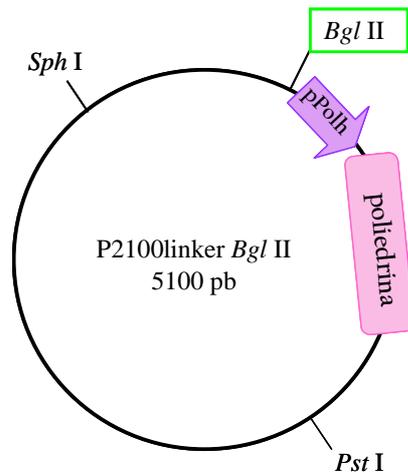
## AcMNPV



**Figura 9:** Organização dos genes quitinase e catepsina no genoma do baculovírus AcMNPV. O esquema mostra as ORF dos genes quitinase e catepsina e dos genes *lef-7* e *gp64/gp67*, localizados a montante (*lef-7*) e a jusante (*gp64/gp67*) aos genes quitinase e catepsina, respectivamente. Os sítios de restrição *Bam*HI estão localizados no meio dos genes *lef-7* e *gp64* e por isso os genes foram interrompidos.

Pela análise de eletroforese em gel de agarose 0.8 % (Sambrook *et alli*, 1989) foi possível observar o perfil eletroforético do DNA viral digerido com a enzima *Bam*HI. O fragmento de 3.300 pares de bases (pb), referente ao tamanho do *cassete* foi retirado do gel de agarose, eluído e purificado de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) e então, quantificado em gel de agarose 0.8 %.

O plasmídeo p2100 (Hallwass, 2005) contém um fragmento de DNA de 2.100 pb do locus da poliedrina do baculovírus selvagem AgMNPV (figura 10).



**Figura 10:** Plasmídeo p2100linkerBglII. Mapa do plasmídeo p2100, mostrando o promotor (pPolh) e o gene da poliedrina, assim como os sítios de restrição *Pst*I, *Sph*I. Em verde, sítio de restrição *Bgl*III escolhido para clonagem do *cassete* contendo os genes *v-chiA* e *v-cath*.

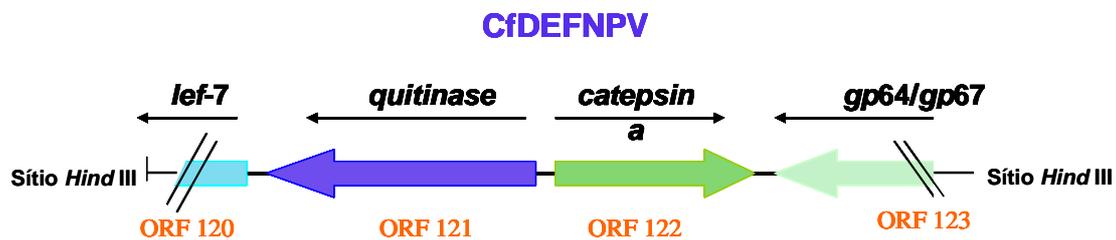
Com o fragmento purificado dos genes quitinase e catepsina foi realizada uma reação de ligação com o vetor de transferência p2100 contendo um linker *Bgl*III (Hallwass, 2005), previamente digerido com a enzima de restrição *Bgl*III (Promega), segundo instruções do fabricante e seguido da reação de desfosforilação com a enzima CIAP – Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Sabendo que os sítios para as enzimas *Bam*HI (5'G↓GATCC3') e *Bgl*III (5'A↓GATCT3') apresentam compatibilidade de ligação, a reação de ligação foi realizada utilizando 6 µL do *cassete* purificado (cerca de 200 ng), 1 µL do tampão de ligação 10 X, 2 µL do vetor p2100linker *Bgl*III (aproximadamente 50 ng) e 0,01 U da enzima de ligação T4 DNA ligase (Promega).

A ligação foi utilizada para transformação, em células competentes da cepa *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen), utilizando o método de choque-térmico de acordo com o protocolo de transformação bacteriana, descrito por Sambrook *et alli* (1989). O plasmídeo

p2100 contém o gene de resistência a ampicilina, possibilitando assim, a seleção dos clones positivos pela presença do antibiótico ampicilina (100 µg/mL). A bactéria contendo o plasmídeo de interesse, denominado p2100Ac.v-*chiA*/v-*cath*, foi cultivada em meio L-Broth (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e H<sub>2</sub>O destilada) seguido da extração do DNA plasmidial em larga escala de acordo com o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook *et alli* (1989).

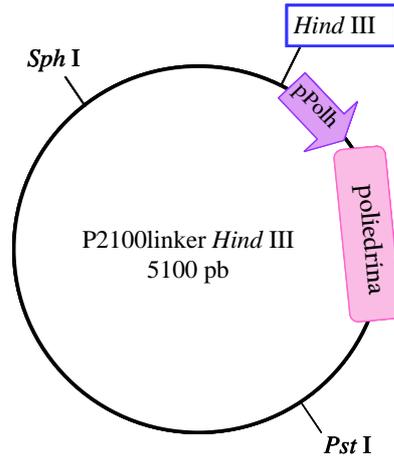
#### **4.4 Construção do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath***

O plasmídeo pCfDefNPV*HindIII*Q, gentilmente cedido pelo Dr. Arif Basil (Natural Resources Canadá), após digerido com a enzima de restrição *HindIII* (Promega), apresentou um fragmento com tamanho de 3,236 pb que contém as ORFs completas dos genes quitinase e catepsina e regiões flanqueadoras a montante e a jusante. (Figura 11). Para uma reação de digestão com a enzima de restrição *HindIII* contendo um volume total de 66 µL utilizamos 50 µL do DNA purificado (aproximadamente 150 ng), 5 µL do tampão 10 X H (Promega), 5 µL de BSA 10 X, 1 U da enzima *HindIII* e 5 µL de água “milli-Q”. Em seguida, o sistema de digestão foi incubado a 37° C durante 3 h.



**Figura 11:** Organização dos genes quitinase e catepsina no genoma do baculovírus CfDefNPV. O esquema apresenta as ORF completas dos genes quitinase e catepsina, assim como as regiões montante do gene quitinase e a extremidade do gene *gp64* a montante do gene catepsina. Os sítios de restrição *Hind*III estão localizados no meio dos genes *lef-7* e *gp64* e por isso os genes foram interrompidos.

Pela análise em eletroforese em gel de agarose 0.8 % da digestão do plasmídeo pCfDefNPV*Hind*IIIQ, foi possível observar o perfil eletroforético do DNA viral digerido com a enzima *Hind*III. O fragmento liberado de 3,200 pb foi retirado do gel de agarose, eluído e purificado de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), seguido da análise de quantificação do *cassete* purificado para posterior reação de ligação no vetor de transferência p2100linker*Hind*III (figura 12).



**Figura 12:** Plasmídeo p2100linkerHindIII. Mapa do plasmídeo p2100, mostrando o promotor (pPolh) e o gene da poliedrina, assim como os sítios de restrição *Pst*I, *Sph*I. Em azul, sítio de restrição *Hind*III escolhido para clonagem do *cassete* contendo os genes *v-chiA* e *v-cath*.

Para facilitar a clonagem direta do *cassete* gênico purificado no vetor de transferência p2100linkerHindIII, foi introduzido no vetor p2100 um sítio de restrição da enzima *Hind*III. Primeiramente, o plasmídeo p2100 foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RV, seguido da desfosforilação e ligado ao Linker *Hind*III (BioLabs), de acordo com as instruções do fabricante. Na seqüência, a ligação foi utilizada para transformação bacteriana por choque térmico, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et alli*. (1989). Alguns clones positivos, contendo o plasmídeo p2100 com o sítio de restrição *Hind*III, foram selecionados. Para confirmar a clonagem do sítio de restrição *Hind*III no plasmídeo p2100, este foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III e o perfil de restrição foi analisado em gel de agarose 0.8 %, corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL).

Após confirmação da construção do vetor p2100linkerHindIII, o vetor foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III seguido de desfosforilação com a enzima CIAP – Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e uma reação de ligação foi preparada utilizando 3 µL do *cassete* gênico purificado (cerca de 100 ng), 1 µL do tampão de ligação 10 X, 3 µL do vetor p2100linkerHindIII e 0,01 U da

enzima de ligação T4 DNA ligase (Promega).

A ligação foi utilizada para transformação bacteriana utilizando o método de choque-térmico de acordo com o protocolo de transformação bacteriana, descrito por Sambrook *et alli*. (1989). O plasmídeo recombinante foi denominado p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e a bactéria contendo esse plasmídeo foi cultivada em meio L-Broth, seguido da extração do DNA plasmidial em larga escala de acordo com o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook *et alli* (1989).

#### **4.5 Construção dos vetores pGEMAc.v-*chiA*, pGEMAc.v-*cath*, pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath***

Para analisar separadamente o efeito causado pelos genes quitinase e catepsina, tanto do AcMNPV quanto do CfDefNPV, foram preparadas PCR, com o DNA purificado de cada vírus, utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada gene, desenhados para esse trabalho e citados na tabela 1.

Quatro reações foram feitas utilizando os pares de oligonucleotídeos QUITCfF/QUITCfR e CATHCfF/CATHCfR para amplificar os genes quitinase e catepsina do CfDefNPV, assim como os pares de oligonucleotídeos QUITAcF/QUITAcR e CATHAcF/CATHAcR para amplificar os genes do AcMNPV. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 50 µl, contendo 41,2 µl de água “milli-Q”, 5,0 µl de tampão 10 X (Invitrogen), 1,5 µl de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM) da Integrated DNA Technologies (IDT), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA (aproximadamente 10 ηg). As amplificações

foram efetuadas em termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) programado para 30 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência:

- Desnaturação inicial a 95° C por 5 min;
- Ciclo de amplificação: desnaturação a 95° C por 1 min 30 s; anelamento a 56° C por 1 min 30 s; extensão a 72° C por 1 min 30 s;
- Extensão final a 72° C por 7 min;

Pela análise em eletroforese em gel de agarose 0.8 % das PCR, foi possível observar o perfil eletroforético dos DNAs amplificados. Os fragmentos amplificados foram retirados do gel de agarose, eluídos e purificados de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extration Kit (Invitrogen). Após purificação dos fragmentos contendo os genes quitinase e catepsina do AcMNPV e do CfDefNPV fez-se uma reação de ligação entre os genes e o vetor pGEM-T®easy (Promega), de acordo com o protocolo de instruções do fabricante, e os vetores resultantes foram então usados na transformação de células de *E. coli* DH5α (Invitrogen) utilizando o método de choque-térmico (Sambrook *et alli*, 1989), seguido da extração do DNA plasmidial em larga escala de acordo com o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook *et alli*, (1989).

Para confirmar a clonagem dos genes no vetor pGEM-T®easy, fez-se a digestão dos plasmídeos pGEMAc.v-*chiA*, pGEMAc.v-*cath*, pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath* com as enzimas *Bgl*III e *Bam*HI, pois na construção do oligonucleotídeos foram inseridos sítios de restrição para essas enzimas em cada extremidade.

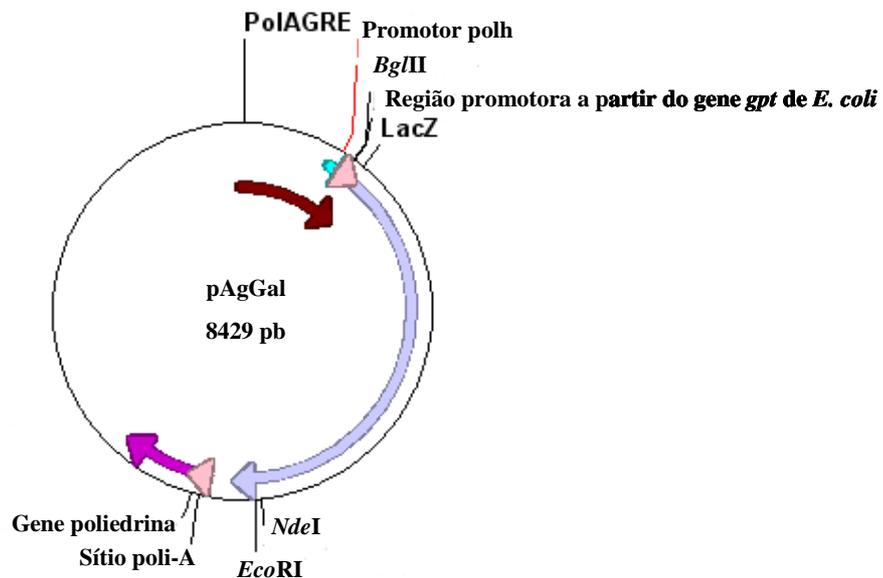
**Tabela 1:** Oligonucleotídeos usados nas PCR para detecção dos genes quitinase e catepsina no DNA dos plasmídeos

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	(*) Posição
<i>Quitinase</i>	QUITCf F	AGATCTATGGTGCACCTATTTGGTAAAAG	28 nt a partir do ATG do gene quitinase
	QUITCf R	GGATCCAAAACCTGACGCATGTCTAAAAACAGCAC	- 187 nt a partir do códon de terminação do gene quitinase
	QUITAc F	AGATCTATGTTGTACAAATTGTTAAACGTTTTGTGG	36 nt a partir do ATG do gene quitinase
	QUITAc R	GGATCCAAATACTGCAGAATCGTG	-134 nt a partir do códon de terminação do gene quitinase
<i>Catepsina</i>	CATHCf F	AGATCTATGAACAAAATTGTGTTGTATTTGTTAATT	36 nt a partir do ATG do gene catepsina
	CATHCf R	GGATCCACCTTCTTTTTGACAGTAGGCATAATTGTG	-157 nt a partir do códon de terminação do gene catepsina
	CATHAc F	AGATCTATGAACAAAATTTTGTGTTTATTTGTTTGTGTACGGCG	43 nt a partir do ATG do gene catepsina
	CATHAc R	GGATCCAAATAGCGAGTGTGTTGAGATT	-28 a partir do códon de terminação do gene catepsina

\* Posição dos oligonucleotídeos em relação ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

#### 4.6 Construção dos vetores de transferência pAgGalAc.v-*chiA*, pAgGalAc.v-*cath*, pAgGalCf.v-*chiA* e pAgGalCf.v-*cath*

Para analisar o efeito dos genes quitinase e catepsina separadamente, tanto em cultura de células quanto em larvas de *A. gemmatalis*, vetores de transferência foram construídos utilizando o plasmídeo pAgGal (Ribeiro *et alli*, 2001), que contém o gene  $\beta$ -galactosidase sob o comando dos promotores *guanosina phosphoribosyl transferase* (*gpt*), derivado de *E. coli*, e da poliedrina (*polh*) derivada do baculovírus AgMNPV (figura 13).



**Figura 13:** Mapa do plasmídeo pAgGal mostrando a localização do promotor da poliedrina assim como a localização da região promotora do gene *gpt* antes do gene da  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*).

Para isso, foram realizadas duplas digestões, primeiramente a digestão do plasmídeo pAgGal com a enzima de restrição *BglIII* seguido da digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, assim como a digestão do pAgGal com as enzimas *BglIII* e *NdeI*. Em seguida, os plasmídeos construídos pGEMAc.v-*chiA*, pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath* foram

digeridos com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Eco*RI e o plasmídeo pGEMAc.v-*cath* digerido com as enzimas *Bgl*III e *Nde*I. Os fragmentos liberados pela digestão dos plasmídeos foram extraídos do gel de agarose e purificados de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extration Kit (Invitrogen).

Em seguida, foi feita a clonagem de cada fragmento gênico purificado, separadamente, no vetor de transferência pAgGal. A confirmação da clonagem se deu pela PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada gene (citados na tabela 1) e o mesmo programa, detalhado anteriormente, foi utilizado.

#### **4.7 Confirmação da construção dos plasmídeos p2100Ac.v-*chiA/v-cath* e p2100Cf.v-*chiA/v-cath***

O plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath* foi digerido com a enzima de restrição *Pst*I (Promega) para confirmar a clonagem e a orientação dos genes visualizado pela análise do perfil de restrição em gel de agarose 0.8 %, corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL). Uma PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes quitinase e catepsina do baculovírus AcMNPV (tabela 01), desenhados a partir da seqüências dos genes depositados no banco de dados (Acesso ao GenBank # L22858), foi conduzida para confirmar a inserção dos genes no plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath*.

Para confirmar a clonagem dos genes quitinase e catepsina no plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath* fez-se a digestão com a enzima de restrição *Hind*III (Promega) liberando um fragmento de 3.236 pb, correspondente ao tamanho do *cassete* gênico contendo os genes quitinase e catepsina, visualizado no gel de agarose 0.8 %, corado com

brometo de etídio (0,5 µg/mL). Além da digestão, uma PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes quitinase e catepsina do baculovírus CfDefNPV (Tabela 1), desenhados a partir da seqüência dos genes depositados no banco de dados (Acesso ao GenBank # AY327402), foi conduzida para confirmar tanto a inserção dos genes como a sua orientação no plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath*.

O programa utilizado na PCR para a amplificação dos genes foi o mesmo para ambos os plasmídeos construídos:

- Desnaturação inicial a 95° C por 5 min;
- Ciclo de amplificação: desnaturação a 95° C por 1 min 30 s; anelamento a 56° C por 1 min 30 s; extensão a 72° C por 1 min 30 s;
- Extensão final a 72° C por 7 min;

#### **4.8 Construção do baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath***

Após clonagem dos genes, o plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath* foi co-transfectado com o vírus recombinante vAgGalA2 em cultura de células UFL-AG-286 com 1 µg de DNA dos plasmídeos e 0,5 µg do DNA do vírus recombinante vAgGalA2 utilizando uma solução de lipossomos (Cellfectin, Invitrogen). Uma placa de 35 mm de diâmetro foi previamente preparada com células UFL-AG-286 ( $1 \times 10^6$  células) e incubada por 1 h, para aderência das células. Em seguida o DNA plasmidial e viral foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro em um microtubo. Dez microlitros de lipossomos foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura de células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos e a placa incubada a temperatura ambiente por 5 h. Após esse

período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10 % de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 26° C. Sete dias após a co-transfecção, o sobrenadante das células transfectadas foi usado para isolar o baculovírus AgMNPV recombinante (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*) pelo método de diluição em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly *et alli* (1992). Sete ciclos de isolamento em placa de 96 poços foram necessários para o isolamento do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*.

O plasmídeo p2100Ac.v-*chiA*/v-*cath* também foi co-transfectado com o vírus recombinante vAgGalA2 em cultura de células UFL-AG-286 com 1 µg do DNA do plasmídeo e 0,5 µg do DNA do vírus recombinante vAgGalA2 utilizando uma solução de lipossomos (Cellfectin, Invitrogen) e seguindo o procedimento detalhado anteriormente.

#### **4.9 Confirmação da introdução dos genes *v-chiA* e *v-cath* no DNA genômico do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath***

Foram utilizadas duas estratégias para confirmar a construção do baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*: uma pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a outra pela técnica de hibridização *Southern blot*.

##### **4.9.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica de PCR foi usada para identificação dos genes quitinase e catepsina presentes no DNA genômico do vírus recombinante construído, vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Para detecção dos genes foram utilizados os mesmos pares de oligonucleotídeos

sintéticos desenhados a partir da seqüência dos genes quitinase e catepsina depositados no banco de dados, descrito no item 4.5.

Duas reações foram feitas utilizando os pares de oligonucleotídeos QUITCfF/QUITCfR e CATHCfF / CATHCfR. As reações de amplificação consistiram de um volume final de 25 µl, contendo 16,2 µl de água “milli-Q”, 2,5 µl de tampão 10 X (Invitrogen), 1,5 µl de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM) da Integrated DNA Technologies (IDT), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA (20 ηg). As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) programado para 30 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência:

- Desnaturação inicial a 95° C por 5 min;
- Ciclo de amplificação: desnaturação a 95° C por 1 min; anelamento a 56° C por 1 min e 30 s; extensão a 72° C por 1 min e 30 s;
- Extensão final a 72° C por 7 min;

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 10 µl do tampão de amostra (0,25 % azul de bromofenol (p/v), 0,25 % xileno cianol (p/v) e 30 % glicerol (v/v) em H<sub>2</sub>O). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8 %, submerso em tampão de corrida TBE 0,5 X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). Marcador de massa molecular conhecido (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) foi colocado na extremidade do gel como padrão para determinar o tamanho dos fragmentos gerados. Ao término da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (5·µg/ml).

#### **4.9.2 Construção de sonda não-radioativa**

O DNA purificado do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath* foi utilizado para preparar uma sonda não-radioativa com o “DIG DNA Labelling and Detection Kit” (Boehringer Mannheim), segundo orientações do fabricante. O par de oligonucleotídeos usado para preparar a sonda foram QUITCfF e QUITCfR, citado na tabela 1. Este sistema de marcação usa digoxigenina (DIG) acoplada a dUTP para marcar DNA, RNA ou oligonucleotídeos para hibridização e subsequente imunodeteção. Para preparar a sonda, uma PCR foi feita em um volume total de 100 µl, contendo 73,7 µl de água “milli-Q”, 10,0 µl de tampão 10 X (Invitrogen), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen); 10,0 µl de mistura de dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP e DIG-dUTP) a 1 mM, 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA (20 ng). As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400), programado para 30 ciclos, de acordo com as etapas descritas anteriormente no item 4.9.1.

#### **4.9.3 Hibridização não-radioativa do perfil de restrição viral e plasmidial**

Primeiramente, um gel de agarose 0.7 % foi carregado com o DNA viral purificado do vírus selvagem AgMNPV e recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* e do DNA plasmidial do p2100Cf.v-*chiA/v-cath* digeridos com a enzima de restrição *HindIII*. Após a corrida eletroforética as frações de DNA foram fotodocumentadas com brometo de etídeo (5 µg/ml) e posteriormente transferido para uma membrana de náilon (Sigma 0,2 µm)

utilizando-se um aparelho Hybaid Vacu-Aid (Hybaid), conforme instrução do fabricante.

O gel foi tratado com solução depurinadora (HCl 0,2 M) por 10 min. O excesso de solução foi retirado e, em seguida, tratou-se com solução desnaturante (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 20 min. Retirou-se o excesso de solução e tratou-se com solução neutralizadora (Tris HCl pH 7,4 1 M e NaCl 1,5 M) por 20 min. Novamente, retirou-se o excesso de solução, para então acrescentar a solução SSC 10 X (NaCl 150 mM; citrato de sódio 15 mM, pH 7,2) permanecendo por 1 h. Terminando o processo, fez-se a fixação da membrana pela exposição à luz UV por 15 min para cada lado da membrana.

A membrana foi hibridizada com sonda não-radioativa específica para o gene quitinase. A hibridização foi feita segundo protocolo do DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer mannheim), com algumas modificações: a membrana foi imersa em solução SSC 2X, enrolada e colocada no cilindro do forno de hibridização Hybaid com um pouco da mesma solução. Retirou-se a solução SSC 2 X e adicionaram-se 50 mL de tampão de hibridização pré-aquecido a 42° C. Levou-se ao forno de hibridização e fez-se a pré-hibridização a 60° C por 30 min, sob suave agitação.

A sonda (aproximadamente 200 ng de DNA) foi desnaturada a 100° C, por 5 min, e imediatamente incubada no gelo. Acrescentou-se ao cilindro, a sonda desnaturada. A hibridização foi realizada a 60° C, por 24 h sob suave agitação. A membrana foi lavada duas vezes com SSC 2 X-SDS 0,1 %, à temperatura ambiente, por 5 min e duas vezes com SSC 0,1 X-SDS 0,1% a 68° C, por 15 min, sob agitação constante. Para detecção a membrana foi lavada com tampão de lavagem (ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,3 % (v/v), pH 7,5) por 5 min e incubada por 30 min em solução bloqueadora 1 X. O anti-DIG-AP conjugado foi diluído para 75 U/mL (1:10.000) em 20 mL de solução bloqueadora 1 X e a membrana incubada por 30 min nesta solução. Em seguida, lavou-se duas vezes por 15 min

em tampão de lavagem e equilibrou-se por 5 min em tampão de detecção. A membrana foi incubada em solução de coloração fresca, no escuro, sem agitação. Após obtida a intensidade desejada das bandas (1-3 h), a reação foi parada lavando-se com água destilada.

#### **4.10 Análise transcricional (RT-PCR) dos genes *v-chiA* e *v-cath* em células de inseto infectadas com o vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath***

Células UFL-AG- 286 ( $5 \times 10^6$  células/placa de 100 mm) foram infectadas com 10 pfu / célula do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e a 72 h p.i., as células foram coletadas e centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 5 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se às células 375 µL de Trizol, um fenol ácido, (Invitrogen) para extração do RNA, seguindo recomendações do fabricante (Gibco-BRL). Em seguida, o tubo foi invertido cinco vezes e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Adicionou-se 100 µL de clorofórmio e misturou rigorosamente durante 15 segundo, armazenando durante 5 min a temperatura ambiente.

A amostra foi centrifugada 14.000 r.p.m. por 15 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C) e o sedimento lavado com etanol 70 %, onde foi centrifugado a 14.000 r.p.m. por 2 min (microcentrífuga Eppendorf, 5415 C). O etanol foi descartado e o sedimento permaneceu no gelo até secar. Em seguida, a amostra foi ressuspensa em 22 µL de água “milli-Q” que sofreu tratamento prévio com 0,01 % (v/v) dietilpirocarbonato (DEPC) durante 16 h para em seguida a solução de água com DEPC ser autoclavada, tornando a água livre de RNAses.

Na seqüência, preparamos uma mistura para a obtenção do cDNA utilizando o kit

M-MLV-RT (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, contendo 10  $\mu\text{L}$  do RNA extraído anteriormente, 1  $\mu\text{L}$  dNTP 10 mM e 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) do oligonucleotídeos T1 (que se anela na cauda poli-A) (Tabela 2), para um volume final de 12  $\mu\text{L}$ . Incubou-se em banho-maria a 65° C por 5 min e posteriormente no gelo por 3 min. Em seguida, foi adicionado 4  $\mu\text{L}$  do tampão 5 X (Promega - enzima ImProm-2); 2  $\mu\text{L}$  de 0.1 M DTT (agente redutor); 1  $\mu\text{L}$  de inibidor específico para RNase 24,800 U/mL; 0,4 U da enzima Transcriptase reversa 2,5 U/ $\mu\text{L}$ , para obter um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A amostra foi incubada durante 1 h a 37° C. Após incubação a 37° C, a enzima foi desativada a 70° C por 15 min em banho-maria e posteriormente armazenada no freezer -80° C, até o momento de uso.

Foi preparada, então, uma PCR, a partir do cDNA, para um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2,5  $\mu\text{L}$  de Tampão 10 X (Invitrogen); 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM (Invitrogen); 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP; 1,0  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) oligonucleotídeos T2 (que possui seqüência idêntica aos 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1) como oligonucleotídeo reverso (Tabela 2), 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) oligonucleotídeos específico para RT-PCR (Tabela 2); 1,0  $\mu\text{L}$  de cDNA e 17,5  $\mu\text{L}$  de água “milli-Q”.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos usados nas PCR para construção do cDNA e para detecção do RNAm dos genes quitinase e catepsina no DNA do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	(*) Posição
<i>Quitinase</i>	RTQUITCf	CGGATTACGCTGTTAAATCGCT	422 nucleotídeos antes do códon de terminação do gene quitinase
	RTQUITAc	TACACACTACGCTGTCGATGCGT	424 nucleotídeos antes do códon de terminação do gene quitinase
<i>Catepsina</i>	RTCATHCf	TACGAGGCCGTCATGAACAT	416 nucleotídeos antes do códon de terminação do gene catepsina
	RTCATHAc	AGCGTTCGAAGCCATCATT	426 nucleotídeos antes do códon de terminação do gene catepsina
	T1	CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTT TTTTTT	Cauda Poli-A
	T2	CCTGCAGGATCCTTAGGTT	Equivalente aos 19 primeiros nucleotídeos do T1

\* Posição dos oligonucleotídeos em relação ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin elmer (GeneAmp PCR System 2400), programado para 31 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência:

- Desnaturação inicial a 95° C por 2 min;
- Ciclo de amplificação: Desnaturação a 95° C por 1 min; Anelamento a 56° C por 1 min 30 s; extensão a 72° C por 1 min 30 s;
- Extensão final a 72° C por 5 min;

Para confirmar a especificidade dos genes *v-chiA* e *v-cath*, os fragmentos amplificados por PCR foram purificados do gel de agarose e submetidos a uma nova PCR

utilizando pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene (RTQUITCf e QUITCf R e RTCATHCf e CATHCf R).

#### **4.11 Purificação dos corpos de oclusão (OB) a partir de insetos infectados com AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* seguido da contagem dos OB purificados**

Larvas de *A. gemmatalis* (3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> instar) foram infectadas via microinjeção com cerca de 5 -10 µL do estoque de BV do vírus selvagem AgMNPV e do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* com um auxílio de uma seringa de 1 mL. As larvas foram mantidas em copos plásticos e alimentadas com uma dieta sólida artificial (62,5 g de feijão, 50,0 g de gérmen de trigo, 50,0 g de proteína da soja, 31,2 g de levedo de cerveja, 30 g de ágar, 75 g de leite em pó, 3 g de ácido ascórbico, 1,5 g de ácido sórbico, 2,5 g de nipagin, 3 mL de formol 40 %, 5 mL de solução vitamínica e 1000 mL de água destilada). Após 90 ou 120 h p.i., as larvas mortas foram coletadas e armazenadas em um tubo Falcon de 50 mL a -20° C até seu uso para purificação de poliedros.

A larvas armazenadas foram maceradas, utilizando cadinho e pistilo, com 8 mL de tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1 %; SDS 2 %; Tris 0,01 M pH 8.0; EDTA 0,001 M). Para cada dez gramas de lagarta utilizou-se 10 mL de tampão de homogeneização. O macerado foi filtrado com quatro camadas de gaze e posteriormente centrifugado a 12.000 r.p.m.(Beckman J2-MI, rotor 14) a 4° C por 12 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 20 mL de TE. Em seguida, 5 mL do material, com concentração final de 30 mg/mL, foi aplicado sobre gradientes de sacarose variando de

1,17 g/mL a 1,30 g/mL e centrifugado a 24.000 r.p.m. em uma ultracentrífuga (Beckman L8-70M, rotor SW28) a 4° C por 40 min. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur uma banda contendo os corpos de oclusão (OB) foi coletada e diluída quatro vezes em TE (Tris-HCl pH 8,0 e EDTA 0,5 M) e centrifugada a 12.000 r.p.m. em uma centrífuga preparativa (Beckman J2-MI, rotor 14) 4°C por 15 min. O sedimento foi ressuspensão em água “milli-Q” e armazenado a -20° C.

A contagem direta dos poliedros, em microscópio, foi feita em um hemacitômetro (câmara de Neubauer). A suspensão contendo os corpos de oclusão (OB) purificados foi diluída 1000 vezes com água destilada. Quinze microlitros de cada solução diluída foram transferidas para a lâmina de contagem, de modo a tomar todo o volume desse espaço (sem excesso). Sob o microscópio foi estabelecido o modo de contagem para a sua uniformização (número e posição dos campos onde foram feitas as contagens), nesse trabalho utilizamos o campo 2, que corresponde a uma área de 0,0625 mm<sup>2</sup>. A contagem foi realizada em triplicata da mesma suspensão no campo estabelecido.

A média de contagens foi multiplicada pelo fator de conversão ( $n \times 16 \times 10^4$  poliedros/mL, onde  $n$  é o n° médio de poliedros contados/campo) do campo utilizado, resultando no número de poliedros existentes na suspensão (Alves & Moraes, 1998). A concentração de poliedros do AgMNPV obtida foi  $5 \times 10^9$  OB/mL enquanto o vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* obteve uma concentração de  $6 \times 10^9$  OB/mL

## 4.12 Bioensaios

Bioensaios foram realizados utilizando larvas de *Anticarsia gemmatalis* (3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> instar) visando (a) observar se o vírus recombinante construído, vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, é capaz de causar liquidação das larvas no final da infecção, e (b) determinar os parâmetros de mortalidade larval em diferentes concentrações do vírus. Da mesma forma, larvas foram inoculadas com AgMNPV para observação comparativa dos efeitos da infecção.

Para a realização dos bioensaios foram utilizados poliedros purificados dos vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e AgMNPV, sendo testados cinco tratamentos para cada vírus nas seguintes concentrações:  $9,0 \times 10^4$ ;  $2,7 \times 10^5$ ;  $8,1 \times 10^5$ ;  $2,43 \times 10^6$  e  $7,29 \times 10^6$  OB/mL. Para cada tratamento, constando de três repetições, foram utilizadas 30 larvas de *A. gemmatalis*, sendo distribuídas três larvas por copo plástico de 50 mL contendo dieta artificial preparada sem os conservantes formol e nipagin. Cerca de 100 µL do inóculo viral das concentrações citadas acima foram distribuídos em toda a superfície da dieta (~0,5 cm<sup>3</sup>). Nos controles, o inóculo viral foi substituído por 100 µL de água destilada. As larvas foram mantidas em uma incubadora B.O.D., em condições controladas de temperatura (27° C), fotoperíodo (14 h) e umidade (70%).

A partir do terceiro dia (72 h p.i) de inoculação até o estágio de pupa, foram feitas observações diárias, para avaliar a mortalidade das larvas. Ao final dos bioensaios os dados foram analisados pelo programa MicroProbit 3.0 (análise de Probit – Finney, 1978) para determinar a CL<sub>50</sub> (concentração letal 50 - capacidade do vírus matar 50 % dos insetos testados) e TL<sub>50</sub> (tempo letal 50 – tempo que leva para o vírus matar 50 % dos insetos testados). Também foi calculado o TM (tempo médio de morte – média do tempo necessário para que os insetos testados morram), pela fórmula descrita abaixo, onde D é o

dia de avaliação e N é o número de larvas mortas pelo vírus nesse dia (Morales, 2001):

$$TM = \frac{(D1 \times N1) + (D2 \times N2) + (D3 \times N3) + (D4 \times N4) \dots (Dn \times Nn)}{\text{Total de larvas mortas pelo vírus}}$$

Foram observados também, a partir de 96 h p.i. até a morte das larvas, as estruturas dos tecidos internos. Para isso foram coletadas três larvas de *A. gemmatalis* infectadas com os vírus selvagem (AgMNPV) e o recombinante (vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*) que foram submetidas a inoculação com a maior concentração ( $7,29 \times 10^6$  OB/mL) utilizada na realização dos bioensaios. As larvas coletadas aleatoriamente foram dissecadas com uma abertura no dorso, que se estende da cabeça ao final do abdômen, a fim de expor o tubo intestinal e outros órgãos, sendo fotografadas em um estereomicroscópio (Stemi SV11, ZEISS). Larvas não infectadas também foram coletadas e dissecadas como controle (mock).

## 4.13 Ensaios Enzimáticos

### 4.13.1 Ensaio Quitinolítico

Testou-se a atividade da quitinase presente nos poliedros purificados neste trabalho do AgMNPV e do vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*.

Antes de iniciar o ensaio quitinolítico, fez-se a dosagem de proteínas presentes no estoque de poliedros utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) para verificar a concentração de proteínas totais e a leitura foi feita a uma absorvância de 595 nm (Sigma).

A partir da dosagem de proteínas estabelecida, 15 µg/µL de proteínas totais nos poliedros do AgMNPV e 7,8 µg/µL de proteínas totais nos poliedros do vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, o ensaio foi conduzido em triplicata utilizando 100 µg de proteínas.

Para determinação da atividade quitinolítica foi utilizada uma metodologia determinada pela quantificação de açúcar redutor (método DNS) (Miller, 1959) liberado da quitina. Cerca de 13 µL e 25 µL de OB do AgMNPV e do vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, respectivamente, foram acrescentados em uma solução contendo 500 µL de quitina regenerada 0,5 %, 250 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 completando a reação para 1 mL com de tampão acetato de sódio. As amostras foram incubadas a 37° C por 16 h em um agitador com velocidade de 100 rpm. Após esse período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 r.p.m. (Beckman J2-MI, rotor 14) por 5 min e 250 µL foi coletado do sobrenadante e transferido para um novo microtubo e então, foi adicionado 750 µL de DNS. Em seguida, as amostras foram fervidas por 10 min e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente (Hitachi V-2000) a 550 nm. Quitina regenerada e água destilada (sem enzima) foram utilizadas como controle.

#### **4.13.2 Ensaio Proteolítico**

Para os ensaios proteolíticos também foram utilizados os poliedros do AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, assim como a hemolinfa de larvas infectadas com os vírus e de larvas não infectadas. Após 120 h p.i. a hemolinfa de 25 larvas de cada tratamento (infectadas e mock) foram coletadas através de um pequeno orifício feito no segundo par de patas das lagartas. A hemolinfa coletada foi homogeneizada em um tampão anticoagulante

(NaOH 98 mM; NaCl 186 mM; EDTA 1,7 mM; ácido cítrico 41 mM, pH 4.5) para evitar melanização e então armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento de uso.

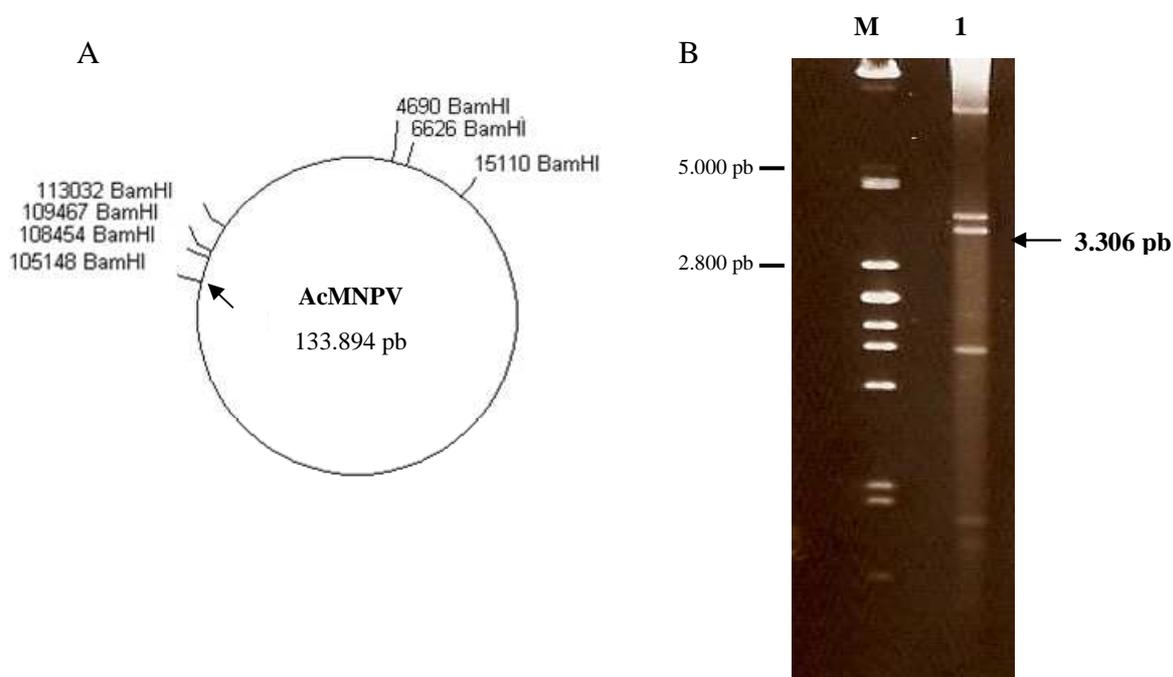
Antes de iniciar o ensaio proteolítico, fez-se à dosagem de proteínas presentes na hemolinfa das larvas infectadas e não infectadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) para verificar a concentração de proteínas totais. A leitura foi feita a uma absorvância de 595 nm (Sigma). A partir da dosagem de proteínas estabelecida obteve-se 9,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 11  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas totais presentes na hemolinfa coletada de larvas infectadas com o AgMNPV e com vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* respectivamente, e na hemolinfa de larvas não inoculadas (mock) apresentou 17,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas totais. O ensaio foi conduzido em triplicata utilizando 100  $\mu\text{g}$  de proteínas. A dosagem de proteínas presentes nos poliedros foi à mesma utilizada no item 4.13.1.

Testou-se a atividade de proteases utilizando como substrato queratina azulada (Keratin Azure, Sigma). Foram utilizados na reação 21,5  $\mu\text{L}$  da hemolinfa do AgMNPV, 18,0  $\mu\text{L}$  da hemolinfa do vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e 11,6  $\mu\text{L}$  de hemolinfa a partir de larvas não infectadas. Para os poliedros foram utilizados 13  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  do AgMNPV e do vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, respectivamente. Na reação as amostras foram incubada com 500  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7.0 e  $\text{MgCl}_2$  0,1 M e 50 mg de substrato queratina azulada (Keratin Azure, Sigma) durante 3 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, a reação foi parada com 100  $\mu\text{L}$  de TCA 10 % (ácido tricloroacético, Sigma) e estocada no gelo por 1 h. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 r.p.m. (Beckman J2-MI, rotor 14) por 5 min, onde 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Fez-se a leitura das amostras em um espectrofotômetro (Hitachi V-2000) a uma absorvância de 595 nm. Queratina azulada e água destilada foram utilizadas como controle.

## 5. Resultados

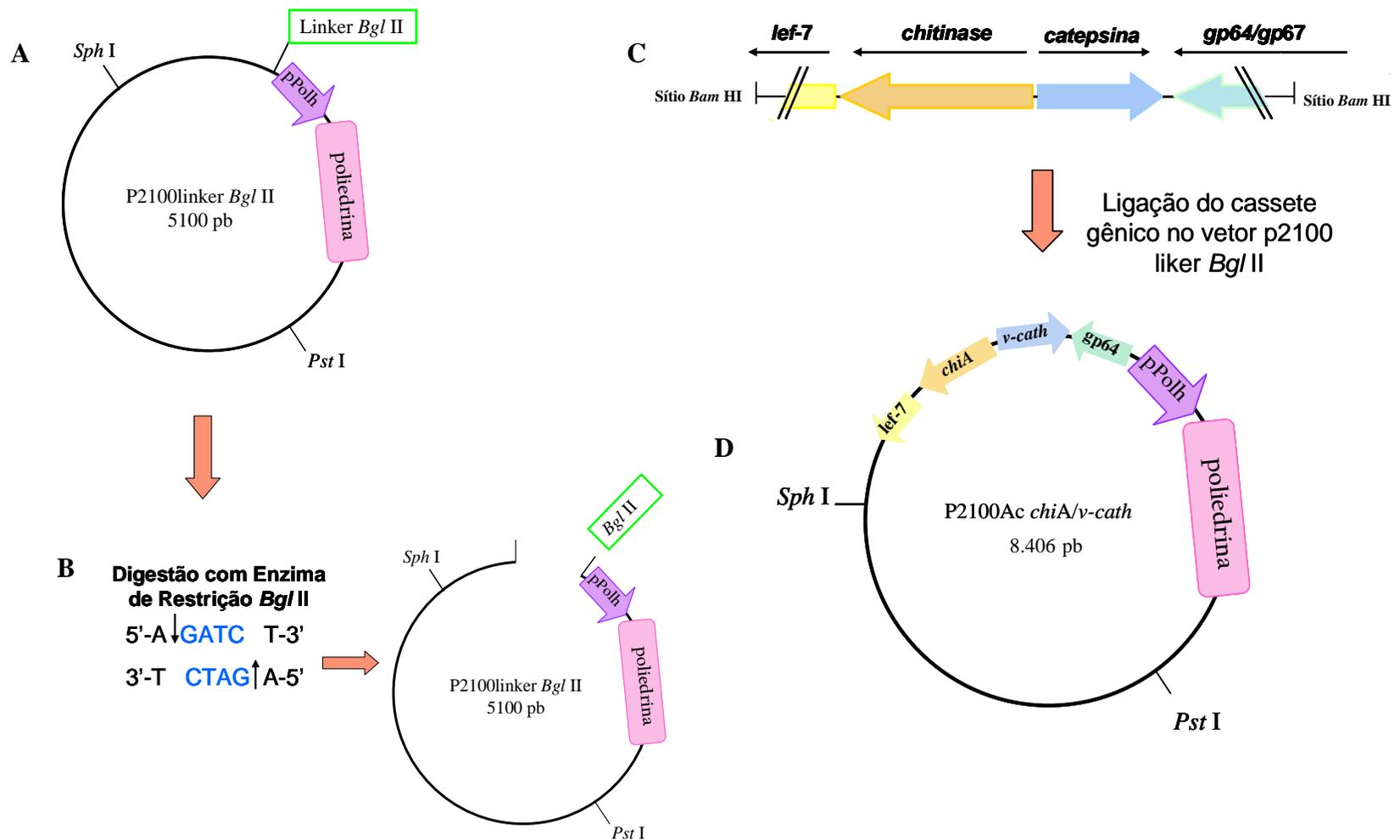
### 5.1 Construção do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA*/v-*cath*

O DNA genômico do baculovírus AcMNPV foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. O DNA genômico do baculovírus AcMNPV apresenta sete sítios de restrição para a enzima *Bam*HI e o locus aonde estão presentes os genes *v-chiA* e *v-cath* correspondem ao quarto sítio de restrição exatamente entre as regiões de 108.454 nt a 105.148 nt, indicado pela seta na figura 14 A. No perfil eletroforético da digestão foi possível detectar um fragmento de DNA com cerca de 3.306 pb referente aos genes *v-chiA* e *v-cath*, como mostra a figura 14 B.

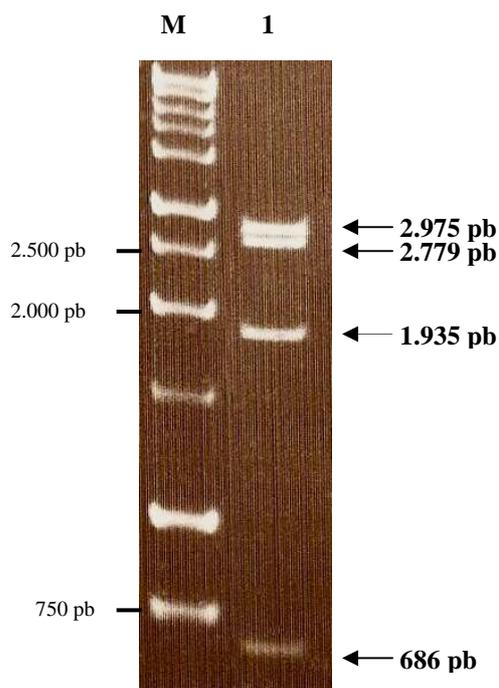


**Figura 14:** Perfil de restrição do DNA genômico do AcMNPV com a enzima de restrição *Bam*HI. (A) Perfil de restrição do genoma do AcMNPV. (B) Análise eletroforética em gel de agarose a 0,8 % mostrando em M - Marcador de massa molecular DNA Lambda *Pst*I (Promega) digerido com a enzima de restrição *Pst*I (Promega), setas à esquerda indicam o tamanho de algumas bandas do marcador. 1 - DNA genômico do AcMNPV digerido com *Bam*HI. A seta a direita indica o fragmento de 3.306 pb contendo os genes quitinase e catepsina.

O fragmento de 3.306 pb, do gel de agarose, foi removido do gel e utilizado em uma reação de ligação no vetor p2100linker*Bgl*II, resultando no plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath* com cerca de 8.406 pb, contendo o promotor e o gene da poliedrina do baculovírus AgMNPV, assim como, os genes quitinase e catepsina do baculovírus AcMNPV (Figura 15). A confirmação da inserção gênica no plasmídeo p2100linker*Bgl*II foi realizada pela digestão, do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath* construído, com a enzima de restrição *Pst*I, ocorrendo a liberação dos fragmentos de 2.975 pb, 2.779 pb, 1.935 pb e 686 pb (Figura 16). A liberação desses fragmentos indica que o gene catepsina encontra-se adjacente ao promotor da poliedrina.



**Figura 15:** Esquema da construção do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath*. A figura A mostra o mapa do plasmídeo p2100 linker *Bgl*II mostrando a orientação do promotor da poliedrina (*pPolh*) e do gene da poliedrina, a localização dos sítios de restrição *Bgl*II, *Pst*I e *Sph*I. A figura B apresenta o esquema da digestão do plasmídeo com *Bgl*II e o local (indicado pelas setas) referente a atuação da enzima de restrição *Bgl*II na seqüência de nucleotídeos. A figura C ilustra o esquema da organização gênica no fragmento de *Bam* HI (3.306 pb) do genoma do AcMNPV contendo os genes quitinase e catepsina, que foi inserido no p2100linker*Bgl*II. A figura D apresenta o mapa do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA/v-cath*, mostrando a posição dos genes *v-chiA* e *v-cath* flanqueados pelas seqüências parciais dos genes *lef-7* e *gp64*, respectivamente, assim como, a posição dos genes da poliedrina e seu promotor (*pPolh*) e os sítios de enzimas de restrição para *Pst*I e *Sph*I.

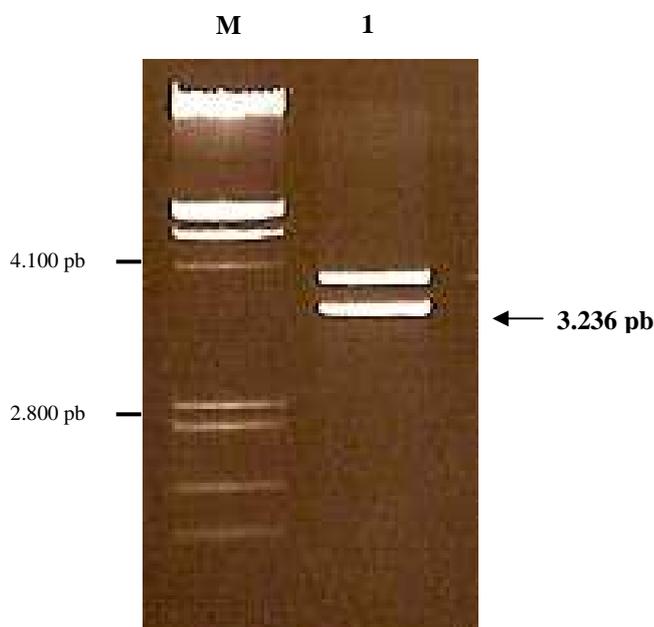


**Figura 16:** Análise eletroforética mostrando o perfil de restrição do plasmídeo construído p2100Ac.v-chiA/v-cath. Clonagem e orientação dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*) no vetor de transferência p2100linkerBglIII. Análise em gel de agarose 0.8 % mostrando a confirmação da construção do plasmídeo p2100Ac.v-chiA/v-cath pela digestão com a enzima de restrição *Pst*I. M – Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas). 1 – Perfil de restrição do plasmídeo p2100Ac.v-chiA/v-cath após digestão com a enzima *Pst*I, apresentando fragmentos de 2.975 pb, 2.779 pb, 1.935 pb e 686 pb.

## 5.2 Construção do plasmídeo p2100Cf.v-chiA/v-cath

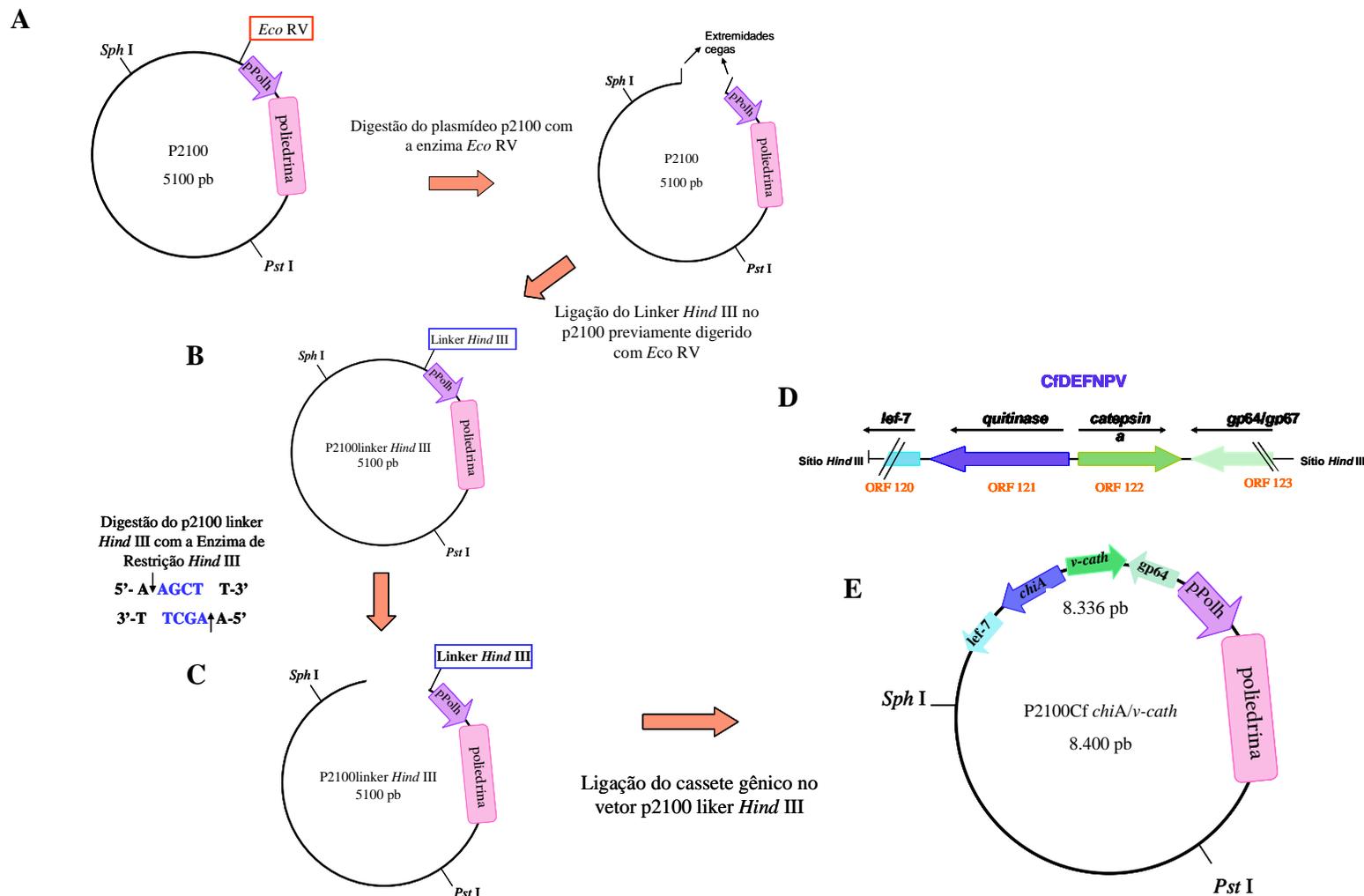
O plasmídeo pCfDefNPV*Hind*IIIQ foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III, para liberação de um fragmento de 3.238 pb (Figura 17), que contém as ORFs completas dos genes quitinase e catepsina, assim como parte da região a montante do gene quitinase e a extremidade do gene *gp64* a montante do gene catepsina, derivados do genoma do baculovírus CfDefNPV. O fragmento foi então, inserido no vetor de transferência p2100linker*Hind*III, previamente construído com a introdução de um

linker *Hind*III no sítio de enzima de restrição *Eco*RV (dados não mostrados) digerido com a enzima *Hind*III.

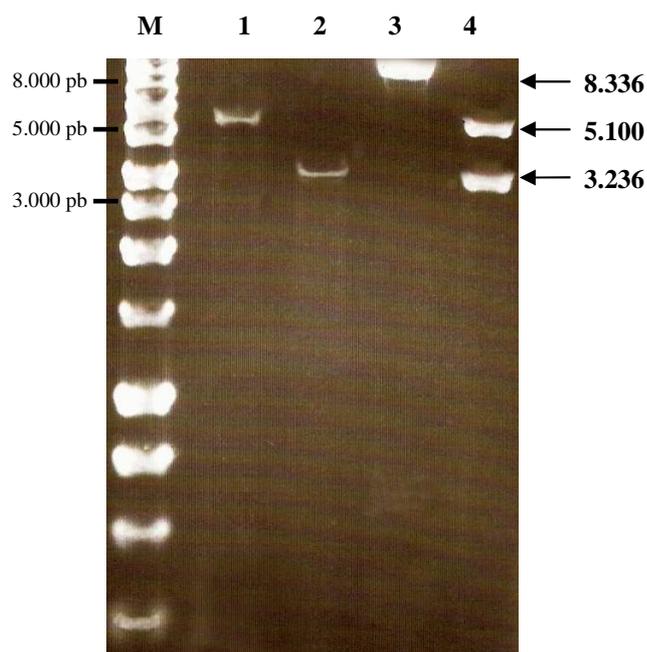


**Figura 17:** Perfil eletroforético da digestão do plasmídeo pCfDefNPVHindIIIQ com a enzima *Hind*III (1) em gel de agarose 0.8 %. M- marcador de massa molecular, DNA do fago  $\lambda$  digerido com *Pst*I. 1- A seta indica a posição do fragmento de 3.236 pb correspondente aos genes quitinase e catepsina derivados do genoma do baculovírus CfDefNPV.

O fragmento de 3.236 pb gerado foi extraído e purificado do gel de agarose e utilizado em uma reação de ligação entre o *cassete* gênico e o vetor p2100linker*Hind*III, formando o plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, apresentando um fragmento de 8.336 pb contendo o promotor e o gene da poliedrina do baculovírus AgMNPV, assim como, os genes quitinase e catepsina do baculovírus CfDefNPV (Figura 18). A confirmação da inserção gênica no vetor foi feita digerindo o plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* com a enzima de restrição *Hind*III (Figura 19).



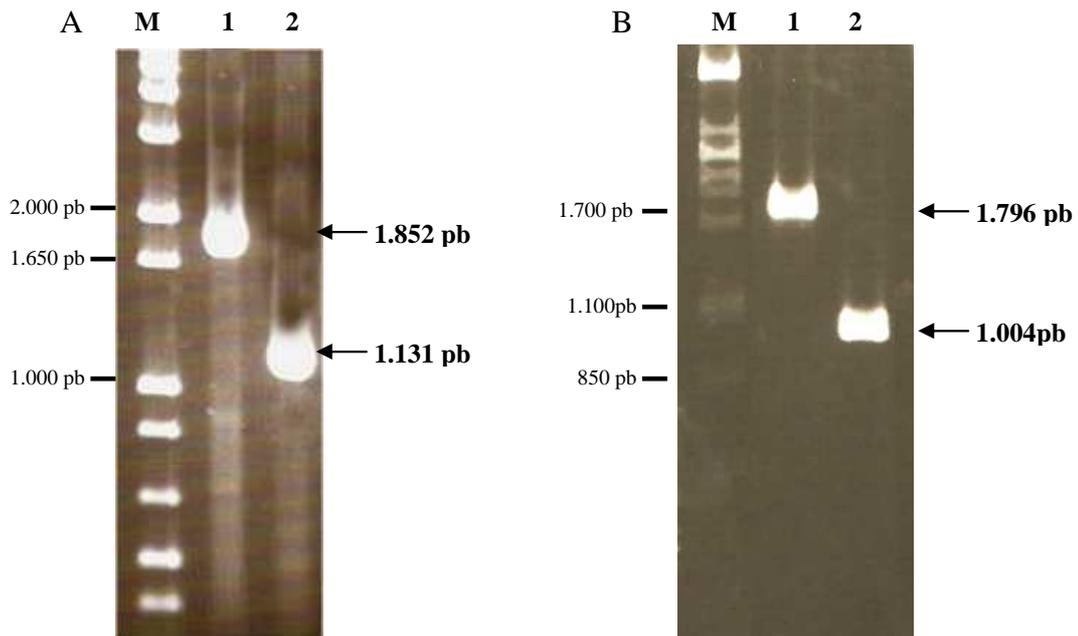
**Figura 18:** Esquema da construção do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath*. A figura A representa o mapa do plasmídeo p2100 contendo um sítio de restrição *EcoRV* próximo ao promotor da poliedrina que foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, linearizando o plasmídeo e tornando as extremidades “cegas”. Na seqüência, o Linker *HindIII* foi introduzido, por uma reação de ligação, nas extremidades “cegas” do plasmídeo previamente digerido (figura B). A figura C mostra o plasmídeo p2100 linker *HindIII* digerido, que foi ligado ao fragmento de 3.236pb contendo o *cassete* de genes, no qual se encontram os genes *quitinase* e *catapsina* (figura D). A figura E mostra o mapa do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA/v-cath*, com a posição dos genes *v-chiA* e *v-cath* flanqueados pelas seqüências parciais dos genes *lef-7* e *gp64*, respectivamente, assim como, a posição dos genes da poliedrina e seu promotor (*pPolh*) e os sítios de restrição para as enzimas *PstI* e *SphI*.



**Figura 19:** Análise eletroforética do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Eletroforese em gel da agarose a 0,8 % mostrando em M - Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen); 1 - Vetor p2100 linker *Hind*III intacto apresentando um fragmento de 5.100 pb; 2 - Fragmento de DNA de 3.236 pb contendo os genes *v-chiA* e *v-cath* do vírus CfDefNPV; 3 – Plasmídeo construído p2100Cf.*chi-A*/v-*cath* intacto, apresentando um fragmento de DNA de 8.336 pb; 4 – Digestão do p2100Cf.*chi-A*/v-*cath* com a enzima de restrição *Hind*III, liberando fragmentos de DNA de 5.100 pb e 3.236 pb.

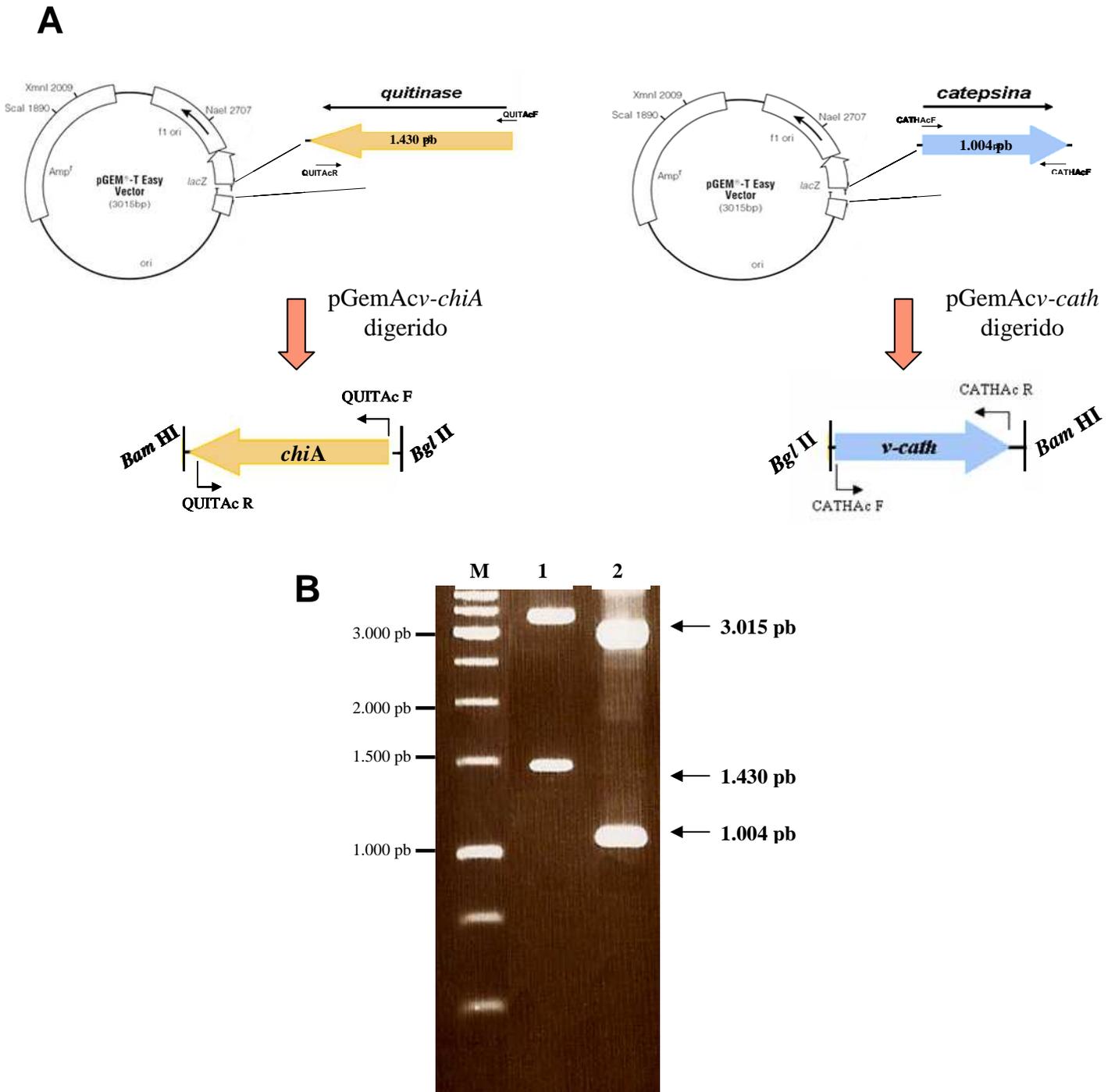
### 5.3 Confirmação da construção dos vetores pGEMAc.v-*chiA*, pGEMAc.v-*cath*, pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath*

A amplificação dos genes quitinase e catepsina dos baculovírus AcMNPV e CfDefNPV por PCR, com oligonucleotídeos específicos, geraram fragmentos de 1.852 pb e 1.131 pb referentes aos genes quitinase e catepsina do CfDefNPV, respectivamente, enquanto os gene quitinase e catepsina do AcMNPV amplificaram fragmentos de 1.796 pb e 1.004 pb, respectivamente (Figura 20).

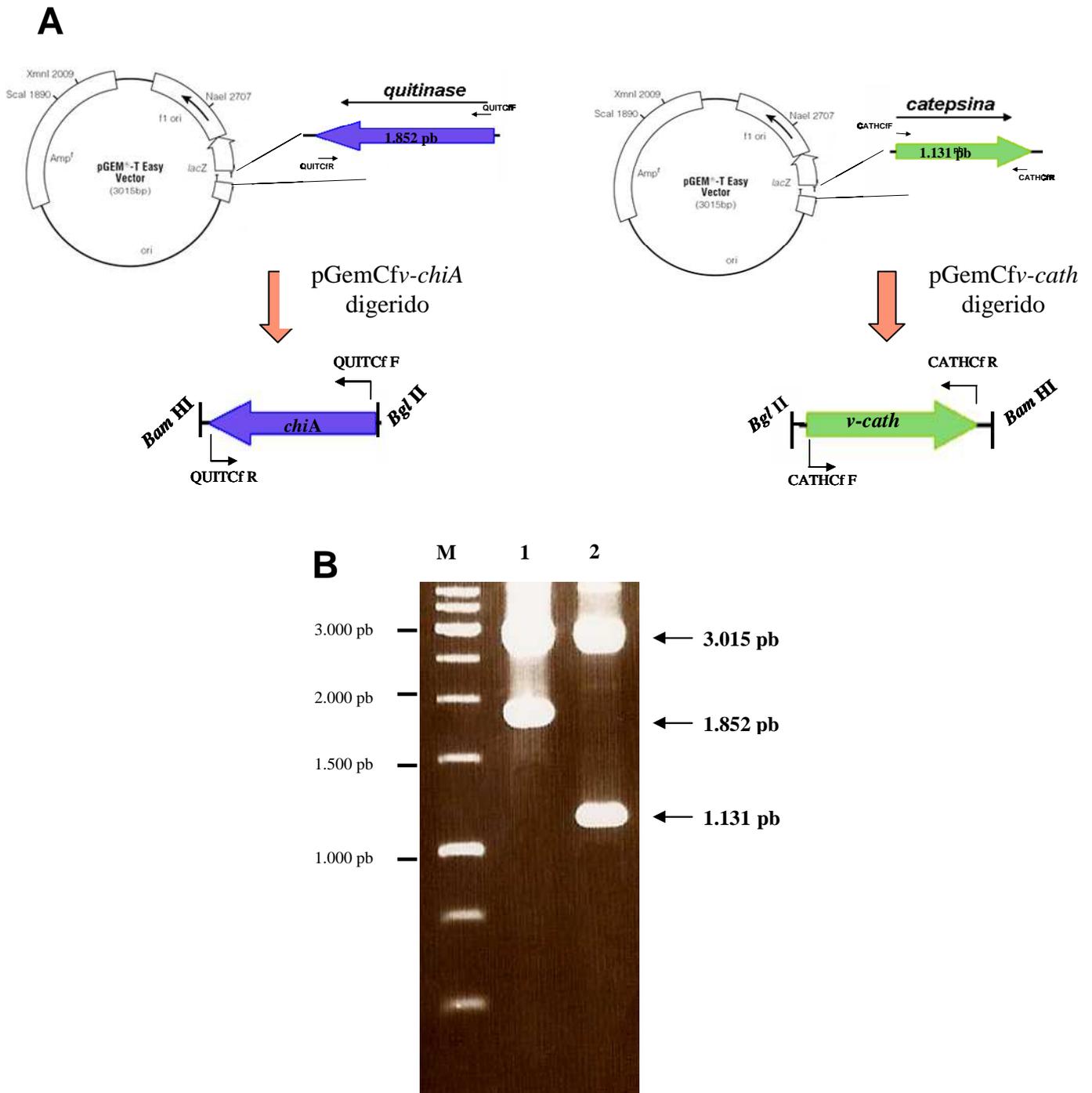


**Figura 20:** Análise eletroforética mostrando os fragmentos de PCR amplificados, referentes aos genes *v-chiA* e *v-cath*. (A) Fragmentos de DNA amplificados por PCR obtidos a partir do plasmídeo pCfDefNPVHindIIIQ correspondendo aos genes *v-chiA* e *v-cath*, respectivamente (poços 1 e 2). M - Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). (B) Fragmentos de DNA correspondente aos genes *v-chiA* e *v-cath* obtidos a partir do fragmento purificado do genoma do AcMNPV após digestão com *Bam*HI, respectivamente (poços 1 e 2). M- marcador de massa molecular, DNA do fago  $\lambda$  digerido com *Pst*I.

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega), resultando na construção dos plasmídeos pGEMAc.*v-chiA*, pGEMAc.*v-cath*, pGEMCf.*v-chiA* e pGEMCf.*v-cath* e a confirmação das clonagens foi realizada pela digestão dos plasmídeos construídos com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Bam*HI, liberando fragmentos de 1.430 pb, 1.004 pb, 1.852 pb e 1.131 pb, respectivamente. (Figura 21 e 22). O tamanho do fragmento de 1.430 pb liberado pela digestão difere do tamanho obtido pela PCR de 1.796 pb devido a presença de um sítio de restrição *Bgl*III no interior do gene *v-chiA* do AcMNPV, liberando um fragmento de 366 bp.



**Figura 21:** Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídeos pGEMAc.v-*chiA* e pGEMAc.v-*cath*. A figura A representa os esquemas das construções dos plasmídeos pGEMAc.v-*chiA* e pGEMAc.v-*cath* com os genes do AcMNPV. Clonagem dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*) do AcMNPV no vetor pGEM-Teasy (figura B). A figura B mostra a análise em gel de agarose 0.8 % mostrando a confirmação da construção dos plasmídeos pGEMAc.v-*chiA* e pGEMAc.v-*cath*, pela digestão com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Bam*HI. Os fragmentos de DNA com tamanho aproximado de 3.015 pb corresponde ao vetor pGEM-Teasy (Poços 1 e 2). M – Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). No poço 1 o fragmento de 1.430 pb liberado, corresponde ao gene quitinase do AcMNPV e um fragmento liberado de 1.004 pb, no poço 2, referente ao gene catepsina do AcMNPV.



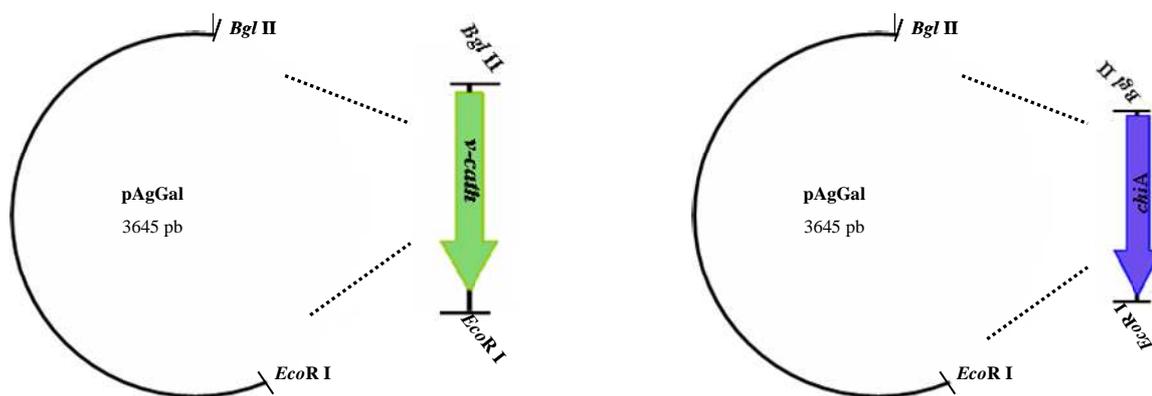
**Figura 22:** Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídeos pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath*. A figura A representa os esquemas das construções dos plasmídeos pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath* com os genes do CfDefNPV. Na sequência, clonagem dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*) do CfDefNPV no vetor pGEM-Teasy (figura B). A figura B apresenta a análise em gel de agarose 0.8 % mostrando a confirmação da construção dos plasmídeos pGEMCf.v-*chiA* e pGEMCf.v-*cath* pela digestão com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Bam*HI. Os fragmentos de DNA com tamanho aproximado de 3.015 pb corresponde ao vetor pGEM-Teasy (Poços 1 e 2). M – Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). Nos poços 1 e 2 ocorreu a liberação de um fragmento de 1.852 pb e 1.131 pb referente aos genes quitinase e catepsina do CfDefNPV, respectivamente.

#### **5.4 Construção dos vetores de transferência pAgGalAc.v-chiA, pAgGalAc.v-cath, pAgGalCf.v-chiA e pAgGalCf.v-cath**

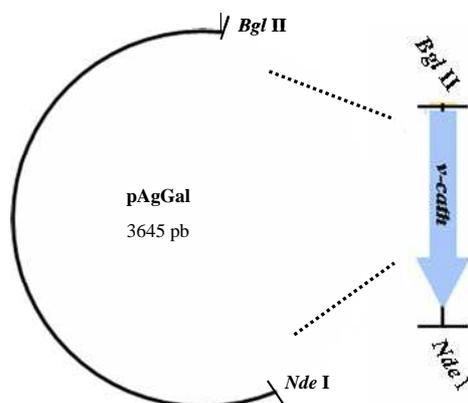
A partir da purificação dos fragmentos correspondente aos genes quitinase e catepsina, liberados dos plasmídeos construídos pGEMCf.v-chiA, pGEMCf.v-cath e pGEMAc.v-chiA, após digestão com as enzimas *Bgl*III e *Eco*RI e com a purificação do fragmento liberado pelo plasmídeo pGEMAc.v-cath, após digestão com *Bgl*III e *Nde*I, reações de ligação foram feitas no vetor de transferência pAgGal. Este foi previamente digerido em duas reações: uma com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Eco*RI e a outra com as enzimas *Bgl*III e *Nde*I, para retirar o fragmento correspondente ao gene da  $\beta$ -galactosidase (*Lac Z*) presente no vetor pAgGal e assim introduzir no local os genes *v-chiA* e *v-cath* de cada vírus, separadamente, resultando na construção dos plasmídeos, pAgGalAc.v-cath, pAgGalCf.v-chiA e pAgGalCf.v-cath, que por fim possuem os genes flanqueados por regiões homólogas ao baculovírus AgMNPV (Figura 23). Não foi possível ainda finalizar a construção do plasmídeo pAgGalAc.v-chiA..

A confirmação da clonagem dos genes por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, amplificou fragmentos de 1.004 pb, 1.131 pb e 1.852 pb, correspondente aos genes catepsina do baculovírus AcMNPV e CfDefNPV e ao gene quitinase do baculovírus CfDefNPV, respectivamente (Figura 24).

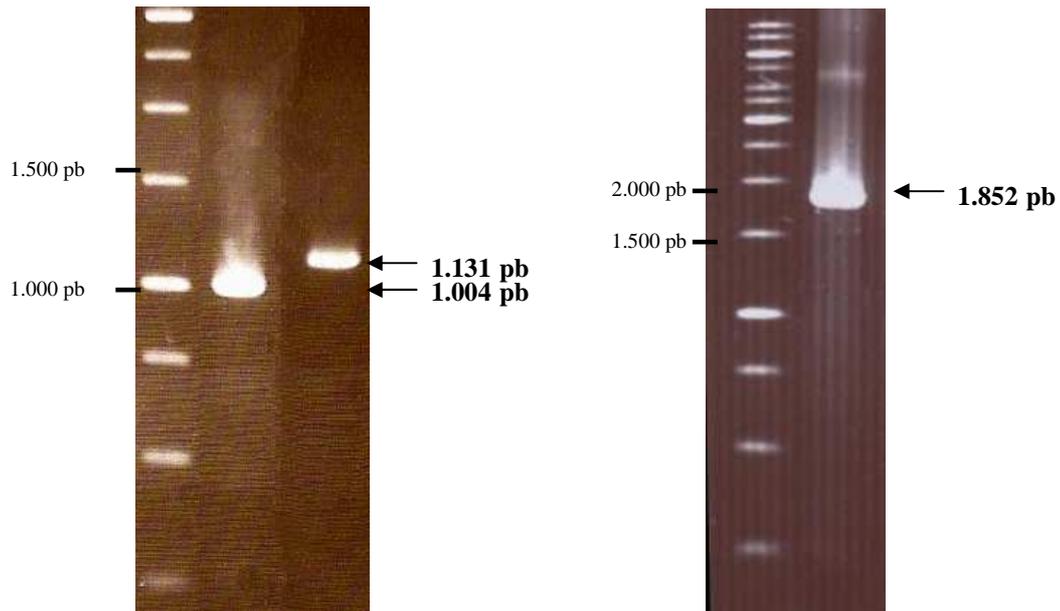
### CfDefNPV



### AcMNPV



**Figura 23:** Esquema da construção dos plasmídeos pAgGalCf.v-chiA, pAgGalCf.v-cath e pAgGalAc.v-cath. A figura mostra o vetor pAgGal após digestão com as enzimas de restrição BglII, EcoRI e NdeI, livres da presença do gene *Lac-Z*, apresentando tamanho de 3.645 pb, seguido da ligação dos genes *v-chiA* e *v-cath*.

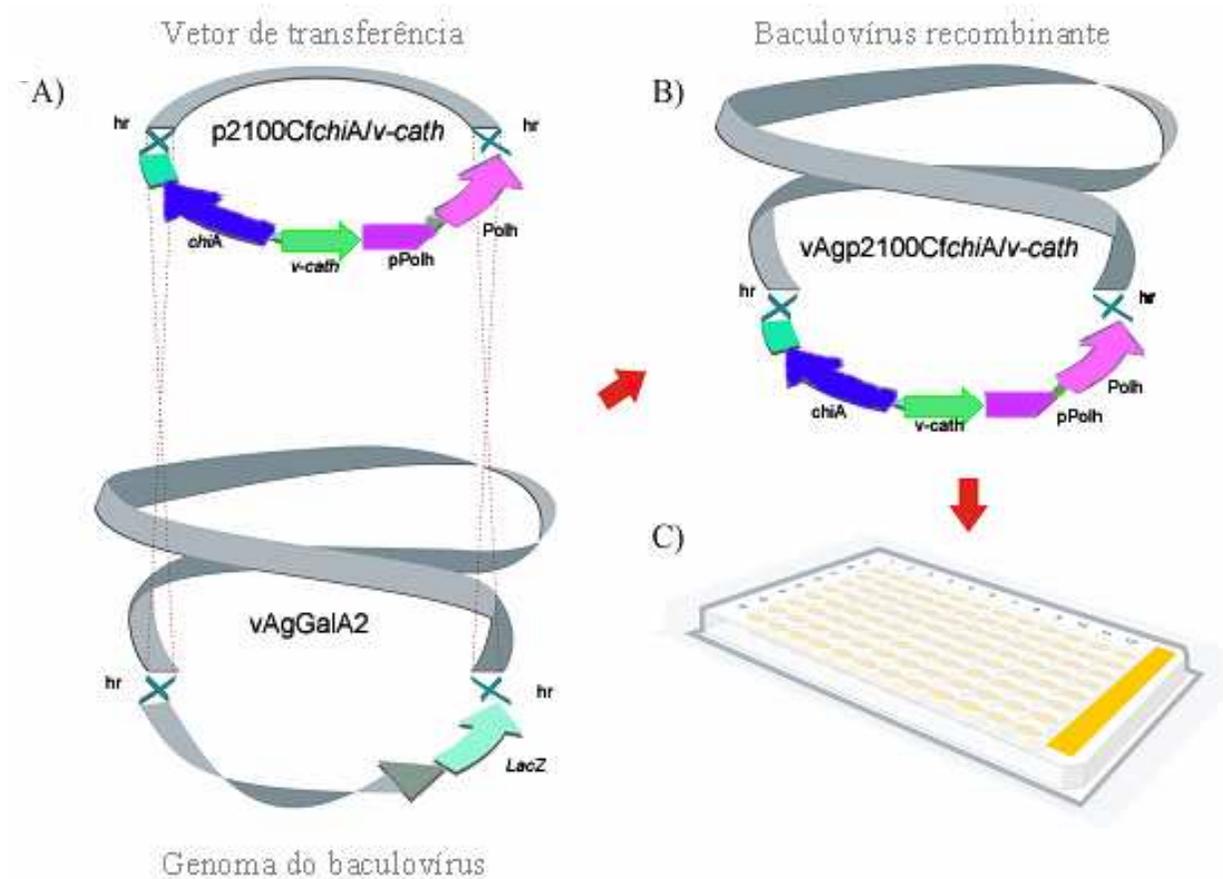


**Figura 24:** Confirmação da clonagem dos genes catepsina do AcMNPV e CfDefNPV e do gene quitinase do CfDefNPV no vetor pAgGal. (A) O gel de agarose 0.8 % mostra a amplificação de dois fragmentos por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos. No poço 1, o fragmento de 1.004 pb corresponde ao gene catepsina do AcMNPV, enquanto no poço 2, um fragmento de 1.131 pb foi amplificado também por PCR, correspondente ao gene catepsina do CfDefNPV. M – Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). (B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%. No poço 1, um fragmento de 1.852 pb foi amplificado por PCR, confirmando a inserção do gene quitinase do CfDefNPV do vetor pAgGal. M – Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

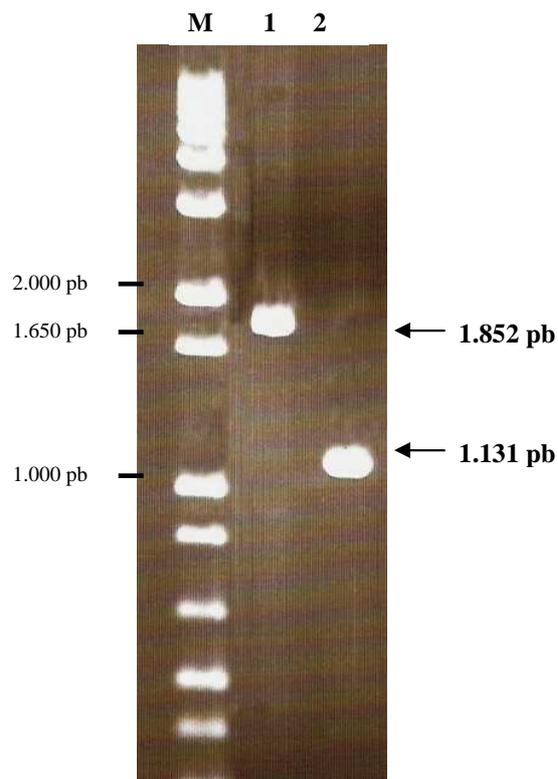
## 5.5 Construção e confirmação do baculovírus AgMNPV recombinante (*vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*)

O plasmídeo *p2100Cf.v-chiA/v-cath* foi co-transfectado com o DNA do baculovírus recombinante *vAgGalA2* em células de inseto UFL-AG-286, dando origem ao vírus recombinante *vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*. No interior das células de inseto, ocorreu o evento da recombinação homóloga entre as regiões do plasmídeo vetor e do genoma viral, havendo a troca de regiões homólogas entre os dois DNAs. O vetor de transferência *p2100Cf.v-chiA/v-cath* possui além do gene de interesse (*v-chiA* e *v-cath*), o gene da poliedrina, conferindo ao vírus recombinante (*vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*) a

capacidade de expressar poliedrina e produzir OB em células de inseto infectadas (Figura 25). Após o isolamento em placas de diluição de 96 poços (O'Reilly *et alli*, 1992), a confirmação da inserção gênica, no genoma do baculovírus AgMNPV, foi realizada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse, *v-chiA* e *v-cath*, que produziu fragmentos correspondentes a esses dois genes (figura 26).



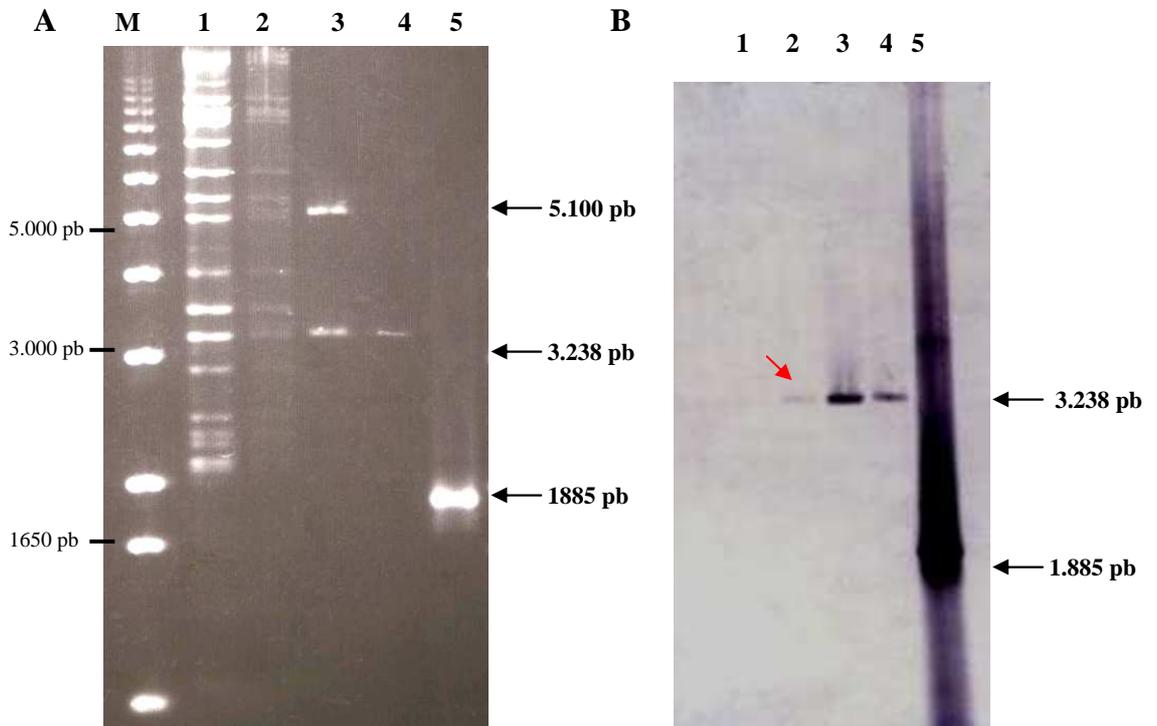
**Figura 25:** Esquema ilustrativo da construção e do isolamento do baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* pelo método de recombinação homóloga. A figura A apresenta o evento que ocorre entre as regiões flanqueadoras do *cassete* de expressão dos genes exógenos, no caso v-*chiA* e v-*cath*, no vetor de transferência, e regiões homólogas no genoma de vírus vAgGalA2. Dessa forma o vírus adquire o *cassete* contendo o gene de interesse (figura B). Em seguida, na figura C, o vírus construído vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* é isolado em diluições seriadas em placa de 96 poços (Adaptado de: Corrêa, 2007).



**Figura 26:** Amplificação dos genes *v-chiA* e *v-cath* do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % mostrando o produto da amplificação da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos específicos QUITCfF e QUITCfR para o gene *v-chiA* e CATHCfF e CATHCfR para o gene *v-cath*. 1 e 2, respectivamente - As setas à direita, indicam os fragmentos de 1.852 pb e 1.131 pb referentes aos genes *v-chiA* e *v-cath*, respectivamente. M - Marcador DNA ladder 1 Kb plus da Invitrogen, à esquerda estão indicados o tamanho de algumas bandas do marcador.

Para a confirmação da inserção dos genes *v-chiA* e *v-cath* no genoma do vírus recombinante construído vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, a técnica *Southern blot* foi utilizada com uma sonda de DNA não radioativa (construída por PCR com o par de oligonucleotídeos QUITCfF e QUITCfR). As preparações do DNA plasmidial, DNA viral, submetidos à digestão com a enzima *HindIII*, e a sonda foram separadas em gel de agarose 0,7 % (Figura 27 A), e transferidas para uma membrana de náilon. Após hibridização com a sonda, Observou-se uma banda do tamanho esperado, a qual

identificou a localização do gene quitinase e catepsina, existente no genoma do baculovírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* (Figura 27 B).

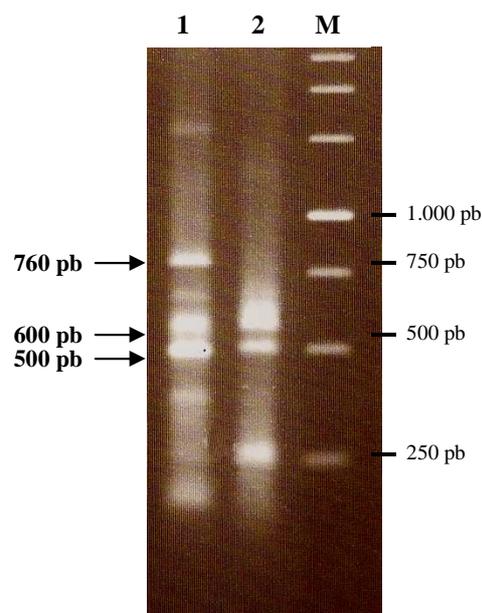


**Figura 27:** Confirmação da inserção dos genes *v-chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus AgMNPV. (Figura A) Gel de agarose a 0,7 % mostrando o perfil do DNA plasmidial (p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*) e viral. Perfil de restrição do DNA do AgMNPV no poço 1 e recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, poço 2, digeridos com a enzima *Hind*III. Poço 3 - p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* digerido com *Hind*III. Poço 4 – Fragmento de DNA de 3.238 pb obtido após extração e purificação dos genes *v-chiA* e *v-cath* do gel de agarose (controle positivo). Poço 5 – Fragmento de 1885 pb utilizado como sonda de DNA amplificado por PCR com os oligonucleotídeos QUITCfF e QUITCfR. M - Marcador DNA ladder 1 Kb Plus (Invitrogen) (Figura B) Análise de *Southern blot* - Padrão de hibridização do perfil eletroforético dos DNA analisados. Poço 2 – Marcação dos genes quitinase e catepsina no genoma do vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* com 3.238 pb de acordo com os controles positivos. Poços 3 e 4 – Fragmentos de 3.238 pb detectados no plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e no *cassete* gênico purificado (controles positivos). Poço 5 – Marcação da sonda.

## **5.6 Análise transcricional dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*) do vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* expressos em células de inseto**

O RNA do vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* foi purificado a partir de células UFL-AG- 286 infectadas (72 h p.i.) para analisar a transcrição dos genes exógenos inseridos nos baculovírus construído neste trabalho, sendo submetido a uma reação de RT-PCR para confirmar a transcrição dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*).

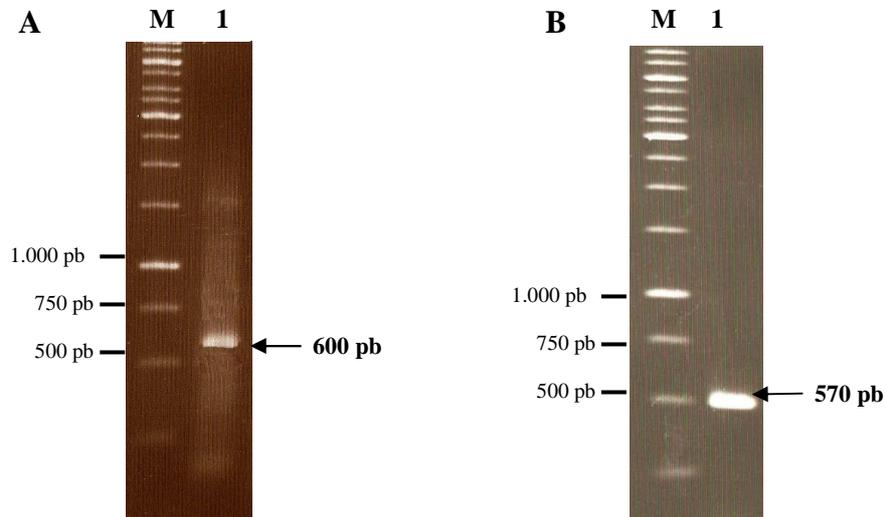
O oligonucleotídeo RTQUITCf, específico para a região interna do gene quitinase, produziu quatro fragmentos de DNA apresentando tamanhos de aproximadamente 500 pb, 600 pb, 750 pb como mostra o gel de agarose 0,8 % na figura 28. Já o oligonucleotídeo RTCATHCf, específico para a região interna do gene catepsina, produziu fragmentos de DNA de aproximadamente 500 pb e 600 pb (figura 28). Entretanto, não foi possível determinar qual dos fragmentos correspondia ao transcrito do gene. É possível que a baixa especificidade dos oligonucleotídeos usados (RTQUITCf e RTCATHCf) tenha gerado vários fragmentos na reação de RT-PCR.



**Figura 28:** Análise transcricional dos genes quitinase e catepsina em células de inseto infectadas com o vírus recombinante *vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*. Perfil eletroforético do gel de agarose 0.8 % com os produtos de amplificação de RT-PCR a partir do mRNA extraído de células UFL-AG-286 infectadas como o *vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*, utilizando os oligonucleotídeos RTQUITCf (para quitinase) e RTCATHCf (para catepsina) juntamente com o T2. M - Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). 1 e 2 – Fragmentos amplificados de RT-PCR correspondente ao mRNA dos genes quitinase e catepsina, respectivamente. As setas à direita indicam o tamanho aproximado dos fragmentos amplificados.

Para determinar a especificidade do fragmento obtidos pela RT-PCR tanto do gene *v-chiA* como do gene *v-cath*, foi retirado do gel de agarose para purificação, todos os fragmentos amplificados no poço 1 e no poço 2 da figura 28, e então foram submetidos a uma nova PCR, desta vez utilizando os oligonucleotídeos RTQUITCf (específico para a reação de RT-PCR do gene *v-chiA*) e QUITCf R (reverso do gene *v-chiA*), que se anelam na posição 422 e -187 a partir do códon de terminação do gene *v-chiA*, respectivamente, produzindo um fragmento esperado de aproximadamente 600 pb (Figura 29 A). Para a detecção do fragmento correspondente ao gene *v-cath*, utilizou-se os pares de oligonucleotídeos RTCATHCf (específico para a reação de RT-PCR do

gene *v-cath*) e CATHCf R (reverso do gene *v-chiA*) anelando-se na posição 416 e -157 respectivamente, em relação ao códon de terminação do gene *v-cath*, produzindo um fragmento também esperado de aproximadamente 570 pb (Figura 29 B).



**Figura 29:** Análise da PCR utilizada para identificar a especificidade dos fragmentos correspondente aos genes quitinase e catepsina do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Na figura A, uma análise de eletroforese em gel de agarose 0.8 % apresentou um produto de PCR com tamanho aproximado de 600 pb utilizando os oligonucleotídeos RTQUITCf e QUITCf R específicos para o gene *v-chiA*. A figura B, mostra a eletroforese em gel de agarose 0.8 %, a amplificação de um produto de aproximadamente 570 pb utilizando os oligonucleotídeos RTCATHCf e CATHCf R específicos para o gene *v-cath*. M - Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

## 5.7 Análise dos parâmetros de mortalidade a partir do vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* e do AgMNPV

Os bioensaios consistiram de 30 larvas inoculadas oralmente com poliedros em diferentes concentrações. A infectividade foi comparada entre os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* pela determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e do tempo letal médio (TL<sub>50</sub>).

Os valores obtidos na CL<sub>50</sub> para o vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* e para o vírus selvagem AgMNPV foram 58.151,16 e 64.882,20 OB/mL, respectivamente, sendo estes dados referentes a média de duas repetições (Tabela 3). Estes resultados mostram que a concentração necessária para o vírus recombinante matar 50% das larvas testadas aproxima de 0,6 vezes menor do que a concentração do vírus selvagem AgMNPV requerida para matar o mesmo número de larvas. Isso sugere que não houve diferença significativa entre os vírus testados.

**Tabela 3:** Concentração letal média para larvas *A. gemmatalis* infectadas oralmente com poliedros dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*. Método de Probit

Hospedeiro/ Vírus	*CL <sub>50</sub> (OB/ml)	Limites Fiduciais 95%	Slope	$\chi^2$
<i>Anticarsia gemmatalis</i> / vAgp2100Cf.v- <i>chiA/v-cath</i>	58151,16	4262,22 - 158974,76	0,69	0,98
<i>Anticarsia gemmatalis</i> / AgMNPV	64882,20	5393,37- 173936,80	0,67	2,99

\*CL<sub>50</sub> : Concentração letal média de poliedros (OB/ml) necessária para matar 50% da população de insetos em teste.

Similarmente ao observado para CL<sub>50</sub>, a variação do tempo letal (TL<sub>50</sub>) determinado foi muito pequena entre os vírus testados em uma mesma concentração

viral. Como o esperado, observou-se, para ambos os vírus, uma diminuição gradativa no tempo letal (TL<sub>50</sub>) com o aumento das concentrações virais testadas (Tabela 4).

**Tabela 4** Tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) para larvas *A. gemmatalis* infectadas oralmente com poliedros dos vírus vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* e AgMNPV. Método de Probit.

<b>Virus</b>	<b>Concentration (OB/ml)</b>	<b>*TL<sub>50</sub> (dias)</b>	<b>LF 95%</b>	<b>Slope</b>	<b>χ<sup>2</sup></b>
<b>vAgp2100Cf.v-<i>chiA/v-cath</i></b>	90000	7,26	6,61-8,36	15,25	17,30
	270000	6,89	6,33-7,72	16,53	15,05
	810000	6,30	5,97-7,03	19,96	16,56
	2430000	6,22	4,57-6,73	26,44	9,93
	7290000	5,92	5,40-6,44	24,26	10,88
<b>AgMNPV</b>	90000	7,32	6,56-8,72	14,98	16,14
	270000	7,91	7,04-9,73	12,18	25,08
	810000	6,54	6,16-7,06	21,82	11,72
	2430000	6,26	6,05-6,47	25,36	4,35
	7290000	5,95	5,42-6,52	24,32	12,36

\*TL<sub>50</sub> : Tempo letal médio de poliedros (OB/ml) necessário para matar 50% da população de insetos em teste.

Com relação ao tempo médio de morte (TM), os valores revelaram que o dois vírus nas diferentes concentrações testadas não chegaram a atingir um dia de diferença do tempo necessário para que as larvas testadas morram (Tabela 5).

As taxas de mortalidade larval determinadas mostraram um aumento progressivo das porcentagens à medida que as concentrações foram aumentadas em ambos os vírus. A maior diferença observada foi na concentração  $2,7 \times 10^5$  OB/mL em que o vírus vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* apresentou uma mortalidade de 11 % maior que o vírus AgMNPV.

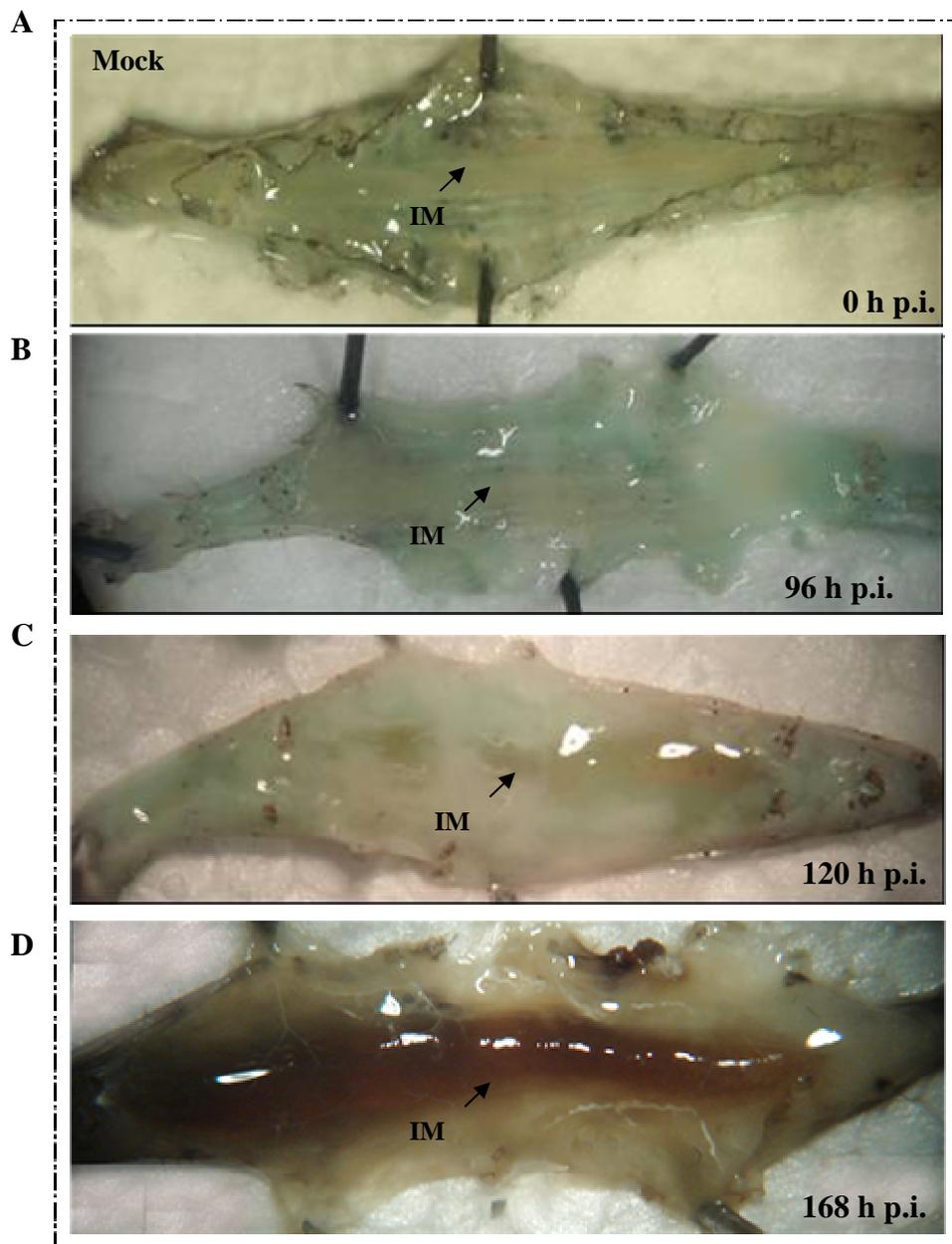
**Tabela 5:** Mortalidade e tempo de morte de larvas *A. gemmatalis* infectadas oralmente com o recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* e com o AgMNPV nas diferentes concentrações de poliedros

<b>Vírus</b>	<b>Concentração (OB/ml)</b>	<b>Número de larvas mortas</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>*Tempo médio de morte (dias)</b>
<b>vAgp2100Cf.v-<i>chiA/v-cath</i></b>	90000	18,33	61,10	7,00
	270000	21,00	70,00	7,04
	810000	23,67	78,90	6,63
	2430000	26,67	88,90	6,67
	7290000	28,00	93,33	6,35
<b>AgMNPV</b>	90000	18,00	60,00	6,68
	270000	17,67	58,90	6,65
	810000	23,34	77,80	6,29
	2430000	25,67	85,56	6,66
	7290000	27,00	90,00	6,16

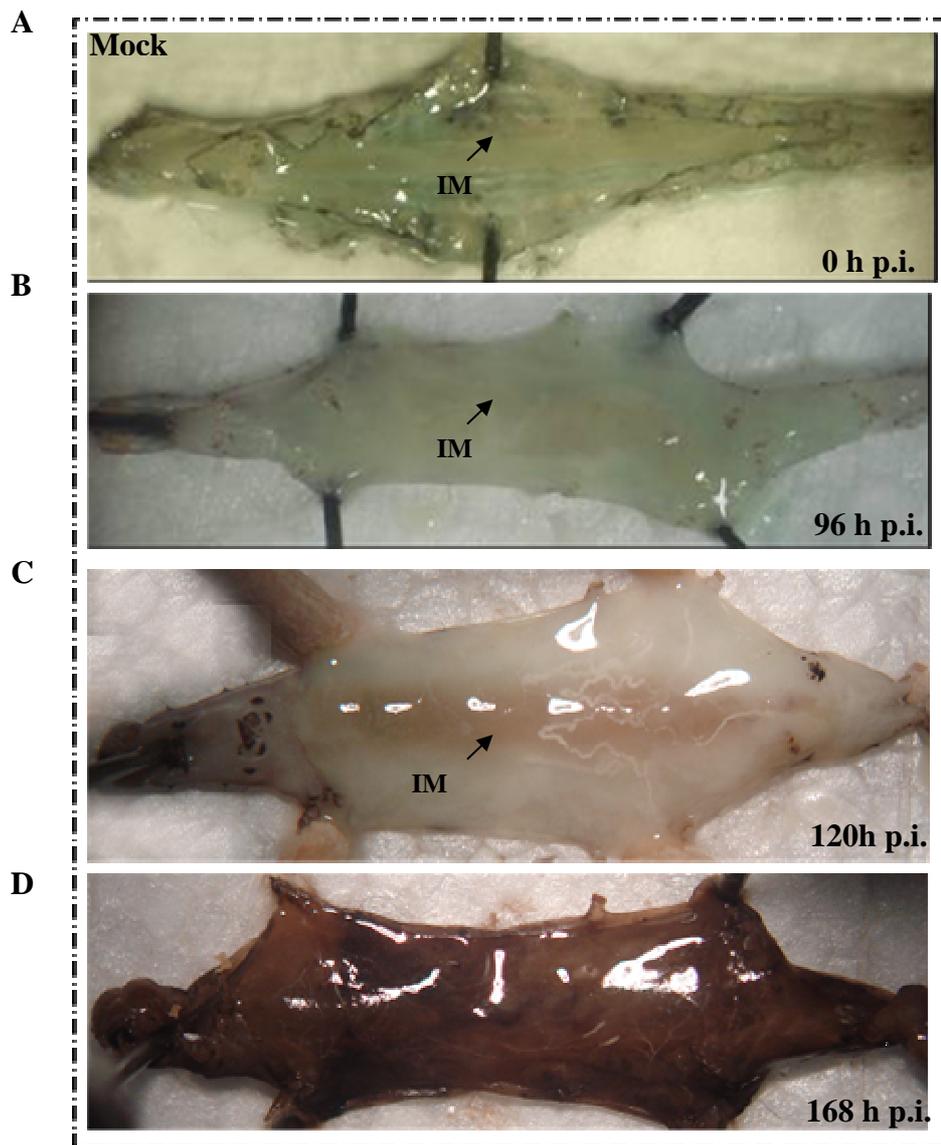
\*Tempo médio de morte: média do tempo necessário para que os insetos testados morram

### **5.8 Análise da liquificação e da estrutural dos tecidos das larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas com AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath***

Larvas de *A. gemmatalis* inoculadas, via oral, com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* foram dissecadas e as estruturas dos órgão internos foram observados. Larvas não infectadas (mock) apresentavam seus órgãos internos intactos como esperado. Nas larvas infectadas com o baculovírus selvagem AgMNPV os seus tecidos internos estavam aparentemente intactos, e não foi observado a melanização e a degradação da cutícula do corpo das larvas. (Figura 30). Enquanto as larvas infectadas com o vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* apresentaram os seus órgãos internos completamente derretidos, também apresentaram uma notável melanização e degradação da cutícula do corpos das larvas apartir de 168 h p.i. (Figura 31)



**Figura 30:** Análise estrutural dos tecidos internos das larvas de *A. gemmatalis* infectadas com o vírus aelvagem AgMNPV nas diferentes horas após infecção. (A) Larva não infectada (Mock), 0 h p.i. (B) Larva infectada com AgMNPV a 96 h p.i., (C) 120 h p.i. e (D) 168 h p.i. IM – Intestino médio.



**Figura 31:** Análise estrutural dos tecidos internos das larvas de *A. gemmatalis* nas diferentes horas após infecção. (A) Larva não infectada (Mock), 0 h p.i. (B) Larva infectada com vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* a 96 h p.i., (C) 120 h p.i. e (D) 168 h p.i. IM – Intestino médio.

Ao longo dos bioensaios analisados foi possível observar o efeito causado pela inserção dos genes *v-chiA* e *v-cath* no baculovírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Todas as larvas mortas por esse vírus apresentaram no final da infecção a degradação da cutícula do seu corpo, caracterizados por uma massa líquida viscosa e pela melanização da cutícula das larvas caracterizada por uma coloração preta (Figura 32). Ao contrário, as larvas infectadas com o vírus selvagem AgMNPV não apresentaram melanização e degradação da cutícula o corpo da larva no final da

infecção, somente com aproximadamente 10 dias após a infecção as larvas infectadas com o vírus selvagem começaram a apresentar uma aparência escura (melanizada) com o corpo seco, provocado pelo processo natural de decomposição do corpo da larva após a sua morte (Figura 32). Este resultado sugere que a ausência dos genes *v-chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus selvagem AgMNPV está associada com a perda da capacidade do vírus de liqüefazer as larvas infectadas.



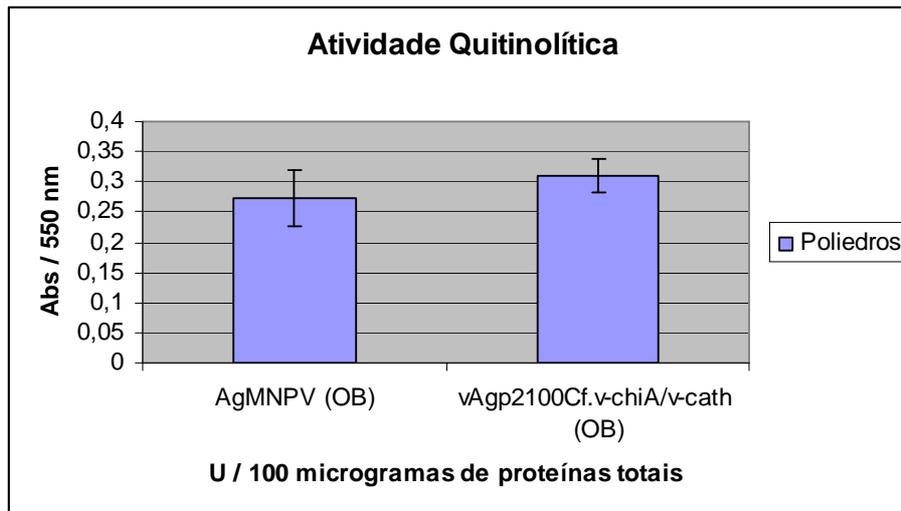
**Figura 32:** Larvas de *A. gemmatilis* infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* com diferentes h p.i.. (A) Análise da estrutura externa do corpo das larvas infectadas com diferentes h p.i. (B) Larvas infectadas com o recombinante a 168 h p.i., apresentando o corpo liquefeito e a cutícula melanizada.



**Figura 33:** Larvas de *A. gemmatalis* infectadas com o vírus AgMNPV com 10 dp.i. Aparente melanização da cutícula ocorrido devido ao processo natural de decomposição da larva após sua morte.

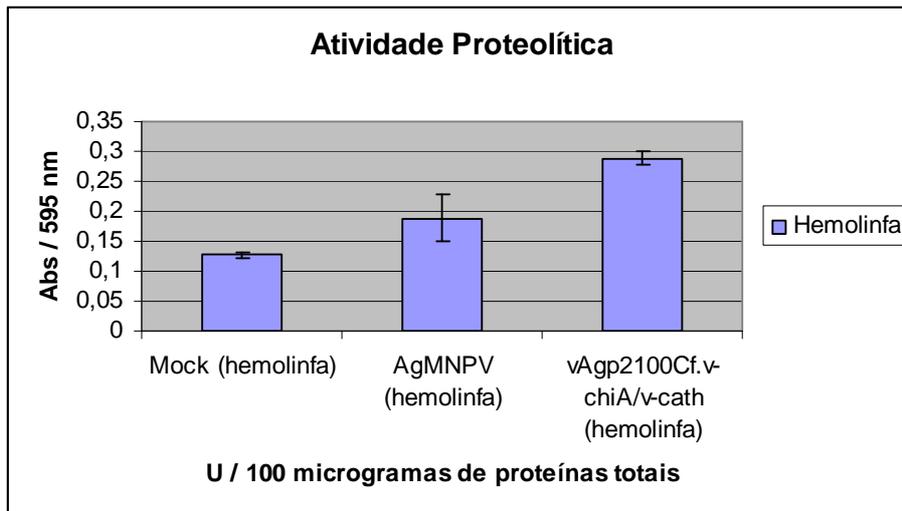
## 5.9 Ensaio enzimático

A atividade quitinolítica foi analisada a partir dos poliedros purificados dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, utilizando o método DNS (Miller, 1995), onde foi mensurada a quantidade de açúcar redutor liberado da quitina, a uma absorvância de 550 nm. O resultado apresentado na figura 34 mostra a quantidade de açúcar que foi reduzido entre os dois vírus testados, não apresentando grande diferença.

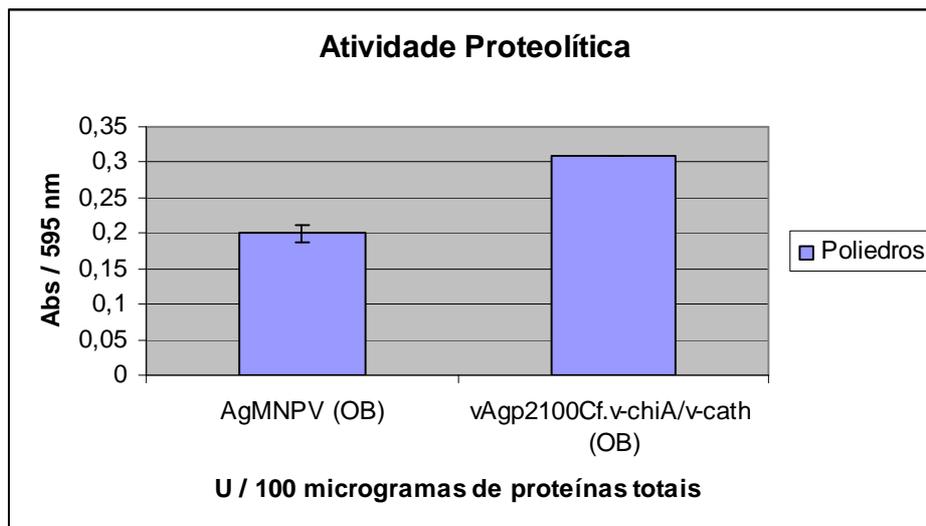


**Figura 34:** Atividade quitinolítica detectada nos poliedros produzidos pelos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* a uma absorbância de 550 nm. Resultados similares foram obtidos em três experimentos independentes.

Mensuramos a atividade proteolítica a partir da hemolinfa de larvas infectadas com os vírus AgMNPV, vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*, e larvas não infectadas (mock), assim como, dos poliedros purificados a partir dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* utilizando um substrato específico (queratina azulada) para detectar a atividade de proteases. O resultado apresentado na figura 35 mostrou que a atividade proteolítica detectada na hemolinfa do vírus recombinante e do selvagem, apresentou uma atividade semelhante, enquanto na hemolinfa coletada de larvas não infectadas (mock) detectou-se a atividade proteolítica um pouco menor comparada com a hemolinfa infectada com os vírus. Não foi possível observar diferenças significativas entre a atividade proteolítica detectada nos poliedros dos vírus selvagem e recombinante (Figura 36).



**Figura 35:** Atividade proteolítica detectada na hemolinfa extraída de larvas infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath*, a uma absorvância de 595 nm. Resultados similares foram obtidos em três experimentos independentes.



**Figura 36:** Atividade proteolítica detectada nos poliedros produzidos pelos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA/v-cath* a uma absorvância de 595 nm. Resultados similares foram obtidos em três experimentos independentes.

## 6. Discussão

No presente trabalho, foram estudados os efeitos causados pelos genes virais quitinase e catepsina, onde as características tais como a melanização e a degradação da cutícula no corpos das larvas testadas foram mostrados. Esses genes foram obtidos a partir de dois baculovírus: o AcMNPV e o CfDefNPV. Ambos possuem uma região genômica altamente conservada, que acomoda esses dois genes, entre as espécies pertencentes ao grupo I dos NPV (Ayres *et alli*, 1994; Lauzon *et alli*, 2005).

O gene viral catepsina foi primeiro identificado na ORF 127 de 966 pb no genoma do baculovírus AcMNPV durante a análise da seqüência de nucleotídeos da região a montante do gene *gp67*. Esta ORF apresenta homologia com uma cisteíno-protease da família papaína como uma catepsina viral ou *v-cath* (Slack *et alli*, 1995). Em 1995, Hill e colaboradores, também identificaram um gene *v-cath* no genoma do baculovírus CfMNPV apresentando 80 % de identidade com relação a seqüência de aminoácidos do AcMNPV e 88,6 % de identidade com a catepsina viral encontrada no genoma do CfDefNPV (Lauzon *et alli*, 2005). Ayres *et alli* (1994), identificaram a ORF 126 de 1656 pb no genoma do AcMNPV que corresponde ao gene quitinase e que se assemelha com a de outros organismos, principalmente com a de *Serratia marcescens*, uma bactéria do solo gram-negativa (57 % de identidade; 88 % de similaridade). O gene *v-chiA* do CfDefNPV possui 79,3 % de identidade com o gene *v-chiA* do AcMNPV.

Em 2005, Lauzon e colaboradores, apresentaram o mapeamento e a organização genômica do baculovírus CfDefNPV comparando com outras espécies de baculovírus. Construíram mapas físicos, baseado do perfil de restrição do genoma do CfDefNPV com a enzima de restrição *HindIII*. No perfil de restrição apresentado, a

presença de um fragmento de 3.236 pb, denominado *HindIII*-Q, foi clonado em um vetor e posteriormente seqüenciado, indicando a presença de dois genes: *v-chiA* e *v-cath*. O plasmídeo pCfDefNPV*HindIII*Q (3.236 bp) utilizado neste trabalho visando a obtenção dos genes *v-chiA* e *v-cath* a partir do baculovírus CfDefNPV, cedido pelo Dr. Arif Basil (Natural Resources Canadá), correspondia exatamente a esses dois genes após digestão com a enzima de restrição *HindIII*.

Antes da conclusão do seqüenciamento do baculovírus AgMNPV (Oliveira *et alli*, 2006), estudos prévios já indicavam a ausência desses dois genes próximo ao locus do gene *gp64*, no genoma do baculovírus AgMNPV (Slack *et alli*, 2004). Alguns estudos sugerem que o gene *v-chiA* está funcionalmente ligado à expressão do gene *v-cath*, de maneira que na ausência do gene *v-chiA* do AcMNPV, a proV-CATH (precursor da forma ativa da proteína V-CATH) do AcMNPV, não é processada na sua forma madura, formando agregados insolúveis dentro das células infectadas (Hawtin *et alli*, 1997; How & Volkman, 2000). A partir do seqüenciamento completo do genoma do AgMNPV foi possível comprovar a ausência desses dois genes (Oliveira *et alli*, 2006).

Para analisar uma possível degradação e melanização da cutícula das larvas de *A. gemmatalis*, foram construídos neste trabalho dois plasmídeos carregando os genes *v-chiA* e *v-cath* obtidos a partir dos vírus AcMNPV e CfDefNPV pela inserção desses genes no vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005), que além de conter um fragmento do gene da poliedrina e o seu promotor, facilita a detecção e o isolamento dos vírus recombinantes. A intenção de construir vírus recombinantes pela inserção de genes tem sido realizada com o objetivo de aumentar a virulência dos vírus contra seus insetos hospedeiros, além de expressar proteínas heterólogas em cultura de células de insetos (Hammock *et alli*, 1990; Jarvis *et alli*, 1997; Moscardi, 1998; Castro *et alli*,

1999). Neste trabalho, a construção do vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* ocorreu entre o DNA do plasmídeo p2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e o DNA do baculovírus deficiente no gene da poliedrina (vAgGalA2), onde foi possível isolar o vírus recombinante pela presença de poliedros produzidos. Algumas explicações para não termos obtido sucesso na construção do vírus recombinante com os genes retirados do AcMNPV, pode ter sido devido a concentração utilizada da solução lipossômica, quantidade ideal de células ou até mesmo problemas relacionados à concentração dos materiais, levando em consideração a dificuldade de se construir um vírus recombinante pelo método de recombinação homóloga uma vez que a proporção de vírus recombinantes produzidos após a co-transfecção é por volta de 0,1 a 1 % com relação ao vírus parental (Kitts *et alli*, 1990).

As estratégias utilizadas neste trabalho para confirmar a inserção desses dois genes no genoma do baculovírus AgMNPV foram bem sucedidas, onde confirmou-se por PCR a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes v-*chiA* e v-*cath*, além da detecção do fragmento de tamanho esperado para os dois genes (v-*chiA* e v-*cath*) por *Southern-blot* apenas no DNA genômico do vírus recombinante construído (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*).

Os genes v-*chiAs* que pertencem aos baculovírus do gênero NPV são considerados genes virais tardios que codificam proteínas pertencentes a família de 18 quitinases (Saville *et alli*, 2004). Saville *et alli* (2002), mostraram que a mutação do motivo KDEL induz uma parcial redistribuição da quitinase tanto nos tempos iniciais quanto nos tempos tardios da infecção, sendo assim, a deleção do motivo KDEL ou substituição com resíduos de glicina permitiu que a quitinase se movimentasse através da via secretora, se acumulando no meio extracelular após 24 h. Um tempo mais detalhado da infecção indicou que a quitinase foi apenas detectada no meio de cultura

de células infectadas com o vírus *AcpolhchiA* (sem a deleção do motivo KDEL da quitinase) com 72-96 h p.i.. Slack, *et alli.* (1995), mostraram a expressão temporal da proteína V-CATH. Análise de *Western blot* confirmou a ausência da detecção da enzima antes de 22 h p.i., indicando que a expressão da *v-cath* é tardia e por isso, a catepsina pode contribuir com o processo de liquificação do tecido observado na patogênese durante a infecção.

As análises transcricionais dos genes *v-chiA* e *v-cath* por RT-PCR apresentaram um perfil eletroforético com vários fragmentos amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene. Tal fato pode ter ocorrido devido à baixa especificidade dos oligonucleotídeos na reação de RT-PCR. Para determinar a especificidade dos fragmentos obtidos pela RT-PCR, novas reações de PCR foram feitas com todos os fragmentos amplificados e purificados utilizando pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene: RTQUITCf (específico para a reação de RT-PCR do gene *v-chiA*) e QUITCf R (reverso do gene *v-chiA*), produzindo um fragmento esperado de aproximadamente 600 pb e RTCATHCf (específico para a reação de RT-PCR do gene *v-cath*) e CATHCf R (reverso do gene *v-chiA*) produzindo um fragmento também esperado de aproximadamente 570 pb. Estes resultados indicam que os genes estão sendo expressos na fase muito tardia (very late) da infecção de células UFL-AG-286.

Para avaliar com precisão a expressão dos genes *v-chiA* e *v-cath* em diferentes h p.i., sabendo que esses genes são expressos na fase muito tardia da infecção, está sendo desenvolvido para complementar os estudos deste trabalho a técnica de PCR em tempo real, porém os dados ainda não foram concluídos.

Segundo Hawtin *et alli* (1997), a deleção do gene *chiA* e *v-cath* do genoma do AcMNPV não teve nenhum efeito significativo na DL<sub>50</sub>. O baculovírus recombinante

com o gene *v-chiA* deletado apresentou na DL<sub>50</sub> 40 OB/larva, já o vírus com o gene *v-cath* deletado apresentou 31 OB/larva para matar 50 % das larvas de *T. ni*, quando comparados com o controle AcMNPV (29 OB/larva), por isso a DL<sub>50</sub> não foi significativamente maior entre os vírus recombinantes e selvagem. Os dados do tempo de sobrevivência (TS<sub>50</sub>) desses vírus recombinantes também não apresentaram diferenças significativas. Os valores da DL<sub>50</sub> obtidos com os vírus recombinantes, com os genes deletados, sugerem que eles não apresentam nenhuma função com relação à habilidade do vírus em infectar larvas de insetos, ou seja, esses dois genes não são essenciais para promover a replicação do vírus e por isso são considerados auxiliares.

Baculovírus recombinantes com grande potencial em degradar a membrana basal dos tecidos do inseto foram desenvolvidos pela expressão de proteases. Com o objetivo de introduzir o gene catepsina-L de *S. peregrina*, foi construído um AcMNPV recombinante, sob o comando do promotor *ie-1 (early)* e *p6.9 (late)*, reduzindo significativamente para 51 % o tempo de sobrevivência do inseto *H. virescens* assim como o consumo 26 vezes menor do alimento que o vírus selvagem (Harrison & Bonning, 2001). Em outro estudo, construíram um AcMNPV recombinante contendo o gene quitinase de *M. sexta* sob o comando do promotor da poliedrina apresentando uma velocidade maior de morte contra a larva *S. frugiperda* (75 h) comparado ao vírus selvagem (100 h) (Gopalakrishnan *et alli*, 1995).

Foi feito um estudo no nosso grupo de pesquisa com a construção de vírus recombinantes possuindo os genes catepsina-L de *S. peregrina* e quitinase derivada do fungo *M. anisopliae*, sob o comando dos promotores em tandem (*pXIV* e *pSyn*), onde observaram que o vírus recombinante contendo o gene catepsina foi mais virulento contra larvas entre o 3° e 4° ínstar de *S. frugiperda* quando comparado aos vírus selvagem e ao vírus recombinante contendo o gene quitinase (Welzel, 2006).

Neste trabalho, o vírus recombinante construído, contendo os genes *v-chiA* e *v-cath* sob o comando dos seus promotores originais, foi utilizado para observar os efeitos da infecção viral em larvas de *A. gemmatalis* por meio de bioensaios, assim como o vírus selvagem (AgMNPV). Bioensaios mostraram pela determinação da CL<sub>50</sub> que não existem diferenças significativas entre o vírus recombinante (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*) e o vírus selvagem com relação à patogenicidade.

Com relação ao tempo letal médio (TL<sub>50</sub>), as larvas de *A. gemmatalis* não se mostraram mais resistentes quando infectadas com o vírus vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*, apresentando um tempo médio de morte semelhante ao selvagem entre 6 e 7 dias após a infecção, quando infectadas oralmente. O tempo médio de morte também foi semelhante para vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e AgMNPV na mesma concentração, assim como os valores da mortalidade e da TL<sub>50</sub>. Na maior concentração testada, a mortalidade das larvas atingiu aproximadamente 90 %, para os dois vírus selvagem e recombinante.

Portanto, os parâmetros avaliados - concentração letal (CL<sub>50</sub>), tempo letal (TL<sub>50</sub>), tempo de morte (TM) e taxa de mortalidade (%) – não apresentaram diferenças significativas entre os vírus, selvagem e recombinante.

Alguns estudos demonstraram que a expressão dos genes *chiA* e catepsina-L do AcMNPV está envolvida na liquefação do corpo do inseto nos estágios finais da infecção, sendo reduzido a uma massa fluida e viscosa (Volkman & Keddie, 1990; Hom *et alli*, 2000). Baculovírus mutantes com o gene *v-cath* deletado não apresentaram liquefação do corpo de inseto (Slack *et alli*, 1995; Hawtin, *et alli*, 1997). Experimentos conduzidos *in vitro* confirmaram a produção de quitinase e catepsina em células infectadas com AcMNPV com *v-cath* deletado e AcMNPV com *chiA* deletado, respectivamente, sugerindo que quitinase e catepsina estão associados com a liquefação

de larvas infectadas. A cutícula do inseto pode ser degradar neste processo. A cutícula serve para proteger o inseto de infecções por patógenos, perigos físicos e dissecação (Hawtin *et alli*,1997).

Wang *et alli* (2005), construíram um mutante BmNPV com o gene *v-chiA* deletado (*BmchiA*<sup>-</sup>) e o efeito foi observado em cultura de células BmN e em larvas *B. mori*. Comparações citopatológicas de células infectadas com o mutante e com o vírus selvagem (BmNPV) mostraram que a deleção do gene *chiA* evidenciou a ausência de lise celular. Análise de SDS-PAGE sugeriram que a quantidade de poliedrina produzida pelo mutante *BmchiA*<sup>-</sup> foi 7 % menor comparado com células infectadas com o vírus selvagem. Nas larvas, os sintomas apresentados quando infectados com *BmchiA*<sup>-</sup> foi diferente de larvas infectadas com o selvagem, onde a hemolinfa estava clara e houve uma menor degradação do corpo do inseto morto.

Recentemente, foi relatado que alguns lepidópteros hospedeiros codificam ortólogos de *v-chiAs* (*BmChi-h*, Daimon *et alli.*, 2003), diante disso, Daimon *et alli* (2006) descreveram estudos comparativos entre quitinase de BmNPV e o ortólogo *BmChi-h*. A partir de BmNPVs recombinantes foram construídos com as formas nativa e modificada do *BmChi-h* sob o comando do promotor da poliedrina, deletando o promotor de *v-chiA* original. Com isso demonstraram que em cultura de células BmCHI-h foi secretado mais rapidamente comparado a V-CHIA do BmNPV, que ficou retido nas frações intracelulares das células infectadas, provavelmente devido a presença de do motivo KDEL de retenção C-terminal no retículo endoplasmático. Demonstraram também, que em larvas de *B. mori* infectadas com o BmNPV com o gene *v-chiA* deletado, a liquificação terminal do corpo das larvas e a ativação de cisteíno-proteases codificada pelo baculovírus não foram observadas.

A ausência de ambos os genes pode ser responsável pela não degradação da cutícula e melanização da cutícula de *A. gemmatalis*, após a morte, quando infectadas com o baculovírus selvagem AgMNPV (Oliveira *et alli*, 2006). Alguns estudos sugerem que outros genes possam estar envolvidos também nesse processo de liquificação de *T.ni* infectadas com AgMNPV, tais como o gene *fp25K* (Katsuma *et alli*, 1999; Katsuma *et alli*, 2004). Slack *et alli* (2004), injetaram BV em larvas de *T. ni* com o AgMNPV-2D e relataram a liquificação e a melanização da larva infectada, assim como em larvas injetadas com BV do AcMNPV (experimento não mostrado).

Os principais sintomas observados em larvas infectadas por baculovírus são a flácidez do corpo e a cutícula extremamente frágil. Nos tecidos internos, ocorre à degradação dos componentes protéicos da membrana basal e em alguns casos, dependendo do patógeno, ocorre à melanização e a degradação da cutícula (Hom *et alli*, 2000).

Neste trabalho, larvas foram observadas quando infectadas, via oral, com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*. Foi possível analisar a estrutura dos órgãos internos e externos das larvas infectadas. A melanização e a degradação da cutícula foi observada nos bioensaios com o vírus recombinante vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* a 168 h p.i. e não foi observado em larvas infectadas com o vírus selvagem AgMNPV. Estes resultados confirmam que a expressão dos genes v-*chiA* e v-*cath* em conjunto são capazes de promover os sintomas necessários para degradar e provocar melanização no corpo das larvas de *A. gemmatalis*.

Uma estratégia descrita na literatura para aumentar o nível de expressão de proteínas secretadas está na utilização de vetores de baculovírus com o gene quitinase deletado (Possee *et alli*, 1997). Quitinase é traduzida em uma proteína secretada apresentando importante função na maquinaria de transporte da proteína e

provavelmente demonstra alta competição entre as proteínas secretadas por recombinantes no início da via secretora (Thomas *et alli*, 1998). *v-cath* é sintetizada como uma proenzima inativa, que se acumula no retículo endoplasmático de células infectadas e é ativado pela clivagem proteolítica no final da infecção (Hom *et alli*, 2002). Estes autores propuseram um papel adicional a V-CHIA do AcMNPV, uma vez que atua também como uma chaperona molecular durante o processamento de proV-CATH.

Daimon *et alli* (2006), demonstraram que a atividade de cisteíno-protease foi menor nos extratos de células infectadas e na hemolinfa de larvas infectadas com *v-chiAD* (*v-chiA* deletado). Demonstraram também que a atividade de cisteíno-protease foi recuperada pela *v-chiA* de BmNPV dirigida pelo promotor da poliedrina, porém não foi recuperada pelo *BmChi-h*, que por sua vez está sob o comando dos seu promotor original, sugerindo então que BmCHI-h não é capaz de ativar V-CATH em células BmN e em larvas *B. mori*.

Estudos demonstraram também, a ausência de atividade enzimática específica para detecção de cisteíno-proteases (V-CATH) em cultura de células *T. ni* infectadas com o baculovírus AgMNPV (Slack *et alli*, 2004). A atividade proteolítica da V-CATH não foi detectada em células infectadas com o AgMNPV a 75 h p.i., ao contrário uma quantidade significativa de atividade proteolítica foi observada em células infectadas com o OpMNPV e AcMNPV. (Hawtin *et alli*, 1997; How & Volkman, 2000).

A atividade quitinolítica detectada a partir dos poliedros purificados do AgMNPV e *vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath* demonstrou que a quantidade de açúcar reduzido pela quitina e detectado pelo substrato DNS não apresentou diferenças significativas entre o vírus selvagem e o vírus recombinante construído neste trabalho, apesar de ter sido observado a atividade um pouco maior nos poliedros do vírus selvagem. O fato do

vírus selvagem, que atuou como controle negativo neste trabalho, detectar atividade quitinolítica a partir dos poliedros purificados de larvas infectadas com o vírus selvagem pode ser explicado devido à presença de endoquitinases produzidas pelas larvas (Kramer *et alli*, 1997).

Da mesma forma, a atividade proteolítica da hemolinfa das larvas infectadas com AgMNPV e vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath* e não infectadas, assim como, dos poliedros dos vírus, na presença do substrato queratina azulada, não demonstraram diferenças significativas entre os vírus testados. A detecção da atividade de proteases nos poliedros do AgMNPV e na hemolinfa de larvas infectadas com o AgMNPV provavelmente ocorreu devido a presença de proteases que são essenciais para as vias metabólicas tanto de procariotos como em eucariotos (Kramer *et alli*, 1997). Isso nos leva a concluir o fato dos genes *v-chiA* e *v-cath* estarem sob o comando de seus respectivos promotores, que não são considerados promotores fortes o suficiente para expressar as proteínas desses genes em grande quantidade, para analisar as atividades enzimáticas. Novos experimentos devem ser realizados para determinar os níveis exatos de atividades enzimáticas assim como o seu grau de especificidade. Variações no pH, nos tampões e na concentração das amostras podem favorecer a atuação da enzima a ser testada.

Os genes *v-chiA* e *v-cath* são considerados genes auxiliares, ou seja, apresentam alguma vantagem seletiva ao vírus, porém não são necessários para propagar a replicação viral em culturas de células ou insetos. Entretanto, a deleção de um desses genes pode comprometer o sintoma característico da presença dos dois genes, a liquidação (Slack, *et alli*, 1995; Hawtin *et alli*, 1997; Oliveira *et alli*, 2006).

Visando um estudo mais detalhado com relação à funcionalidade e expressão dos genes *v-chiA* e *v-cath* separadamente foram também construídos neste trabalho

outros plasmídeos (pAgGalCf.v-*chiA*, pAgGalCf.v-*cath* e pAgGalAc.v-*cath*), uma vez que vários relatos na literatura indicam que esse dois genes atuam em conjunto quando o objetivo é liqüefazer o corpo dos insetos hospedeiros. Entretanto ainda não foi possível construir os vírus recombinantes a partir desses plasmídeos construídos.

## 7. Conclusões e Perspectivas

A construção de um baculovírus recombinante com a inserção dos genes virais quitinase e catepsina no genoma do baculovírus AgMNPV pode estar relacionado com a capacidade de causar a liquificação do corpo das larvas de *A. gemmatalis* em conjunto, apresentando degradação e melanização da cutícula. Entretanto, análises de bioensaios devem ser conduzidas para verificar com precisão os parâmetros de mortalidade do vírus recombinante contra a lagarta da soja *A. gemmatalis*. Esses mesmo genes foram inseridos em um vetor de transferência (pAgGal) separadamente, visando a inserção no genoma do baculovírus AgMNPV.

Visando dar continuidade ao trabalho, pretende-se:

- Construir um baculovírus recombinante por co-transfecção, a partir do plasmídeo p2100Ac.v-*chiA*/v-*cath*, bem como a partir dos plasmídeos pAgGalCf.v-*chiA*, pAgGalCf.v-*cath*, pAgGalAc.v-*chiA* e pAgGalAc.v-*cath*;
- Isolar baculovírus recombinante contendo os genes v-*chiA* e v-*cath* do AcMNPV;
- Isolar baculovírus recombinantes AgMNPV contendo os genes v-*chiA* e v-*cath* para analisar o efeito individual de cada gene;
- Realizar bioensaios com larvas de *A. gemmatalis* utilizando os vírus a serem isolados, bem como realizar os ensaios enzimáticos;

## 8. Referências Bibliográficas

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

ALLEN, G.E.; KNELL, J.D. A nuclear polyhedrosis vírus *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity **The Florida Entomologist**, v. 60, p.233-240. 1977.

ALMEIDA, J.E.M & BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogenicos. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, v.20, p.30-33, 2001.

ANDRADE G.F.; NEGREIRO, C.C.M.; FALLAIROS F.M.Â. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por baculovírus Anticarsia (AgMNPV). **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.71 (3), p. 391-398, 2004.

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

ARIF, B.M.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. & DOERFLER, W. The genome of *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus: molecular cloning and mapping of the *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI*, *XbaI* and *BglII* restriction sites. **Virus Research**, v.1, p.605-614, 1984.

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

BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.127-155, 1990.

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

BRAVO, A. & QUINTERO, R. Importância y Potencial del *Bacillus thuringiensis* em el Control de Plagas. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. **Red de Cooperation Técnica em Biotecnologia Vegetal (REDBIO)**, p.55, 1993.

BREWER, J.M. Alfalfa Looper (*Autographa californica*). **University of Wyoming**, B-1013.2, Abril, 1995.

CASTRO M.E.B.; SOUZA, L.M.; SIHLER W.; RODRIGUES M.C.J. & RIBEIRO M.B. Biología Molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34 (10), p.1733-1761, 1999.

CLEM, R.J.; FECHHEIMER, M.; MILLER, L.K. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, v.254, p.1388-1390, 1991.

CLEM, R.J.; ROBSON, M.; MILLER, L.K. 1994. Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94*. **Journal Virology**, v.68, p.6759-6762, 1994.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Disponível em:** <<http://www.conab.gov.br>>. **Acesso em:** 04 de Fev. 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Soja - Dados Econômicos. **Disponível em:** <<http://www.conab.gov.br>>. **Acesso em:** 28 de Jul. 2007.

DAIMON, T.; HAMADA, K.; MITA, K.; OKANO, K.; SUZUKI, M.G.; KOBAYASHI, M.; SHIMADA, T. 2003. A *Bombyx mori* gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v.33, p.749-759, 2003.

DAIMON, T.; SUSUMU, K.; KANG, W. & SHIMADA, T. Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h. **Biochemical and Biophysical research Communication**, 2006.

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

FEDERAÇÃO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA ESTADO DE MATO GROSSO. Soja é mutio mais que óleo de cozinha. **Disponível em:** <<http://www.famato.org.br/soja>>. **Acesso em:** 20 jan. 2008.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. p. 33-59. In: Lois K. Miller. The baculoviruses. New York; **Plenum Press**. p.447, 1997.

FERRAZ, L.C.C.B. As meloginoidoses das soja: passado, presente e futuro. In: Silva, J.F.V. (Org). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: **Embrapa Soja e Sociedade Brasileira de Nematologia**, p.15-38, 2001.

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

FINNEY, D.J. Probit Analysis. **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, England. 1978.

FUNK, C.J.; BRUNAGEL, S.C. & ROHRMANN, G.F.. Baculovirus structure. In: Miller, L. K. (Ed.). The baculoviruses. **New York: Plenum Press**, 7-32, 1997

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.D.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.

GHOSH, S.; PARVEZ, K.M.; BANERJEE, K.; SARIN, S.K. & HASNAIN, S.E. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. **Molecular Therapy** v.6 (1), p.6-11, 2002.

GOPALAKRISHNAN, B.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v.25, p.255-265, 1995.

GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A. (Eds). The biology of baculoviruses. **Boca Raton: CRC**, v 1. 1986.

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

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

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

HAAS-STAPLETON, E.J.; WASHBURN, J.O. & VOLKMAN, L.E. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M *Nucleopolyhedrovirus* occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Virology**, v.78, p.6786-6791, 2004.

HALLWASS, M. Uso do bioinseticida baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple *nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) como vetor de expressão de proteínas com interesse fitopatológico e como sistema biológico para análise da interação vírus/hospedeiro. **Dissertação de Mestrado** – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília 2005.

HAMMOCK, B.D.; BONNING, B.; POSSEE, R.D.; HANZLIK, T.N.; MAEDA, S. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. **Nature** v.344, p.458-461, 1990.

HARRISON, R.L. & BONNING, B.C. Use of Proteases to Improve the Insecticidal Activity of Baculoviruses. **Biological Control** v.20, p.199-209, 2001.

HAWTIN, R.E.; ARNOLD, K.; AYRES, M.D.; ZANOTTO, P.M.; 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** v.238, p.243-253, 1995.

- HAWTIN, R.E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; KUZIO, J.A; POSSEE, R.D. 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology** v.238, p.243-253,1997.
- HERNIOU, A.E.; OLSZEWSKI, A.J.; O'REILLY, R.D. & CORY, S.J. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**. p.3244-3251, 2004.
- HILL, E.J.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. Identification and characterization of the *v-cath* gene of the baculovirus, CfMNPV. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1264, p.275-278, 1995.
- HILTON, S. & WINSTANLEY, D. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella granulovirus* genome. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1496–1504, 2007.
- HOM, G.L.; VOLKMAN, E.L. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus *chiA* is required for processing of V-CATH. **Virology** v.277, p.178-183, 2000.
- HOM, G.T.; OHKAWA, T.; TRUDEAU, D. & VOLKMAN, E.L. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus ProV-CATH is activated during infected cell death. **Virology**, v.296, p.212-218, 2002.
- HORTON, M.H. & BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-driven baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v.67, p.1860-1868, 1993.
- HUGHES, A.L. & FRIEDMAN, R. 2003. Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculovirus. **Molecular Biology and Evolution** v.20, p.979-987, 2003.
- JARVIS, D.L. Baculovirus expression vectors. In L.K. Miller (ed.) *The Baculoviruses*. **Plenum Press**, New York p.389-431, 1997.
- JEHLE, A.J.; BLISSARD, W.G.; BONNING, C.B.; CORY, S.J.; HERNIOU, A.E.; ROHRMANN, F.G, THEILMANN, A.D.; THIEM, MS. & VLAK, M.J. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v.151, p.1257-1266, 2006.
- JOHNSON, D.W. & MARUNIAK, J.E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology** v.70, p.1877-1883, 1989.
- JONG G.J.; LAUZON, M.A.H.; DOMINY, C.; POLOUMIENKO, A.; CARSTENS, B. E.; ARIF, M.B. & KRELL J.P. Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v.86, p.929-943, 2005.

KAMITA, S.G.; NAGASAKA, K.; CHUA, J.W.; SHIMADA, T.; MITA, K.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S. & HAMMOCK, B.D. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. **Proceeding of the National Academy Sciences**, USA: v.102, p.2584-2589, 2005.

KATSUMA, S.; NOGUCHI, Y.; ZHOU, E.L.C.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S. Characterization of the *25KFP* gene of the baculovirus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: implications for post-mortem host degradation. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 783-791, 1999.

KATSUMA, S.; TANAKA, S.; SHIMADA, T. & KOBAYASHI, M. Reduced cysteine protease activity of the hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected with *fp25K*-inactivated *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus results in the reduced postmortem host degradation. **Archives of Virology**, v.149, p.1773-1782, 2004.

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

KRAMER, J.K.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. Mini-Review. **Insect Biochem. Molecular Biology**, v. 27 (11), p. 887-900, 1997.

LAUZON, M.A.H.; JAMIESON B.P.; KRELL, J.P. & ARIF M.B. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* genome. **Journal of General Virology** v.86, p.945-961, 2005.

LEE H.H & MILLER K.L. Isolation of Genotypic variants of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus. **Journal of Virology** v.27(3), p.754-767, 1978.

LU, A. & MILLER, L.K. Regulation of baculovirus late and very late expression. p.193-216. Ed: Lois K. Miller. The baculoviruses. New York; **Plenum Press**. p.447, 1997.

LUCKOW, V.L.; Lee, S.C.; Barry, G.F.; Olins, P.O. Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *E. coli*. **Journal of Virology**, v. 67, p. 4566-4579, 1993.

MARIA CREUZA DO ESPÍRITO SANTOS BARROS. Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovirus de Expressão. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências da Saúde - Patologia Molecular, Universidade de Brasília 2007.

MARUNIAK, A.G; MARUNIAK, J.E; ZANOTTO, P.M.A.; DOUMBOYA, A.E.; LIU, J.; MERRITT, T.M.; LANOIE, J.S. Sequence Analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer Nucleopolyhedrovirus*. **Journal of Virology**. v.78, p.7036-1051. 2004.

MERZENDORFER, H. & ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v.206, p.4393-4412, 2003.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31 (3), p.426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>> Acesso em: 02 e fev 2008.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PARO, F.E. & SOLDORIO, I.L. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV- susceptible and resistant strains of the insect. **Biological Control**, v.20, p.247-253. 2001.

MOSCARDI, F & SOUZA, M. L. Baculovírus para o controle de pragas, **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v.24, p.22-29, 2002.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: **FEALQ**, p. 509-539, 1998.

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

O'REILLY, D.R, MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. Baculovirus Expression Vectors: A laboratory Manual. **New York W.H. Freeman and Company**, 1992.

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

O'REILLY, D.R. Auxiliary genes of baculoviruses. In *The Baculoviruses*, p. 267-300. Edited by L.K. Miller. **New York: Plenum.**, 1997.

OHKAWA, T.; MAJIMA, K. & MAEDA, S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.68, p.6619-6625. 1994.

OLIVEIRA, C.V.J; WOLFF, C.L.J.; MARUNIAK-GARCIA, A.; RIBEIRO, B.M.; CASTRO, B.E.M.; SOUZA, L.M.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, E.J. & ZANOTTO, A.M.P. 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** v.87, p.3233-3250, 2006.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli*  $\beta$ - galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology** v.4, p.399-406, 1984.

- POSSEE, R.D. Baculoviruses as expression vectors. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.569-572, 1997.
- RAMACHANDRAN, A.; BASHYAM, M.D.; VISWANATHAN, P.; GHOSH, S.; SENTHIL, K.M.S. & HASNAISN, S.E. The bountiful and baffling baculovirus: The story of polyhedron transcription. **Current Science** v.81 (8), p. 998-1010, 2001.
- RIBEIRO, B.M, & PINEDO, F.J.R. Baculovirus recombinante para controle de praga. **Biociencia: Ciência e Desenvolvimento** v.22, p.50-58, 2001.
- RIBEIRO, B.M, SOUZA, M.L.; KITAJIMA E.W. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, B.S. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, Unesp, p.481-503, 1998.
- RIBEIRO, M.B.; GATTI, C.D.C; COSTA, H.M.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, E.J.; POSSEE, D.R. & ZANOTTO, A.M.P. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the  $\beta$ -galactosidase gene. **Arch Virol**. v.146, p.1355-1367, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory manual, 2 ed. **Cold Spring Harbor, NY**.: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- SAVILLE, G.P.; THOMAS, C.J.; POSSEE, R.D.; KING, L.A. Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells companies mutation f the carboxy-terminal KDEL ER-retrieval motif. **Journal of General Virology** v.83, p.685-694, 2002.
- SAVILLE, P.G.; PATMANIDI, L.A.; POSSEE, D.R. & KING A.L. Deletion of the *Autographa californica* nucleopolyedovirus chitinase KDEL motif and in vitro and in vivo analysis of the modified virus. **Journal of General Virology**, v.85, p.821-831, 2004.
- SIEBURTH, P.J. & MARUNIAK, J.E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) *In Vitro Cellular & Developmental Biology* v.24, p.195-198, 1988.
- SLACK, J.M, RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L. 2004. The gp64 locus of *Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks *v-cath* and *ChiA* genes. **Journal of General Virology** v.85, p.211-219, 2004.
- SLACK, J.M.; FAULKNER, P. Characterization of *v-cath*, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology** v.76, p.1091-1098, 1995.
- SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedron and 10,000 molecular weight protein. **Journal of Virology** v.45, p.215-225, 1983.

SOUZA, M.L.S.; CASTRO, M.E.B.; SILHER, W.; RIBEIRO, Z.M.A.; MOSCADI, F. Caracterização de baculovírus utilizados no controle de pragas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento** v.24, p.18-20, 2002.

THEILMANN D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.A.; O'REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THEIM, S. & VLAK, J.M. BACULOVIRIDAE. IN: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (eds) **Virus Taxonomy – Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Springer, New York, p.1129-1185. 2005.

THOMAS, C.J.; BROWN, H.L.; HAWES, C.R.; LEE, B.Y.; MIN, M.K., KING, L.A.; POSSEE, R.D. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. **Journal of Virology** v.72, p.10207-10212, 1998.

THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *chiA* gene. **Journal of General Virology** v.81, p.1403-1411, 2000.

TURNIPSEED, G.S. & KOGAN, M. Ecology and Management of soybean arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.507-538, 1987.

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

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

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

VOLKMAN, L.E. & KEDDIE, B.A. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.1, p.249-256, 1990.

WANG, F.; ZHANG, X.C.; KUMAR, S.V. & WU, F.X. Influences of chitinase gene deletion from BmNPV on the cell lysis and host liquefaction. **Archives of Virology**. v.150, p. 981-990, 2005.

WELZEL, A. Baculovírus recombinante contendo genes de proteases são mais virulentos contra *Spodoptera frugiperda*. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências da Saúde - Patologia Molecular, Universidade de Brasília 2006.

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

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

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

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

ZHENG, Y.P; RETNAKARAN, A.; KRELL, P.J.; ARIF, B.M.; PRIMAVERA, M.; FENG, Q.L. Temporal, spatial and induced expression of chitinase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Insect Physiology**, v.49, p.241-247, 2003.