

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**

**Efeitos patológicos nos túbulos de Malpighi de *Anticarsia gemmatalis* causados pela infecção por recombinantes do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)**

**Bruno Arrivabene Cordeiro**

**Orientadora: Prof. Dra. Sônia Nair Bão**

**Co-orientador: Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

**Brasília, 2007**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dra. Sônia Nair Bão**

\_\_\_\_\_ (Orientadora)

**Dra. Eni Braga da Silveira**

\_\_\_\_\_ (Examinadora)

**Prof. Dra. Silene de Paulino Lozzi**

\_\_\_\_\_ (Examinadora)

**Dr. Francisco José Rivera Pinedo**

\_\_\_\_\_ (Suplente)

**Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB e com o apoio financeiro das seguintes instituições:**

**CNPq**

**CAPES**

**FINEP**

**PRONEX - FAP/DF**

**Este trabalho é dedicado à Professora Sônia e ao Professor Bergmann por suas orientações seguras, confiança e amizade ao longo dos anos de convivência no laboratório. Suas participações foram fundamentais para a realização deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus orientadores, **Sônia e Bergmann**, que sempre se dispuseram a me ajudar, tirar minhas dúvidas, dar sugestões sobre os meus projetos e acompanhar o andamento deles, apesar de todos seus compromissos. Obrigado pela confiança e incentivo ao longo de todos esses anos. Vocês têm toda a minha gratidão, admiração e respeito.

Aos **meus pais e familiares**, que sempre batalharam para que eu pudesse ter o melhor e que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e durante os altos e baixos da minha vida acadêmica.

À **Eni**, que me acompanhou durante a maior parte da minha vida acadêmica, confiou o meu trabalho a sua tese de doutorado e que me ensinou muito mais do que eu poderia imaginar sobre a prática da ciência e ser um cientista.

Ao meu amigo e colega de pesquisa, **Victor Tibúrcio**, pela confiança, dedicação e participação fundamental nesse trabalho de mestrado e por sua amizade e convivência.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Microscopia Eletrônica do grupo da Prof. Sônia: **Bruno F., João Victor, Elaine, Cláudia, Saulo, Carol, Larissa, Khesler, Shélida e Leonora**, pela convivência, apoio, horas de diversão e ajuda mútua.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Microscopia Eletrônica do grupo do Prof. Renato e do grupo do Prof. Bergmann: **Aline, Ana Paula, Nayara, Anabele, Maria, Tatiane, Paulo, Marcelo, Márcio Hedil, Gláucia, Greice, Pinedo, Hugo, Davi, Juliana, Roberto, Ramon e Virgínia**, pelas festas, reuniões, viagens, convivência e ajuda mútua. Em especial, à minha

namorada **Susane**, pelo carinho e apoio, principalmente nesta etapa final e que me deu uma razão a mais para ir ao laboratório todo dia.

Aos pesquisadores e amigos da Embrapa/CENARGEN: **Prof. Dra. Maria Elita, Prof. Dra. Marlinda, Érica, William, Zilda e Dulcy**, pela grande ajuda na fase inicial do projeto, pela gentileza em ceder ovos e larvas de *Anticarsia gemmatalis* e pela amizade.

Aos meus amigos da graduação, tanto da Biologia quanto de outros cursos, que muito influenciaram meu crescimento pessoal. Em especial, ao meu amigo **Carlos Maximiliano**, quem me trouxe para o laboratório de Microscopia Eletrônica, em primeiro lugar.

Aos meus **companheiros** e ao **Departamento de Pós-graduação em Biologia Molecular** da UnB.

À **Universidade de Brasília**, por ter me fornecido os fundamentos e as oportunidades necessários para a realização do Mestrado.

Por fim, agradeço a todas as pessoas, amigos, professores e familiares, que estiveram envolvidas nessa minha jornada, que se iniciou na graduação e termina uma de suas etapas agora, tornando realidade um de meus objetivos de vida.

Muito obrigado!

# CONTEÚDO

	pg.
Abstract .....	01
Resumo .....	02
Introdução .....	03
1) Baculovírus.....	03
1.1) Aspectos gerais e importância biotecnológica.....	03
1.2) Modo de infecção <i>in vivo</i> .....	05
1.3) Regulação da expressão gênica.....	07
1.4) Citopatologia da infecção.....	08
2) <i>Anticarsia gemmatalis</i> e o baculovírus AgMNPV.....	09
3) Túbulos de Malpighi.....	11
4) Ecdisona e EGT.....	15
5) Proteínas marcadoras: GFP e LacZ.....	17
Objetivos.....	19
Metodologia.....	20
1) Insetos e vírus.....	20
2) Infecção das larvas e isolamento dos túbulos de Malpighi.....	23
3) Procedimentos para observação da morfologia dos túbulos de Malpighi.....	23
3.1) Microscopia de luz (ML).....	23
3.2) Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	24
3.3) Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	24
4) Bioensaios.....	24
Resultados.....	25
1) Comportamento larval pós-infecção.....	25
2) Morfologia dos túbulos de Malpighi pós-infecção.....	26
2.1) Controles.....	26
2.2) <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AgMNPV).....	30
2.3) vAgp2100egfp.....	35
2.4) vAgEGTΔegfp.....	40
2.5) vAgGalA2.....	45
2.6) vAgEGTΔ-lacZ.....	50
3) Bioensaios.....	56
Discussão.....	58
Conclusão.....	69
Referências bibliográficas.....	70

## Índice de Figuras e Tabelas

	pg.
<b>FIGURA 1</b>	<b>06</b>
<b>FIGURA 2</b>	<b>07</b>
<b>FIGURA 3</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 4</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 5</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 6</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 7</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 8</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 9</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 10</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 11</b>	<b>42</b>
<b>FIGURA 12</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 13</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 14</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 15</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 16</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 17</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 18</b>	<b>58</b>
<b>TABELA 1</b>	<b>55</b>
<b>TABELA 2</b>	<b>58</b>

## ABSTRACT

The Malpighian tubules constitute the main excretion organ of insects. Its functions go beyond excretion and may play a role in detoxification and immune defense of the insect. The infection by baculoviruses with their *egt* gene deleted in lepidopteron larvae promotes an early degeneration of the tubules with consequent better baculovirus activity resulting in reduction of the larvae time of death. However, there was no trace of infection in the tubules cells. The *ecdysteroid udp-glucosyltransferase (egt)* gene encodes the EGT enzyme, which is responsible for the transfer of UDP-galactose or UDP-glucose units to the ecdisone, inactivating it. Using AgMNPV recombinant baculoviruses containing *egfp* or *lacZ*, the alterations caused in the Malpighian tubules of *A. gemmatalis* were analyzed by light microscopy and transmission (TEM) and scanning (SEM) electronic microscopies. The relationship of the alterations observed with the absence of the *egt* gene and/or presence of a marker gene was verified. A bioassay was made to compare the baculoviruses activities among them. The infections by the baculoviruses caused visible alterations from 24 hours post-infection by light microscopy, being possible to observe the marker proteins in the tracheolar cells and regions of the tubules associated with them. As the infection advanced, the marker proteins appeared in higher proportions and the degeneration of the tubules increased. In TEM, a progressive increase was observed in the disorganization of the microvilli, alterations in cytoplasmic spaces, basal infolds and mitochondria, deformations in the basal lamina, apocrine secretions and cell death, accordingly to the progress of the infection. Meanwhile, in SEM, changes in the surface as a loose and parched aspect, reentrances, protuberances, pores and crystals, were observed according to the progression of infection. However, there was no trace of infection in the cells of the Malpighian tubules by the microscopic analyses. The results showed best activity for the baculoviruses containing *lacZ* compared to the ones containing *egfp* and the absence of *egt* implied in higher intensity and speed of the alterations. The mean time to death ( $LT_{50}$ ) calculated for the different baculoviruses revealed best activity of the recombinants containing *lacZ* but the recombinants containing *egt* were more pathogenic. Due to the absence of vestiges of infection in the tubules cells, it is believed that the degeneration of the tubules is provoked by infection indirectly. The cell death in the tubules might be related to oncosis, which may be activated by depletion of energy reserves and also related to apoptosis, which may be activated by accumulation of EGFP and LacZ. The absence of *egt* gene might be resulting in a higher energetic expense by the host, aggravating the cell death process that is taking place in the Malpighian tubules, resulting in reduction of host time of death.



## RESUMO

Os túbulos de Malpighi constituem o principal órgão excretor de insetos. Suas funções vão além da excreção, podendo participar da desintoxicação e resposta imune do inseto. A infecção por baculovírus com deleção em seu gene *egt* em larvas de lepidópteros promove uma degeneração precoce dos túbulos, com conseqüente melhor atividade do baculovírus, resultando em uma redução no tempo de morte das larvas. Porém, não são observados indícios de infecção nas células dos túbulos. O gene *ecdysteroid udp-glucosyltransferase (egt)* codifica a enzima EGT que é responsável pela transferência de unidades de UDP-galactose ou UDP-glicose para a ecdisona, inativando-a. Utilizando baculovírus AgMNPV recombinantes contendo genes marcadores *egfp* ou *lacZ*, analisou-se as alterações causadas nos túbulos de Malpighi de *A. gemmatalis*, utilizando microscopia de luz e eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV). Verificou-se a relação destas alterações com a ausência do gene *egt* e/ou presença de um gene marcador. Realizou-se um bioensaio para comparar a atividade dos baculovírus entre si. As infecções pelos baculovírus causaram alterações visíveis a partir de 24 horas pós-infecção em microscopia de luz, sendo possível observar as proteínas marcadoras presentes em células traqueolares e em regiões dos túbulos associadas às mesmas. Com o avanço da infecção, as proteínas marcadoras apresentaram-se em maiores proporções e a degeneração dos túbulos aumentou. Em MET, observou-se um aumento progressivo da desorganização das microvilosidades, alterações nos espaços citoplasmáticos, nas invaginações basais e mitocôndrias, deformações da lâmina basal, secreções apócrinas e morte celular, conforme o progresso da infecção. Por sua vez, em MEV, observou-se mudanças na superfície, a qual apresentou aspecto flácido e ressecado, reentrâncias, protuberâncias, poros e cristais conforme a progressão da infecção. No entanto, em nenhuma das análises por microscopia, observou-se indícios de infecção nas células dos túbulos de Malpighi. Os resultados mostraram uma melhor atividade dos baculovírus contendo *lacZ* em relação aos que contém *egfp*, sendo que a ausência de *egt* implicou em maior intensidade e velocidade das alterações. O tempo médio de morte (LT<sub>50</sub>) calculado a partir do bioensaio para os diferentes vírus revelou melhor atividade dos recombinantes contendo *lacZ*, sendo que o recombinante contendo *egt* se mostrou mais eficaz. Devido à ausência de indícios de infecção nas células dos túbulos, acredita-se que a degeneração dos mesmos é provocada indiretamente pela infecção. A morte das células dos túbulos pode estar relacionada à oncose, que pode ser provocada pela depleção das reservas energéticas, e também à apoptose, que pode ser ativada pelo acúmulo das proteínas marcadoras EGFP e LacZ. A ausência do gene *egt* pode estar resultando em um maior gasto energético pelo hospedeiro, agravando o processo de morte celular que está ocorrendo nos túbulos de Malpighi, resultando em redução no tempo de morte do hospedeiro.

# INTRODUÇÃO

## 1) Baculovírus

### 1.1) Aspectos gerais e importância biotecnológica

A família *Baculoviridae* é constituída de vírus de fita-dupla de DNA, contendo entre 90 e 200 pares de quilobases (pkb), com nucleocapsídeos na forma de bastão, que são envoltos por uma oclusão cristalina de origem protéica, formando “corpos de oclusão” (Arif, 1986). Os baculovírus têm sido isolados de mais de 700 invertebrados, principalmente das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera (Moscardi, 1999). Essa família é composta por dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus*, que são diferenciados inicialmente pelo tamanho e constituição protéica de seus corpos de oclusão.

Uma característica dos baculovírus é a presença de duas formas virais durante a infecção, vírus extracelulares (também conhecidos como BV, do inglês, “budded viruses”) e vírus ocluídos (também conhecidos como OV, do inglês, “occluded viruses”, ou OB, do inglês, “occlusion bodies”, ou ainda, poliedros ou grânulos). 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 (ODV, do inglês, “occlusion derived viruses”). A forma ocluída do vírus é produzida na última fase de infecção e sua matriz protéica forma um corpo de oclusão que protege o vírus no ambiente, sendo responsável pela transmissão horizontal da infecção de inseto para inseto por via oral. A forma do vírus extracelular, que compreende nucleocapsídeos com um envelope lipoprotéico, é produzida antes da forma ocluída, sendo responsável pela disseminação sistêmica da infecção dentro do inseto (Volkman & Keddie, 1990; Volkman *et al.*, 1995).

Os baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (também conhecidos como vírus da poliedrose nuclear, do inglês: “nuclear polyhedrosis virus” – NPV) produzem grandes corpos de oclusão (entre 0,15 e 15 µm) chamados de poliedros, constituídos principalmente pela proteína

poliedrina e que contêm múltiplos ou vários vírions. Os NPV podem ser encontrados possuindo partículas virais contendo mais de um nucleocapsídeo envolvido por um envelope simples (denominados de MNPV), ou ainda possuem partículas virais contendo somente um nucleocapsídeo por envelope (denominados de SNPV). Baseando-se em estudos filogenéticos de baculovírus, utilizando genes da poliedrina completamente sequenciados, os NPV foram classificados em tipo I e tipo II (Zanotto *et al.*, 1993).

Os baculovírus do gênero *Granulovirus* (também conhecidos como vírus da granulose, do inglês: “granulosis virus” - GV) têm corpos de oclusão menores (0,15 a 0,5 µm), chamados grânulos, constituídos principalmente pela proteína granulina e normalmente contêm um único vírion (Funk *et al.*, 1997). Tanto os NPV quanto os GV possuem um espectro de hospedeiros restrito, geralmente limitado a uma espécie ou gênero, sendo os GV mais específicos que os NPV (Moscardi, 1999).

O baculovírus mais estudado até o momento é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), que infecta um espectro de hospedeiros de aproximadamente 32 espécies em 15 famílias (Cory & Myers, 2003) e já possui seu genoma seqüenciado (Ayres *et al.*, 1994).

Os baculovírus constituem sistemas importantes para produção de proteínas heterólogas, funcionando como vetores tanto em células de inseto quanto em células de mamíferos (Kost *et al.*, 2005). Uma gama de proteínas de importância farmacêutica e econômica foram expressas, em níveis elevados, em células de insetos usando baculovírus como vetores de expressão (Jarvis, 1997; Kost & Condreay, 1999). As proteínas expressas nas células de inseto são, em sua maioria, biologicamente ativas e imunologicamente similares às proteínas originais (O'Reilly *et al.*, 1992). Os baculovírus são capazes de entrar em uma célula de mamífero e até mesmo induzir resposta imune (Aoki *et al.*, 1999), porém são incapazes de se replicar nessas células (Boyce & Bucher, 1996). Isso também coloca os baculovírus como importantes bioinseticidas, devido a sua especificidade, eficiência e segurança para outros seres vivos (Moscardi, 1999).

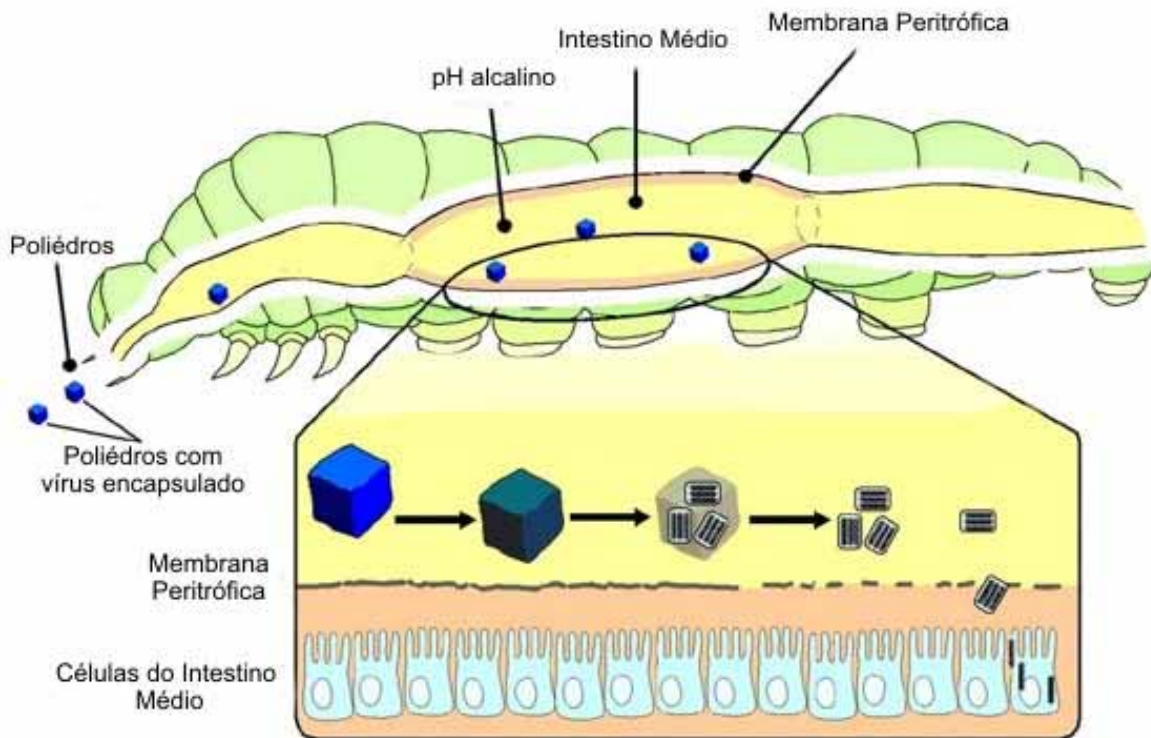
Devido a essas características, os baculovírus têm sido utilizados como vetores de terapia gênica, pois são capazes de levar seu material genético ao núcleo da célula sem se replicar ou causar efeitos citopáticos (Tani *et al.*, 2003), sendo assim, vantajosos em relação aos vetores baseados em vírus de mamíferos, pois possuem citotoxicidade baixa, que não afeta a viabilidade das células. No entanto, foi constatado que os baculovírus podem expressar alguns de seus genes *early* durante a transfecção em células de mamíferos (Murgues *et al.*, 1997). Apesar de não se replicarem, o acúmulo de polipeptídeos virais na célula pode causar uma resposta imune capaz de levar à destruição da célula-alvo. Estudos para avaliar melhor essa atividade viral pós-transfecção e construir novos recombinantes com os genes *early* deletados estão sendo realizados (Kenoutis *et al.*, 2006).

### **1.2) Modo de infecção *in vivo***

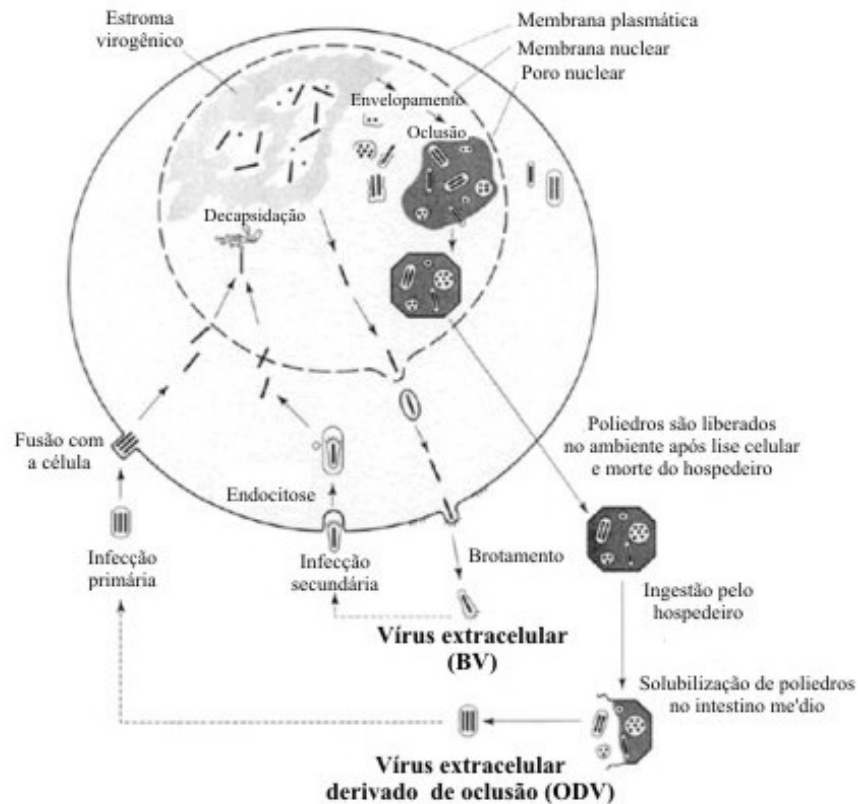
A rota natural de infecção ocorre pela ingestão de poliedros presentes no meio-ambiente. Uma vez dentro do ambiente alcalino do intestino da larva (pH 9,5 a 11,5), os poliedros são dissolvidos e as partículas virais são liberadas. Essas partículas entram nas células colunares do epitélio intestinal por fusão de membrana na região das microvilosidades (Harrap, 1970; Horton & Burand, 1993), após a ligação a um receptor específico facilitada pelo envelope lipoprotéico (Haas-Stapleton *et al.*, 2004). O vírus é então transportado via-citoesqueleto ao núcleo, onde ocorre transcrição pela maquinaria celular hospedeira, dando seqüência à replicação (Granados & Lawler, 1981) (Figura 1). Assim, os BV são formados na fase inicial da infecção, deixando as células do intestino, infectando outros tecidos até atingir a hemolinfa, onde infectam hemócitos, resultando em uma dispersão sistêmica do vírus (Keddie *et al.*, 1989). Uma outra rota de dispersão sistêmica, inclui a infecção direta de células da hemolinfa e da traquéia, sendo as últimas intimamente associadas com o epitélio intestinal. Isso permite que os vírus desviem da membrana basal, sem replicar em células do intestino, levando a infecção a diversas regiões do corpo (Engelhard *et al.*, 1994; Barret *et al.*, 1998). Posteriormente, outros órgãos e tecidos como adiposo, muscular e

tegumento são infectados (Keddie *et al.*, 1989). Em fase tardia de infecção, os poliedros são formados e acumulados no núcleo das células, causando lise nuclear e conseqüente lise celular. Isso desencadeia uma desorganização de órgãos e tecidos, o que leva a morte da larva, em cerca de 96 a 120 h p. i.; esse tempo pode variar dependendo do vírus e o hospedeiro infectado. O tegumento é degradado, liberando milhares de poliedros no ambiente (Payne, 1986) (Figura 2).

As lagartas são mais susceptíveis à infecção viral durante os primeiros estádios larvais. Os sintomas mais comuns da infecção por NPV incluem a perda de apetite, geotropismo negativo, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e diminuição do movimento (Federici, 1997).



**Figura 1.** Ciclo natural de infecção do gênero *Nucleopolyhedrovirus* em um hospedeiro lepidóptero em estágio larval (Martins, 2005).



**Figura 2.** Ciclo de infecção do gênero *Nucleopolyhedrovirus* em uma célula de inseto mostrando a produção de BV, ODV e poliedros.

Fonte: <http://www.chegue.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo1.gif> (com modificações).

### 1.3) Regulação da expressão gênica

A expressão gênica viral durante uma infecção com baculovírus pode ser dividida em dois estágios principais: etapa inicial (fase *early*), que corresponde aos eventos que precedem a replicação do DNA viral, e etapa tardia (fase *late*), correspondendo à expressão de genes pós-replicação do DNA viral. Podem existir ainda subdivisões representadas pelas fases “imediatamente precoce” (*immediately early*), correspondendo a genes expressos logo após a descapsidação viral, nas primeiras horas de infecção e “muito tardia” (*very late*), correspondendo a genes expressos após

18 h de infecção, sendo a poliedrina a proteína viral mais produzida nos NPV nessa fase (Maruniak, 1986).

A primeira fase da expressão gênica, a etapa *early*, corresponde aos eventos que precedem a replicação viral, expressando fatores de transcrição, principalmente. O DNA viral começa a ser transcrito, ocorrendo rearranjos do citoesqueleto e a cromatina da célula hospedeira se dispersa no núcleo. Esta fase se inicia a partir de 30 min pós-infecção (p. i.) e se estende até aproximadamente 6 h p. i. (Friesen, 1997).

A etapa *late* se inicia com a replicação do DNA viral, envolvendo a expressão de genes tardios e a produção de proteínas responsáveis pela construção das partículas virais extracelulares (BV), persistindo até aproximadamente 24 h p. i. Nessa fase, ocorre a parada da produção de proteínas celulares e a intensa produção de BV (Lu & Miller, 1997).

A fase muito tardia (*very late*) da expressão gênica viral inicia-se com 18 h p. i. e caracteriza-se pela produção da proteína poliedrina, que compõe a matriz protéica do OB durante sua montagem que ocorre no núcleo e pela produção da proteína P10, que forma agregados fibrilares no núcleo e citoplasma. E com aproximadamente 72 h p. i., ocorre a lise celular (Lu & Miller, 1997; Williams & Faulkner, 1997).

#### **1.4) Citopatologia da infecção**

Uma vez iniciada a replicação viral, após o vírus ter atingido o núcleo da célula e liberado seu material genético, ocorre hipertrofia nuclear, por volta de 6 h p. i., juntamente com arredondamento celular devido a reorganizações do citoesqueleto (Charlton & Volkman, 1991). Em torno de 10 h p. i., surge na porção central do núcleo o estroma virogênico, que serve como ambiente de montagem das partículas virais (Vaughn & Dougherty, 1985).

Por volta de 16 h p. i., ocorre o amadurecimento do estroma virogênico, apresentando um aspecto mais condensado e subcompartimentalizado, havendo grande quantidade de nucleocapsídeos (Summers, 1971). Por volta desse período, inicia-se também a produção de poliedrina e P10 no citoplasma. A poliedrina é acumulada no núcleo, enquanto a P10 organiza-se em acúmulos fibrilares no núcleo e citoplasma (Willians *et al.*, 1989). Os nucleocapsídeos participam da formação de BV, que saem do núcleo por vesículas originadas do envelope nuclear (Willians & Faulkner, 1997) e, em seguida, brotam da célula levando porções de membrana plasmática enriquecidas com glicoproteínas da superfície celular, que irão constituir o envelope viral juntamente com as porções de membrana (Volkman *et al.*, 1984; Volkman, 1986).

Após 24 h p. i., a produção de BV diminui, havendo um aumento na produção de poliedrina para a montagem de OB (Volkman *et al.*, 1976). A hipertrofia nuclear e a maturação do estroma virogênico levam ao aparecimento de uma região distinta, denominada *ring zone*. Nessa região, os nucleocapsídeos envelopados são incorporados em uma matriz de poliedrina, formando os OB (Stolz *et al.*, 1973; Vaughn & Dogherty, 1985).

Após 48 h p. i., os transcritos dos genes *p10* e *poliedrina* chegam a constituir 90% do total de RNA viral e, seus produtos correspondentes, 50% do total protéico celular. O final do ciclo infeccioso ocorre com a lise celular e liberação dos OB (Willians & Faulkner, 1997).

## **2) *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)**

A larva de *A. gemmatalis* (Hübner) é um inseto de grande interesse econômico, sendo o principal inseto-praga das plantações de soja no Brasil e na Flórida. Infestações ocorrem no final do verão e podem causar grandes danos às plantações de soja e outros legumes, se não manejada. Esta lagarta é capaz de desfoliar as plantas entre cinco e sete dias (Wilkerson *et al.*, 1986). *Glycine max*,



a planta da soja, é a hospedeira principal de *A. gemmatalis*, porém, a lagarta também se alimenta de amendoim, algodão, feijão e outros legumes (Waters & Barfield, 1989). Vários patógenos estão associados com *A. gemmatalis* no campo, como fungos e baculovírus, mas o principal fator de mortalidade em campo é a predação da lagarta por seus inimigos naturais (Lee *et al.*, 1990).

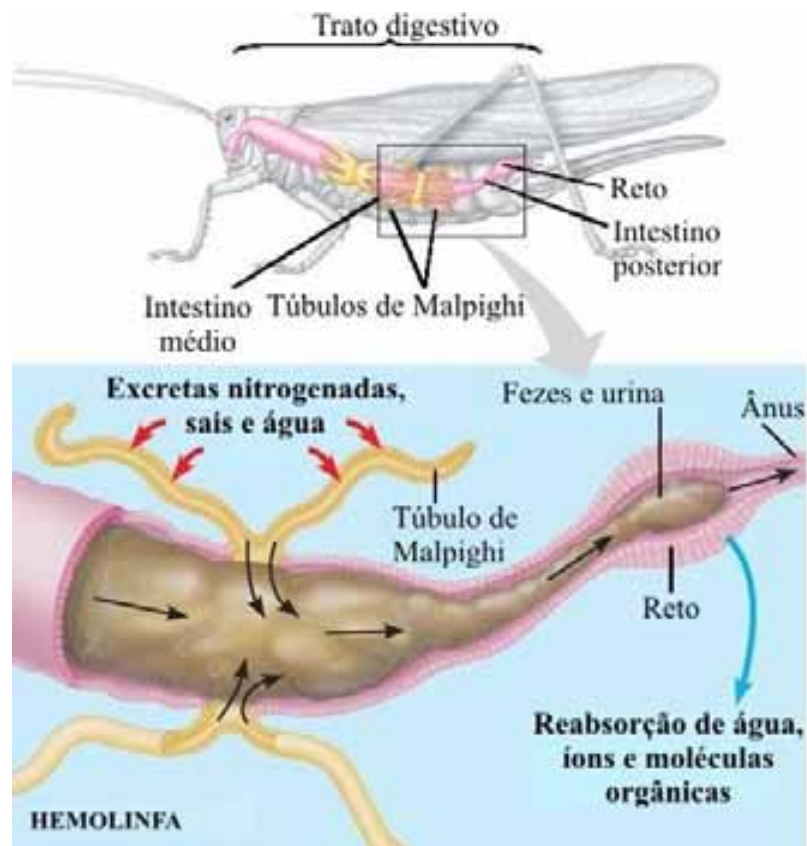
O *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi coletado e isolado pela primeira vez no Brasil em 1972 (Allen & Knell, 1977; Moscardi, 1986) apresentando resultado satisfatório em ensaios de campo como bioinseticida para *A. gemmatalis*. Desde 1979, o Brasil vem desenvolvendo um programa de controle biológico de pragas, utilizando o AgMNPV como um de seus bioinseticidas, pois é eficiente, específico e seguro para o homem e outros animais. Além disso, o uso do baculovírus representa uma redução nos custos de produção e diminuição do uso de agrotóxicos, havendo uma economia de milhões de dólares anuais e menor contaminação do meio ambiente com resíduos químicos (Moscardi, 1986; Ribeiro *et al.*, 1998).

Ao longo dos últimos anos, diversas pesquisas foram realizadas com este baculovírus, como a determinação de seu mapa físico (Johnson & Maruniak, 1989), análises filogenéticas que permitiram sua classificação como pertencente ao grupo I de NPV (Zanotto *et al.*, 1993) e caracterização de diversos genes importantes como *p10* e *gp64* (Razuck *et al.*, 2002; Pilloff *et al.*, 2003). Além disso, produziu-se uma gama de recombinantes para diversas aplicações, como estudo de localização do vírus durante a infecção e melhoramento de seu potencial bioinseticida (Ribeiro *et al.*, 2001; Pinedo *et al.*, 2003; Soares & Ribeiro, 2005).

Atualmente, o AgMNPV é o baculovírus utilizado no maior programa de controle biológico viral no mundo (Moscardi, 1999) e seu genoma foi seqüenciado recentemente, com participação do grupo do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia Molecular da Universidade de Brasília entre outros (Oliveira *et al.*, 2006). Esse genoma possui 132.239 pb e é capaz de codificar 152 fases abertas de leitura (do inglês, “open reading frames”, ORF) não-sobrepostas; possuindo três ORF únicas e uma maior identidade de seqüência e organização genômica com o vírus *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV) (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3) Túbulos de Malpighi

Túbulos de Malpighi de insetos são tubos longos e finos com extremidade cega. Eles surgem próximos à junção do intestino médio com o intestino posterior, na região do piloro, e ficam livres na hemocele da larva. A parede do túbulo é formada por epitélio simples com espessura de uma ou poucas células, circundando o lúmen (Chapman, 1998) formando a sua secção transversal (Figura 3). Os túbulos de Malpighi de lepidópteros possuem apenas um conjunto de músculos longitudinais e circulares na região proximal. Esses músculos se contraem, mantendo o gradiente osmótico pelas paredes dos túbulos devido ao contato contínuo com hemolinfa fresca, sendo provavelmente, também responsável pelo movimento dos fluídos dentro dos túbulos (Chapman, 1998).



**Figura 3.** Localização e fisiologia do sistema excretor de insetos.

Fonte: [bio1152.nicerweb.com/lesson12.html](http://bio1152.nicerweb.com/lesson12.html) (com modificações).

Em larvas de lepidópteros, a região distal dos túbulos de Malpighi é fortemente associada com o reto, formando uma camada convoluta de células sobre sua superfície, resultando em um arranjo conhecido como sistema criptonéfrico (Chapman, 1998). Esse arranjo tem como função auxiliar a retirada de água existente no ar que entra no reto da larva pelo ânus. Isso ocorre devido a uma pressão osmótica muito alta nos túbulos de Malpighi nessa região. (Machin & O'Donnell, 1991). Dessa forma, o sistema criptonéfrico desses insetos deve ser essencial na regulação iônica embora possa ajudar a manter o volume de hemolinfa alto o suficiente para a sua função hidrostática (Chapman, 1998).

Os túbulos de Malpighi consistem de um epitélio que está ligado a um tecido conectivo contendo traquéolos. Existem dois tipos celulares em túbulos de Malpighi de lepidópteros: as células principais e as células reabsortivas (Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984).

As células do tipo principal estão presentes na região distal dos túbulos. Possuem microvilosidades justapostas e organizadas na região apical, enquanto a região basal é altamente invaginada podendo constituir de 25 a 75% da altura (área) da célula, onde ocorrem vesículas endocíticas ao longo da membrana (O'Donnell *et al.*, 1983; Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984). Estas células são conectadas lateralmente por junções septadas e ligadas à lâmina basal por hemidesmossomos. Na parte intermediária estão o núcleo, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndrias. As mitocôndrias são abundantes no interior e na base das microvilosidades e associadas com a membrana plasmática basal. A morfologia dessas células está relacionada com a secreção de fluidos, assim como armazenamentos de substâncias em formas de concreções (Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984), produzindo a urina primária (Chapman, 1998) (Figura 4).

As células principais dos túbulos de Malpighi têm como função básica o carreamento de íons e transporte de fluídos na formação de uma excreta primária iso-osmótica (urina primária). Essas células também transportam uma variedade de compostos para o lúmen, como ácido úrico (O'Donnell *et al.*, 1983), alcalóides (Maddrell & Gardiner, 1976) e glicosídeos cardíacos (Rafaeli-

Bernstein & Mordue, 1978), assim como íons inorgânicos como fosfato,  $Mg^{2+}$  e  $SO_4^{2-}$  (Maddrell, 1978). O resultado final é, em várias formas, semelhante ao do glomérulo de vertebrados, apesar do mecanismo ser muito diferente (Maddrell & O'Donnell, 1992).

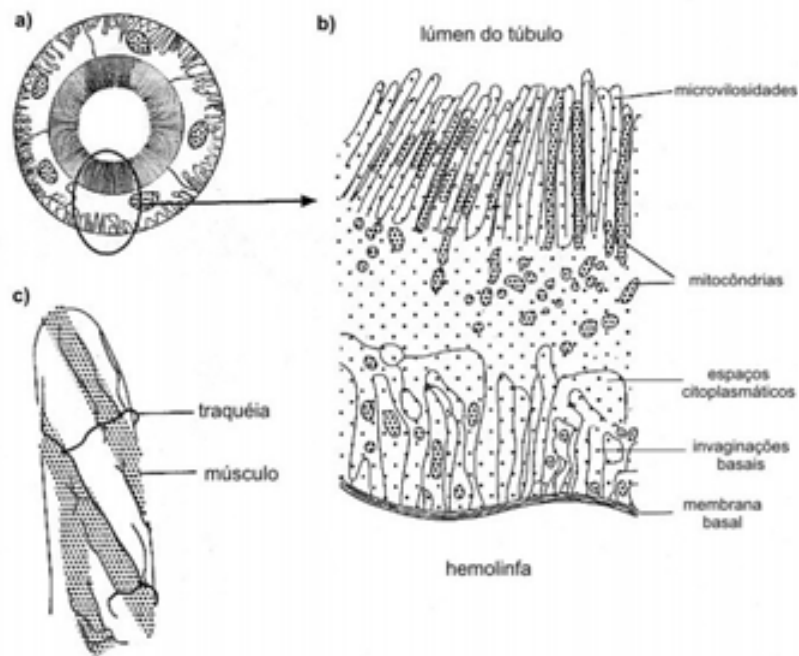
Os túbulos de Malpighi de *Drosophila melanogaster* apresentaram resistência a ouabaína, um forte inibidor da ATPase de  $Na^+$  e  $K^+$  (Torrie *et al.*, 2004). Essa resistência é devido a presença de proteínas transportadoras que possuem um amplo espectro de substratos como sais de bile, conjugados de esteróides, oligopeptídeos aniônicos, drogas, toxinas e outros xenobióticos (Hagenbuch & Meyer, 2003).

As células reabsortivas estão presentes na região proximal dos túbulos e apresentam ácido úrico como concreção secretada no lúmen (Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984). Pouco se sabe sobre esse tipo celular, mas aparentemente sua função está ligada ao auxílio na reabsorção de compostos tóxicos da hemolinfa junto às células principais. Essas células podem variar sua morfologia e função ao longo das regiões dos túbulos, variando a complexidade e organização das microvilosidades e invaginações basais e a quantidade e localização das mitocôndrias (Chapman, 1998). Em *Drosophila* e *Rhodnius*, a região proximal está mais relacionada com reabsorção, contudo a mesma região em *Drosophila* secreta cálcio nos túbulos (O'Donnell & Maddrell, 1995).

A reabsorção de água, íons, açúcares, aminoácidos e outras substâncias para a hemolinfa ou o lúmen, ocorrem na parte anterior do intestino posterior, mas principalmente no reto, pelo sistema criptonéfrico. A urina de insetos terrestres que ingerem alimentos sólidos raramente é totalmente líquida. Geralmente, ela é misturada com alimento não-digerido no reto, resultando em fezes com fluidez variável, dependendo da quantidade de urina (Chapman, 1998).

Wang e colaboradores (2004) fizeram uma análise comparativa por microarranjos de DNA da expressão de genes de *D. melanogaster* em seus túbulos de Malpighi, revelando uma grande quantidade de moléculas transportadoras de solutos orgânicos e enzimas relacionadas com o metabolismo e desintoxicação, como álcool desidrogenase, glutatona transferase e citocromo P450, sendo as duas últimas capazes de conferir resistência a inseticidas (Daborn *et al.*, 2002; Catania *et*

*al.*, 2004; Enayati *et al.*, 2005). Em 2005, McGettigan *et al.* caracterizaram os túbulos de Malpighi de *D. melanogaster* como um órgão dotado de sistema imune autônomo, capaz de perceber infecções bacterianas e produzir uma resposta efetiva independente do tecido adiposo que é considerado o “tecido imune” clássico de insetos, por alguns pesquisadores. Os túbulos são capazes de expressar óxido nítrico sintase (NOS) e diptericina (Nappi *et al.*, 2000), as quais matam patógenos microbianos.



**Figura 4.** Túbulo de Malpighi de inseto. (a) Secção transversal de um túbulo. (b) Detalhe da parte de uma célula principal. (c) Extremidade de um túbulo de Malpighi.

Fonte: Chapman, 1998 (com modificações).

Túbulos de Malpighi também apresentam funções não-excretoras. Em algumas larvas de Neuroptera e Coleoptera, os túbulos são modificados para a produção de seda. Em casulos da maioria dos lepidópteros, o tecido sedoso é produzido pela glândula labial, mas em *Leucoma salicis* (Lepidoptera: Lymantriidae) e *Eriogaster lanestris* (Lepidoptera: Lasiocampidae) são provindos da excreta. O pó amarelo usado nos casulos de *Malacosoma* (Lasiocampidae) consiste de uratos dos túbulos de Malpighi (Wigglesworth, 1972).

#### 4) Ecdisona e EGT

Hormônios de muda de insetos são ecdisteróides, que são produzidos pelas glândulas protorácicas de insetos imaturos. Na maioria dos insetos, essas glândulas secretam ecdisona, mas algumas larvas de Lepidoptera também podem secretar 3-dehidroecdisona, que é convertida em ecdisona por enzimas na hemolinfa (Fescemeyer *et al.*, 1995). Ecdisona é um pró-hormônio, que é convertido no hormônio ativo 20-hidroiecdisona (Chapman, 1998).

Ecdisona é um dos hormônios de insetos mais bem caracterizado, sendo responsável por regular vários genes que controlam crescimento, metamorfose e maturação sexual (Karim & Thummel, 1992).

A síntese de ecdisona é ativada pelo hormônio protoracicotrópico (PTTH), mas os efeitos são modulados por um hormônio inibidor (hormônio juvenil) ou por regulação neural direta (Koolman, 1995). Os túbulos de Malpighi excretam tanto ecdisona quanto 20-hidroiecdisona, assim como vários outros metabólitos (Chapman, 1998).

Para muitos baculovírus com genoma seqüenciados foi comprovada a existência de um gene chamado *ecdysteroid udp-glucosyltransferase (egt)* que codifica a enzima EGT (Ayres *et al.*, 1994; Ahrens *et al.*, 1997; Gomi *et al.*, 1999; Ijkel *et al.*, 1999; Kuzio *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2001). A enzima EGT é secretada na hemolinfa por células infectadas e é responsável pela transferência de

unidades de UDP-galactose ou UDP-glicose para a ecdisona, inativando-a (O'Reilly & Miller, 1989, 1990; Evans & O'Reilly, 1998).

Essa inativação cessa a metamorfose, mantendo o inseto em estado larval, o que resulta em um aumento da progênie viral, pois este estado apresenta menor resistência à infecção viral. Além disso, ecdisteróides induzem alterações metabólicas que diminuem a permissividade da larva à infecção por baculovírus (O'Reilly *et al.*, 1995, 1998). Alterando esses hormônios, os baculovírus são capazes de prevenir a resistência progressiva à infecção oral por baculovírus proveniente do desenvolvimento larval, que provavelmente está relacionada com a escamação do epitélio intestinal durante as mudanças de instar (Engelhard & Volkman, 1995; Washburn *et al.*, 2001). Porém, o resultado da infecção no desenvolvimento larval depende do balanço entre a síntese de ecdisona ativa e sua inativação mediada por EGT (O'Reilly *et al.*, 1998).

O'Reilly & Miller (1990, 1991) descobriram que o gene *egt* de AcMNPV é expresso cedo na infecção, antes da replicação do DNA viral, porém não é essencial para a replicação do vírus no hospedeiro. Eles também mostraram que a inativação do gene *egt* de AcMNPV afetava o crescimento e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*, fazendo com que se alimentassem menos e morressem pelo menos 25% mais rápido do que a larva infectada pelo vírus selvagem.

Flipsen e colaboradores (1995a) observaram que larvas de *Spodoptera exigua* infectadas com AcMNPV contendo o gene *egt* inativo apresentavam uma degeneração precoce dos túbulos de Malpighi quando comparado com o vírus selvagem e propuseram que essa degeneração seria a principal causa do aumento de mortalidade de larvas por recombinantes com *egt* deletado.

Em 2001, Rodrigues *et al.* seqüenciaram e caracterizaram o gene *egt* de AgMNPV. Já Pinedo *et al.* (2003) construíram um recombinante derivado de AgMNPV (vAgEGTΔ-*lacZ*), contendo o gene *egt* inativo pela introdução do cassete *hsp70-lacZ* em seu lócus. Os bioensaios revelaram que o recombinante antecipava a morte das larvas em cerca de dois dias e matava as larvas de *A. gemmatalis* 25% mais rápido, em média, quando comparado com o vírus selvagem AgMNPV, mas produzia cerca de 50% menos poliedros, em consequência da velocidade da morte.

Portanto, o recombinante era mais eficaz para o controle biológico dessas larvas do que o vírus selvagem, em condições de laboratório.

### **5) Proteínas marcadoras: GFP e LacZ**

A proteína de fluorescência verde (do inglês, *green fluorescent protein*, GFP) foi descoberta em uma medusa, *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992), possuindo 238 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa. A proteína GFP emite luz verde a um comprimento de onda de 509 nm, quando exposta à luz ultravioleta (UV) a um comprimento que varia de 395 a 407 nm (Shimomura, 1979). Seu gene tem sido amplamente utilizado como marcador ao longo dos anos devido à possibilidade de expressão da sua proteína em um amplo espectro de células e organismos como bactérias, plantas, animais (incluindo mamíferos) e inserção em genomas virais (Chalfie *et al.*, 1994; Cubbit *et al.*, 1995; Plautz *et al.*, 1996). É uma proteína altamente estável, com toxicidade mínima e capaz de gerar fluoróforos altamente visíveis *in vivo* na ausência de cofatores externos, não interferindo nas atividades celulares (Billinton & Knight, 2001).

Sua atividade pode ser detectada por vários métodos, como a microscopia de fluorescência, a microscopia confocal e a citometria de fluxo, que permitem medir a intensidade de fluorescência em células, individualmente (Welsh & Kay, 1997). O gene marcador *gfp* pode ser utilizado em uma grande variedade de aplicações biológicas. Estudos têm mostrado a utilidade do *gfp* na quantificação da expressão gênica, na marcação de células, na localização de proteínas e no monitoramento da transferência gênica (Welsh & Kay, 1997). Atualmente, existem moléculas de GFP aprimoradas, como eGFP (*enhanced GFP*) e S65T, que produzem maior fluorescência que a GFP selvagem, sob o mesmo estímulo (Billinton & Knight, 2001).

Outra proteína bastante utilizada como marcador é a LacZ, produto do gene *lacZ*. Este gene pertence ao operon *lac* do genoma de *Escherichia coli* e codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase, responsável por hidrolisar lactose em galactose e glucose. Utilizando um substrato sintético análogo



da lactose chamado X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), pode-se obter um produto de cor azulada, indicando a presença de  $\beta$ -galactosidase. Sua atividade pode ser observada a olho nu ou por microscopia de luz. Essa reação é geralmente utilizada para distinção e isolamento de colônias transformadas de *E. coli* que adquiriram um plasmídeo contendo o gene de interesse (Lodish *et al.*, 2000). Além disso, *lacZ* tem sido comumente usado como um gene repórter, tanto para localização da proteína quanto para avaliar a atividade transcricional em uma célula ou cultura (Lindow, 1995).

O uso de baculovírus recombinantes contendo genes marcadores permitiu o estudo da rota e processo de infecção de AcMNPV e outros baculovírus em diversos hospedeiros. Flipsen *et al.* (1995b) utilizaram um AcMNPV recombinante contendo os genes repórteres *lacZ* e GUS (beta-glucuronidase) em larvas e culturas de células de *S. exigua*. Dessa forma, puderam observar a expressão gênica e a localização viral nas células do intestino, mostrando que os nucleocapsídeos são capazes de passar das células colunares para as células basais regenerativas antes da replicação viral e produção de progênie. No mesmo ano, Flipsen e colaboradores (1995a), utilizando a mesma espécie de larva, mas outro recombinante, um AcMNPV que continha *lacZ* interrompendo o gene *egt*, observaram que os túbulos de Malpighi degeneravam rapidamente, havendo infecção de outros tecidos, mas não havia focos azuis característicos nos túbulos. Washburn *et al.* (2003) compararam os processos de infecção de um *Helicoverpa zea* SNPV recombinante com um AcMNPV recombinante, ambos contendo o gene *lacZ*, em larvas *Heliothis virescens* e, dessa forma, puderam observar que a infecção secundária e de células da traquéia ocorriam ao mesmo tempo para os dois tipos de NPV e que a renovação das células intestinais é uma importante barreira contra a infecção por NPV. Em 2004, Kawasaki *et al.* mostraram a dinâmica da expressão do gene *ie-1* de dois *Bombyx mori* NPV recombinantes, um contendo o gene *gfp* e outro contendo o gene repórter *DsRed*, ambos ligados ao gene *ie-1*; assim, acompanharam a localização da proteína IE-1 ao longo do tempo em células de *B. mori* e puderam corroborar as proposições anteriores de que o estroma virogênico é o local de replicação de DNA e montagem de BV. Outro exemplo é a utilização de

dois AgMNPV recombinantes contendo *lacZ*, onde este interrompia o gene da *poliedrina* de um recombinante e o gene *egt* do outro, por Soares & Ribeiro (2005), em que mostraram pela primeira vez a rota de infecção de AgMNPV em larvas de *A. gemmatalis*.

Os recombinantes também permitiram que fossem feitas as proposições de modelos de infecção inicial e secundária dos hospedeiros infectados. Como por exemplo, Keddie *et al.* (1989), que investigaram larvas de *Trichoplusia ni* utilizando um AcMNPV recombinante contendo o gene repórter *lacZ*. Eles demonstraram que a infecção se iniciava ao mesmo tempo nas células do intestino, tanto nas colunares quanto nas regenerativas, e que os hemócitos e o sistema traqueal permitiam a infecção sistêmica da larva. A rota de infecção pelas traquéias ao longo do tempo foi analisada em larvas de *T. ni* utilizando um AcMNPV recombinante contendo *lacZ* (Engelhard *et al.*, 1994) e corroborou as proposições anteriores. Mais tarde, Barret *et al.* (1998) utilizaram um AcMNPV recombinante contendo o gene *gfp* em larvas de *T. ni* e observaram que células do intestino e hemócitos são infectados simultaneamente, por volta de 24 h p. i..

## **OBJETIVOS**

Tendo em vista a importância econômica de *A. gemmatalis* e a escassez de estudos ultra-estruturais de túbulos de Malpighi de lepidópteros em geral, pretendemos:

- Analisar as alterações causadas nos túbulos de Malpighi de *A. gemmatalis* por AgMNPV recombinantes e verificar a sua relação com a ausência do gene *egt* e/ou presença de um gene marcador (*egfp* ou *lacZ*).
- Verificar se os vírus estudados são capazes de se replicar em células dos túbulos de Malpighi.
- Avaliar possíveis diferenças comportamentais entre larvas infectadas por recombinantes diferentes e sua associação com os possíveis danos aos túbulos de Malpighi.

## METODOLOGIA

### 1) Insetos e vírus

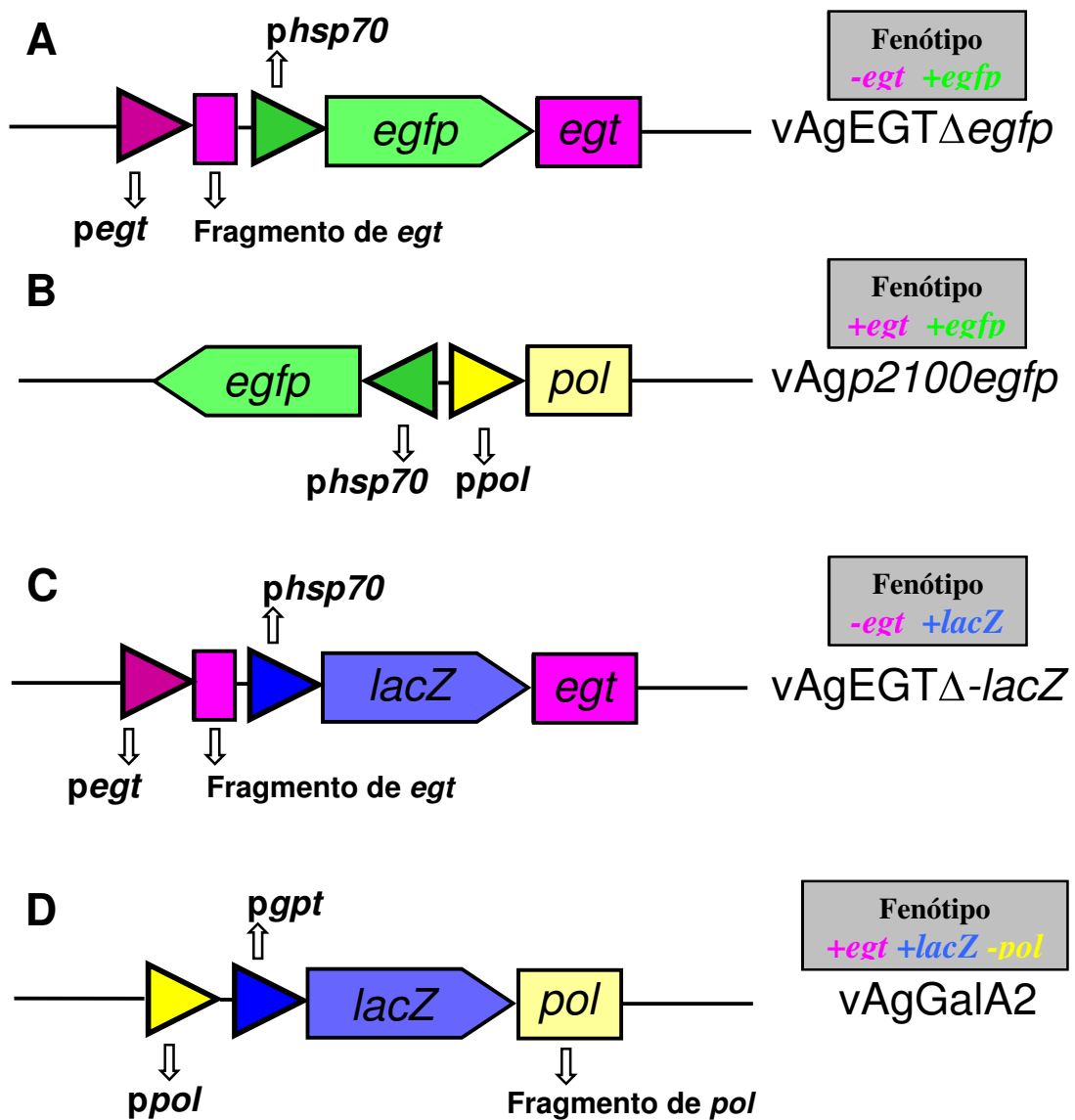
Ovos e larvas de *A. gemmatalis* foram fornecidos pelas Dras. Rose Gomes Monnerat e Maria Elita Batista de Castro da EMBRAPA/CENARGEN – Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF).

As larvas foram mantidas em dieta artificial, à temperatura ambiente, em torno de 22-30°C e o seu desenvolvimento foi monitorado diariamente.

Os inóculos virais vAgEGT $\Delta$ *egfp*, vAgp2100*egfp*, vAgEGT $\Delta$ -*lacZ*, vAgGalA2 e AgMNPV foram obtidos no laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia Molecular da Universidade de Brasília e amplificados em larvas de *A. gemmatalis* para a produção de poliedros. O vírus vAgEGT $\Delta$ *egfp* possui o gene *egfp* sob o comando do promotor *hsp70*, inserido no locus do gene *egt* do genoma de AgMNPV (Soares, 2005) (Figura 5A). O vírus vAgp2100*egfp* possui o gene *egt* e um cassete gênico *hsp70-egfp* (promotor *hsp70* “heat shock protein” (*hsp70*) de *D. melanogaster* comandando a expressão do gene “enhanced green fluorescence protein” (*egfp*) da companhia Clonetec, localizado logo acima do promotor do gene *pol* de AgMNPV (Hallwass, 2005) (Figura 5B). O vírus vAgEGT $\Delta$ -*lacZ* tem o gene de *E. coli lacZ* sob o controle do promotor constitutivo “heat shock protein” (*hsp70*) de *D. melanogaster*, inserido no locus do gene *egt* do genoma de AgMNPV (Pinedo *et al.*, 2003) (Figura 5C). O recombinante vAgGalA2 tem o gene *lacZ* sob o controle do gene da poliedrina de AgMNPV inserido no locus da poliedrina do genoma de AgMNPV (Ribeiro *et al.*, 2001) (Figura 5D). Além disso, esse vírus tem um fenótipo de oclusão negativa, uma vez que não sintetiza poliedrina.

Para a produção inicial dos inóculos virais, foram utilizadas cerca de 50 larvas para cada vírus, com aproximadamente 100 unidades formadoras de placa (pfu) de BV de cada inóculo injetadas na hemolinfa com o auxílio de uma micro-seringa. Após a morte dos insetos (cerca de 120

h p. i.), purificou-se os poliedros seguindo o protocolo descrito por Maruniak (1986). Para a produção de poliedros contendo o vírus vAgGalA2, este foi injetado (100 pfu) juntamente com o vírus selvagem AgMNPV (100 pfu) em 50 larvas de *A. gemmatilis*. Dessa forma, ocorre co-occlusão de partículas virais de ambos os vírus em uma matriz de poliedrina proveniente de AgMNPV. Os poliedros foram contados em uma câmara de Neubauer, para determinação do título viral e, em seguida, armazenados a 4° C.



**Figura 5.** Diagrama mostrando as construções gênicas utilizadas nos baculovírus recombinantes. (A) vAgEGTΔ*egfp* – cassete *hsp70-egfp* inserido no locus do gene *egt*; (B) vAg*p2100egfp* - cassete *hsp70-egfp* inserido logo acima do promotor do gene *pol*; (C) vAgEGTΔ-*lacZ* - cassete *hsp70-lacZ* inserido no locus do gene *egt* e (D) vAgGalA2 - cassete *gpt-lacZ* inserido no locus do gene *pol*. **Símbolos:** *peg<sub>t</sub>* – promotor do gene *egt* de AgMNPV; *pgpt* – promotor do gene *gpt* (guanina fosforibosiltransferase) de *E. coli*; *phsp70* – promotor *hsp70* de *D. melanogaster*; *pol* – gene da poliedrina de AgMNPV; *ppol* – promotor do gene *poliedrina*.

## 2) Infecção das larvas e isolamento dos túbulos de Malpighi

Larvas de 4º instar foram inoculadas oralmente com 3 µl de água destilada contendo 1.000 poliedros, diretamente na região anterior do intestino com a ajuda de uma micro-seringa Hamilton e foram mantidas em dieta artificial a temperatura ambiente. Dois grupos controle foram obtidos: o primeiro inoculando-se 3 µl de água destilada contendo o inóculo de AgMNPV e o segundo pela inoculação de água destilada. Larvas de 5º instar foram utilizadas nos controles para verificar alterações causadas pela mudança de instar.

Para todos os vírus, os túbulos de Malpighi foram coletados em diferentes tempos pós-infecção (24, 72 e 120 h p. i.). As larvas foram dissecadas usando-se uma lupa Stemi SV 11 Zeiss por meio de uma incisão longitudinal na cutícula dorsal ao longo do comprimento do corpo e os túbulos de Malpighi extraídos foram processados para os diferentes tipos de microscopia.

Para os túbulos de Malpighi de larvas infectadas com recombinantes contendo o gene *lacZ* houve um tratamento extra. Eles foram incubados com o substrato de LacZ (X-gal) (Engelhard *et al.*, 1994; Flipsen *et al.*, 1995a; 1995b). A incubação foi realizada com um “enhancement buffer” (5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 2 mM  $MgCl_2$  em água destilada) contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactoside (X-gal) a 1,5 mg/ml por 12 h em escuridão total. Com a expressão da proteína marcadora nas regiões infectadas, pode-se ver focos azuis devido à degradação do reagente X-gal.

## 3) Procedimentos para observação da morfologia dos túbulos de Malpighi

**3.1) Microscopia de luz (ML):** Os túbulos de Malpighi de larvas infectadas com o baculovírus foram analisados em microscópio de luz Axiophot Zeiss, equipado com fluorescência para observação dos vírus contendo o gene *egfp* e contraste interferencial diferencial (DIC). Utilizou-se luz azul na microscopia de fluorescência (490 nm) para detecção da fluorescência verde

(515 nm) da proteína EGFP. Para reduzir a autofluorescência, os túbulos infectados com recombinantes contendo *egfp* foram corados com azul de toluidina 0,5% por 30 s (Ruzin & Sylvester, 1994). Os túbulos de Malpighi infectados com recombinantes contendo o gene *lacZ* foram observados usando contraste interferencial diferencial (DIC).

**3.2) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):** Os túbulos de Malpighi de larvas infectadas foram fixados em 2% glutaraldeído-2% paraformaldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio pH 7.3 contendo 5% de sacarose, durante 2 h e pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio-0.8% ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M , pH 7.3, 5 mM de cloreto de cálcio durante 1 h. Em seguida, realizou-se a contrastação *in block* com acetato de uranila 0,5% *overnight*. A desidratação foi realizada em gradiente crescente de acetona (30 a 100%) e a inclusão em resina Spurr. Após a ultramicrotomia, as seções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (Haddad *et al.*, 1998). O material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

**3.3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):** Os túbulos de Malpighi, nas mesmas condições descritas anteriormente, foram processados para análise em microscópio eletrônico de varredura Jeol 840A. O processamento envolveu a fixação, pós-fixação, desidratação, conforme descrito para MET, secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> no secador Balzers CPD 030 e cobertura com ouro no aparelho Sputter Coater Balzers SPD 050 (Haddad *et al.*, 1998).

#### 4) Bioensaios

Os bioensaios foram realizados utilizando-se 30 larvas de *A. gemmatalis* para cada inóculo viral. As inoculações foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2, utilizando a

mesma quantidade de poliedros para todos os inóculos. Para cada inóculo viral, foram feitas três repetições, das quais foram calculadas suas respectivas médias.

As larvas foram mantidas individualmente em copos plásticos sob dieta artificial e temperatura ambiente e monitoradas a cada 24 h. As larvas mortas em períodos anteriores a 72 h p. i. foram consideradas mortas por trauma pós-infecção e por isso não foram contadas no bioensaio. As larvas eram consideradas mortas na ausência de resposta motora a estímulos físicos e aquelas que se tornaram pupas inviáveis também deixaram de ser contadas. As pupas que se tornavam mariposas eram consideradas sobreviventes.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971). Utilizou-se o programa de análises estatísticas Micro Probit para calcular o tempo que cada baculovírus levou para causar mortalidade em 50% da população larval (Tempo letal médio 50%,  $LT_{50}$ ) assim como outros parâmetros associados (limites fiduciais de 95%, inclinação e teste do  $\chi^2$ ).

## **RESULTADOS**

### ***1) Comportamento larval pós-infecção***

Após a infecção oral das larvas utilizando inóculo líquido contendo poliedros, estas apresentaram mudanças comportamentais. Algumas horas depois, as larvas já se alimentavam e se locomoviam menos. Algumas larvas infectadas conseguiram passar para 5º instar no período entre 48 e 72 h p. i. Essas observações foram constatadas para todos os baculovírus utilizados, variando apenas a quantidade de larvas que passaram de instar. As larvas controle alimentavam-se, cresciam e se movimentavam mais que as larvas infectadas, realizando muda para 5º instar por volta de 24 e 48 h depois de injetadas com água.



## ***2) Morfologia dos túbulos de Malpighi pós-infecção***

Observações iniciais utilizando os tempos de 3, 6 e 12 h p. i. não mostraram diferenças significativas entre si e entre 24 h p. i. Além disso, os tempos de 48 e 96 h p. i. também não apresentaram diferenças relevantes em relação a 72 e 120 h p. i., respectivamente. Dessa forma, para todos os inóculos, os resultados estão organizados de forma a mostrar os períodos inicial, intermediário e tardio de infecção representados por 24, 72 e 120 h p. i., respectivamente.

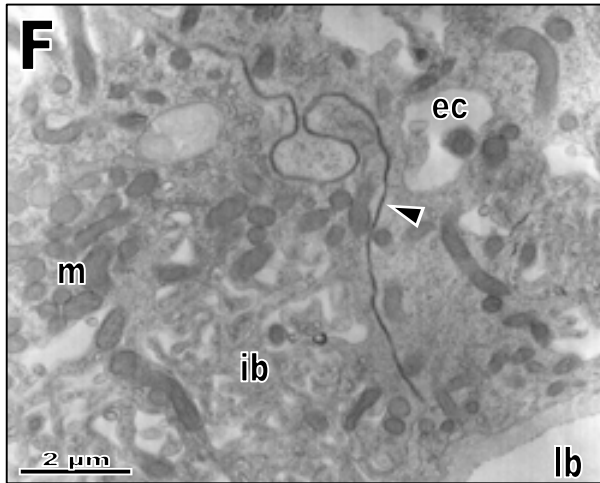
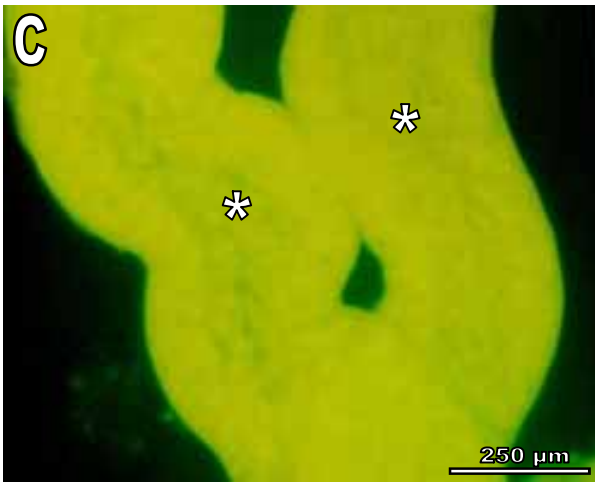
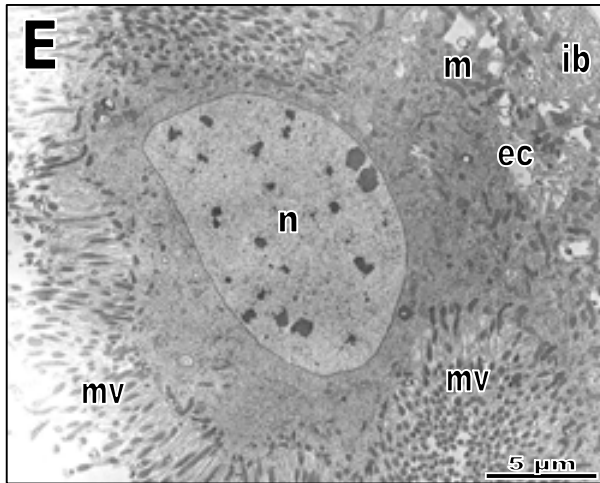
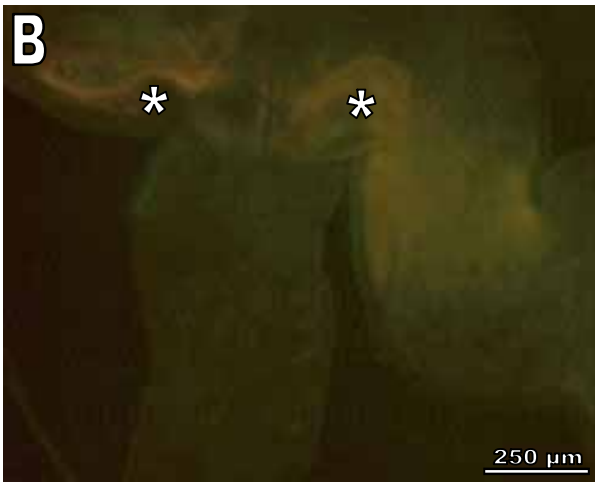
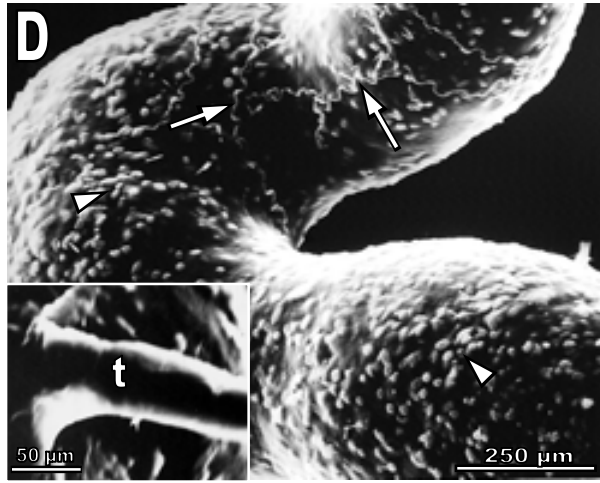
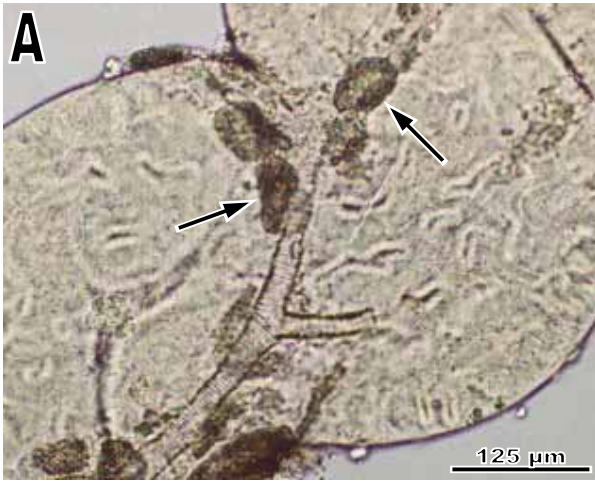
### ***2.1) Controles***

Ao injetar apenas água destilada oralmente, observou-se que os túbulos de Malpighi controle apresentavam integridade estrutural do epitélio e da lâmina basal ao longo dos túbulos. Observou-se também, células traqueolares sadias ligadas aos túbulos (Fig. 6A). Além disso, nas larvas de 5º instar, observou-se apenas alterações nos tamanhos dos túbulos de Malpighi em relação às larvas de 4º instar (dados não mostrados). As análises por microscopia de fluorescência revelaram algumas manchas de fluorescência amarelada, principalmente na região proximal dos túbulos que, provavelmente, são provenientes de componentes orgânicos do metabolismo do inseto e que provocam o fenômeno da autofluorescência (Billinton & Knight, 2001) (Fig. 6B). A coloração alaranjada é resultante da reação com azul de toluidina, utilizado para reduzir a autofluorescência sobrepondo parte do espectro da autofluorescência (Ruzin & Sylvester, 1994). Sem a utilização desse recurso, tem-se um forte espectro de comprimento de onda entre o amarelo e o verde (Fig. 6C).

Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que túbulos de Malpighi controle apresentavam rugosidades de pequeno tamanho na superfície. A superfície possuía estabilidade e integridade e os túbulos mostravam um aspecto regular ao longo de toda a

sua extensão, juntamente com traquéolos e traquéias inteiras associados, os quais também apresentaram aspecto sadio (Fig. 6D).

Os túbulos de Malpighi visualizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentaram integridade estrutural ao longo de sua extensão. A grande maioria das células observadas era do tipo principal. As invaginações basais são dobramentos da membrana plasmática ocupando, em média, cerca de 25% da altura (área) celular, podendo haver, ocasionalmente, a presença de mitocôndrias na região. Os espaços citoplasmáticos ocupavam a região basal das células, logo acima das invaginações basais e seus tamanhos variavam entre 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estes se assemelham a pequenas lacunas dentro das células. As mitocôndrias, em formatos finos e alongados, eram encontradas ao longo de toda a célula, havendo uma maior concentração das mesmas na região apical e no interior das microvilosidades. As microvilosidades apresentavam-se bem organizadas, com comprimento variando entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ . O núcleo localiza-se na região intermediária das células, ocupando grande parte dessa área (Fig. 6E). As células também apresentavam junções celulares comunicantes do tipo fenda. A lâmina basal contínua não apresentou deformações ou degradações, porém havia diferenças em sua espessura ao longo dos túbulos (Fig. 6F).



**Figura 6.** Micrografias de túbulos de Malpighi do experimento controle. **(A-C)** Micrografias de luz (DIC) e fluorescência. **(A)** Microscopia de luz; setas indicam células traqueolares não infectadas. **(B)** Microscopia de fluorescência; asteriscos indicam manchas de autofluorescência. **(C)** Microscopia de fluorescência, asteriscos indicam áreas de autofluorescência. **(D-F)** Micrografias eletrônicas de varredura e transmissão. **(D)** MEV; t – traquéia, cabeças de seta indicam rugosidades e setas indicam traquéolos. **(E-F)** MET; ec – espaços citoplasmáticos, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, cabeça de seta indica junção celular.

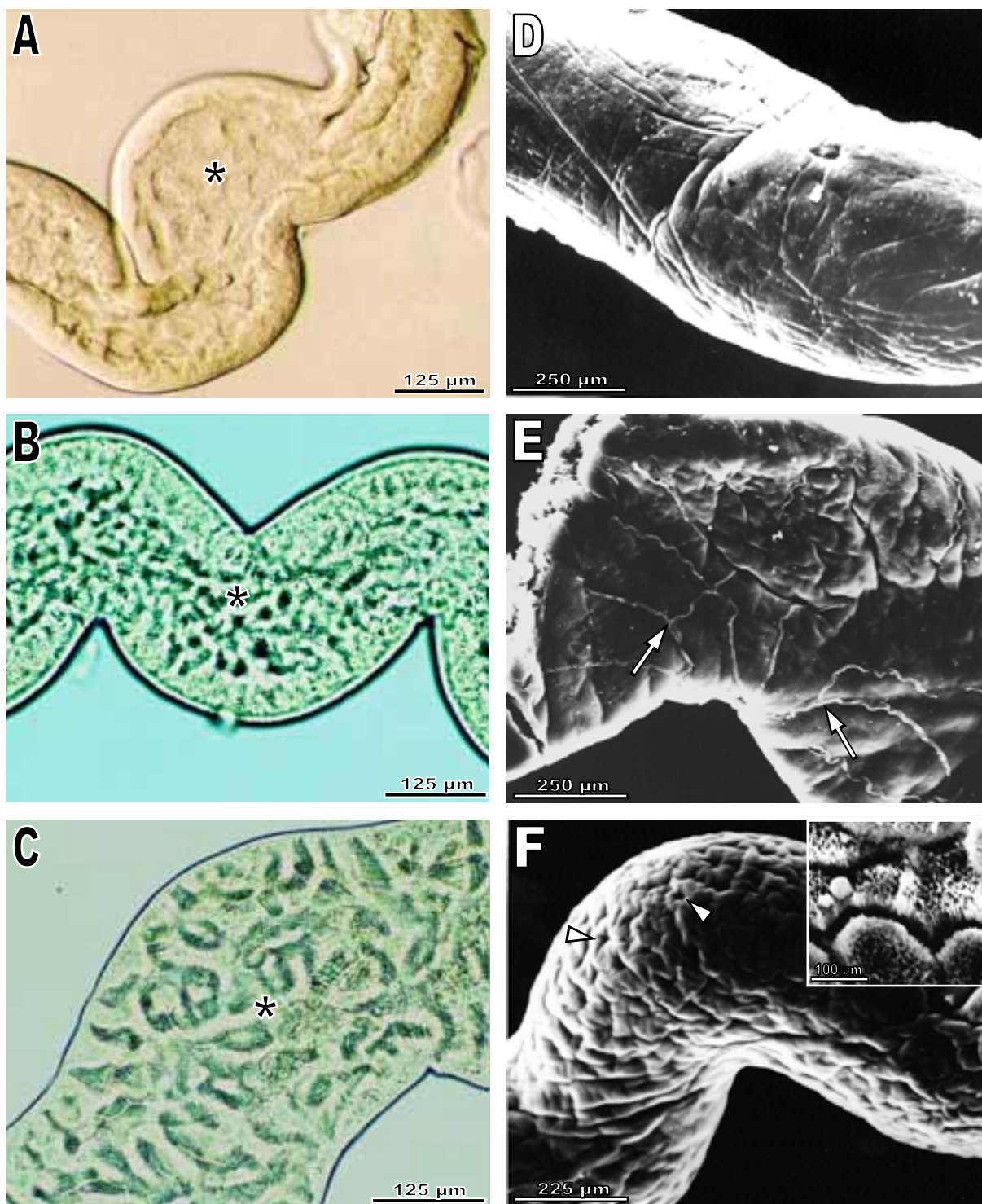
## 2.2) *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

A infecção com o vírus selvagem AgMNPV causou uma degeneração progressiva dos túbulos de Malpighi das larvas. Até 24 h p. i., os túbulos apresentaram alterações muito sutis ao longo de sua extensão quando observados na microscopia de luz (Fig. 7A). Com o decorrer do tempo, os túbulos começaram a apresentar um padrão de degeneração semelhante a uma granulação, onde podem ser observados pequenos espaços entre as células, por volta de 72 h p. i. (Fig. 7B). Às 120 h p. i., os túbulos apresentavam um avanço no processo de degeneração tecidual, onde ocorrem espaços mais evidentes entre as células, em relação a 72 h p. i. (Fig. 7C), porém a lâmina basal manteve sua integridade durante todos os períodos.

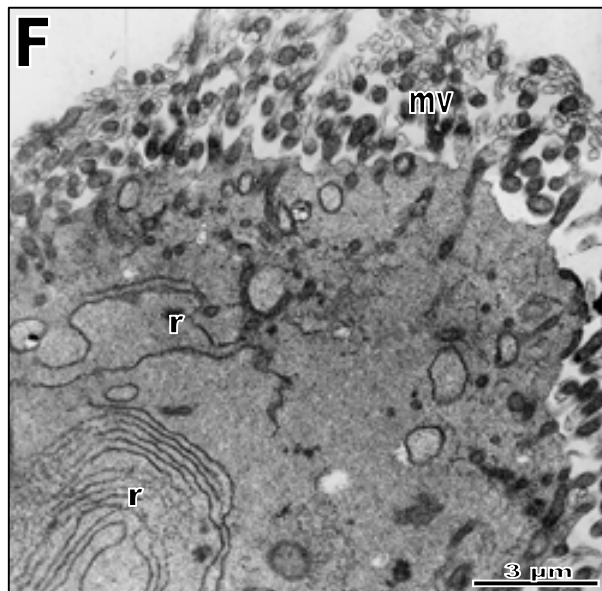
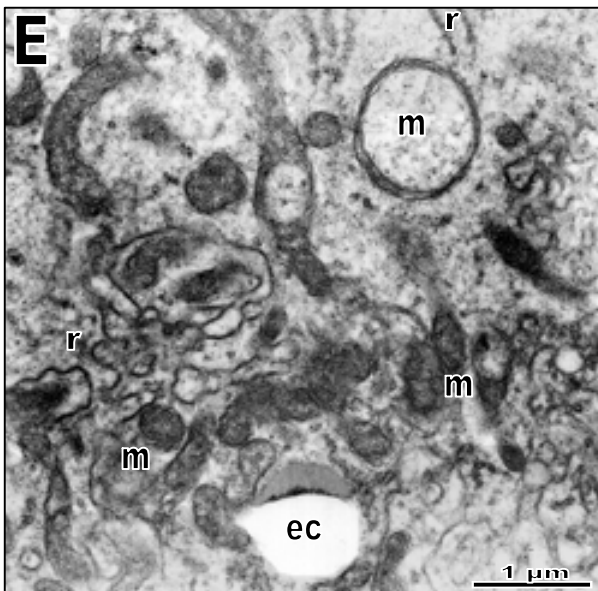
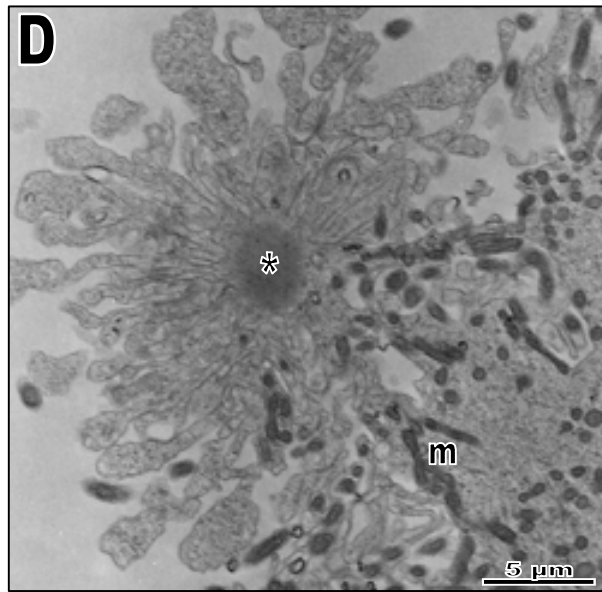
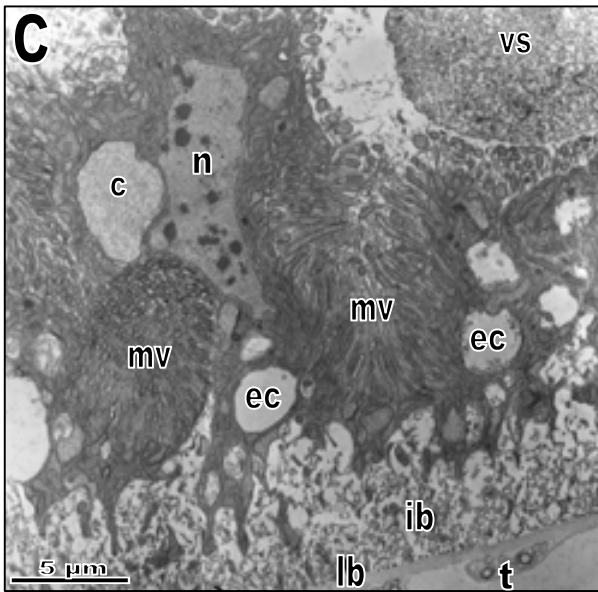
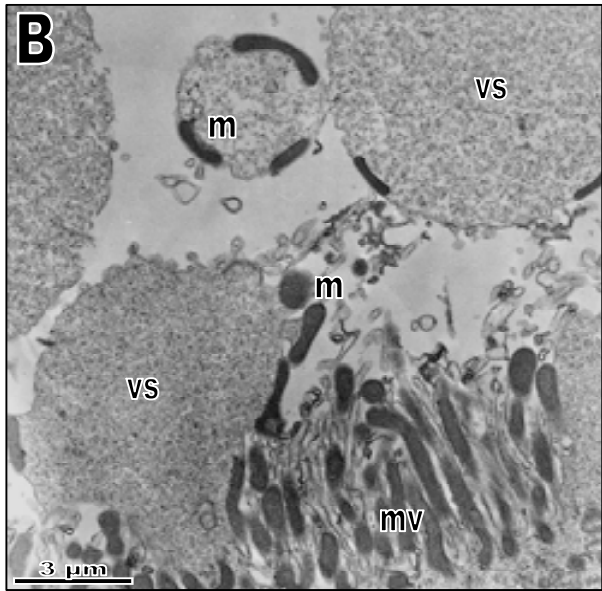
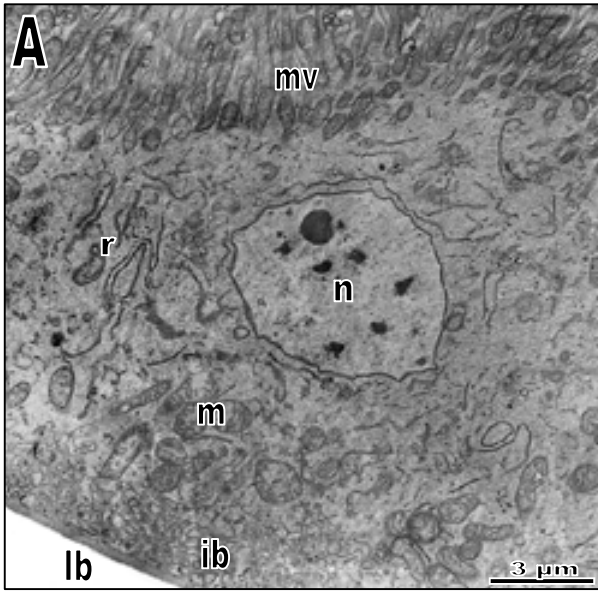
Em nível ultra-estrutural, a superfície dos túbulos em MEV, correspondente à lâmina basal, alterou seu aspecto em relação à superfície dos túbulos controle já com 24 h p. i. As rugosidades presentes nos túbulos controle estavam ausentes ou em baixíssima quantidade e os túbulos demonstravam um aspecto ressecado e flácido de sua superfície (Fig. 7D). Até 72 h p. i., essas alterações tornaram-se mais distintas e presentes ao longo dos túbulos. As reentrâncias originadas pela frouxidão interna do tecido tornaram-se mais profundas enquanto os traquéolos ficaram escassos (Fig. 7E). Mais tarde, em 120 h p. i., o tecido ficou ainda mais flácido, fazendo com que as reentrâncias ficassem mais próximas e profundas formando pequenas cavidades semelhantes a poros na superfície (Fig. 7F). No interior dos túbulos, o epitélio apresentou deformações, segmentações e desorganização estrutural (Fig. 7F - detalhe).

Ao MET, em 24 h p. i., observou-se alteração no tamanho das invaginações basais. Em algumas porções da região distal, não se observou mais espaços citoplasmáticos. Além disso, algumas das mitocôndrias apicais migraram para a porção basal e apresentavam alterações em sua forma e degeneração interna. Observou-se uma maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e suave compactação das invaginações basais (Fig. 8A). Enquanto isso, na superfície das microvilosidades e no lúmen, observou-se a presença de secreção do tipo apócrina, contendo

fragmentos citoplasmáticos com mitocôndrias em sua periferia (Fig. 8B). Após esse período, observou-se grandes transformações na morfologia do tecido. Em 72 h p. i., as invaginações basais tornaram-se mais difusas, resultando em grande desorganização epitelial. Os espaços citoplasmáticos tornaram-se maiores e mais numerosos. Esses eventos somados resultaram em uma mudança morfológica das células, alterando a forma do núcleo e a organização e tamanho das microvilosidades. Além disso, o citoplasma apresentava uma maior densidade (Fig. 8C). Ainda foi possível observar algumas células expelindo seu conteúdo citoplasmático para o lúmen dos túbulos (Fig. 8D). Com 120 h p. i., o aspecto geral do tecido não mudou muito. Algumas regiões apresentavam suas invaginações basais frouxas e difusas, enquanto em outras porções dos túbulos, estavam compactas e colapsadas. Porém, nesse período foi possível notar mudanças na organização e morfologia das organelas, como o deslocamento de muitas mitocôndrias para as regiões basais das células, invadindo o espaço das invaginações basais. Além disso, muitas mitocôndrias apresentavam degeneração e um formato disforme ou arredondado (Fig. 8E). Os retículos endoplasmáticos rugosos apresentavam-se bem desenvolvidos, e as microvilosidades estavam curtas e desorganizadas (Fig. 8F). Não houve indícios de infecção viral, como arredondamento celular, formação do estroma virogênico e presença de agregados protéicos e partículas virais, nas células dos túbulos de Malpighi ao longo de todos os períodos observados.



**Figura 7.** Micrografias de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por AgMNPV. (A-C) Micrografias de luz, (A) 24 h p. i., (B) 72 h p. i., (C) 120 h p. i. Asteriscos indicam áreas de degeneração tecidual. (D-F) MEV; (D) 24 h p. i., (E) 72 h p. i., (F) 120 h p. i. – detalhe: superfície do interior dos túbulos. Cabeças de seta indicam poros e setas indicam traquéolos.





**Figura 8.** MET. (A-B) Imagens provenientes de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por AgMNPV com 24 h p. i. (C-D) 72 h p. i. (E-F) 120 h p. i.; c – concreção, ec – espaços citoplasmáticos, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, r - retículo endoplasmático rugoso, t – célula traqueolar, vs – vesícula secretora, asterisco indica expulsão de porção citoplasmática.

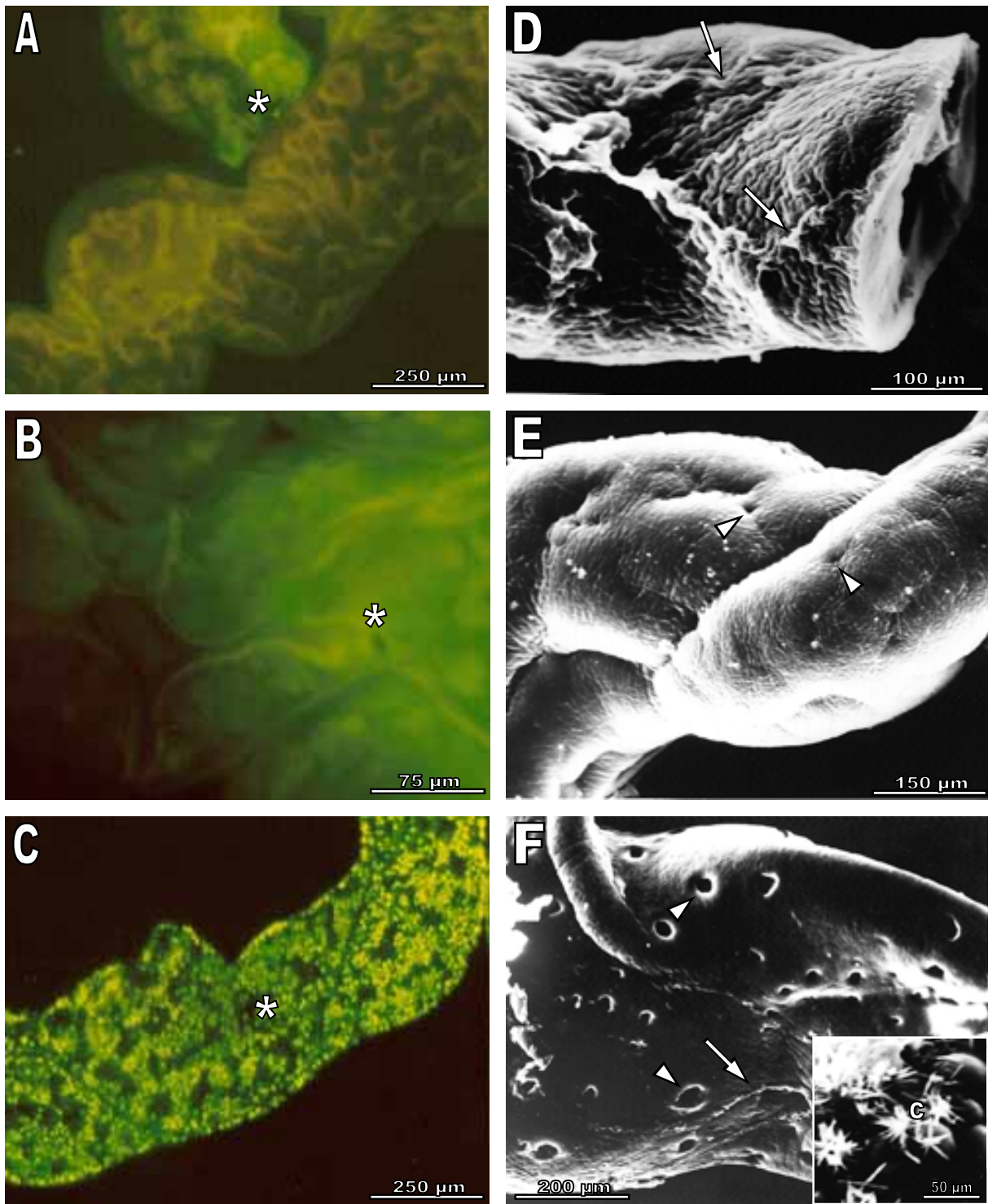
### 2.3) vAgp2100egfp

Infectando-se as larvas com o inóculo do AgMNPV recombinante contendo o gene *egfp* foi possível observar, com 24 h p. i., uma leve mudança de organização tecidual dos túbulos. Nesse tempo, observou-se a presença de fluorescência em algumas poucas áreas dos túbulos de Malpighi (Fig. 9A). Com o passar do tempo, a proteína fluorescente foi sendo filtrada pelos túbulos, formando regiões de acúmulo de EGFP, permitindo o registro de focos com maior intensidade de fluorescência (Fig. 9B). Nesse mesmo período de 72 h p. i., o padrão do epitélio dos túbulos mudou para um aspecto degenerado, com o estabelecimento de espaços entre as células. Com 120 h p. i., a degeneração dos túbulos de Malpighi progrediu, prevalecendo um aspecto granular no tecido. A fluorescência tornou-se fraca e difusa em alguns pontos dos túbulos, enquanto em outras regiões observaram-se diversas vesículas fluorescentes por grandes extensões dos túbulos já degenerados (Fig. 9C).

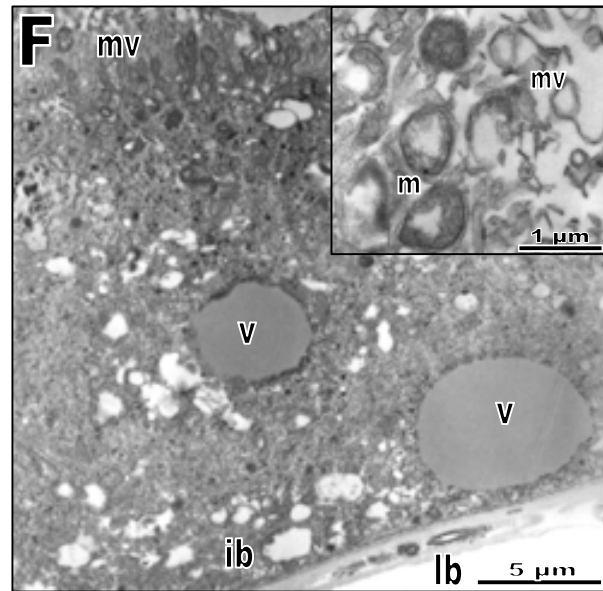
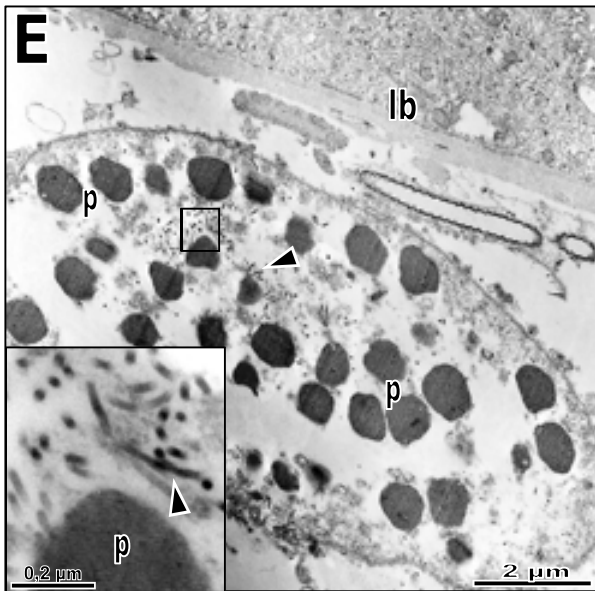
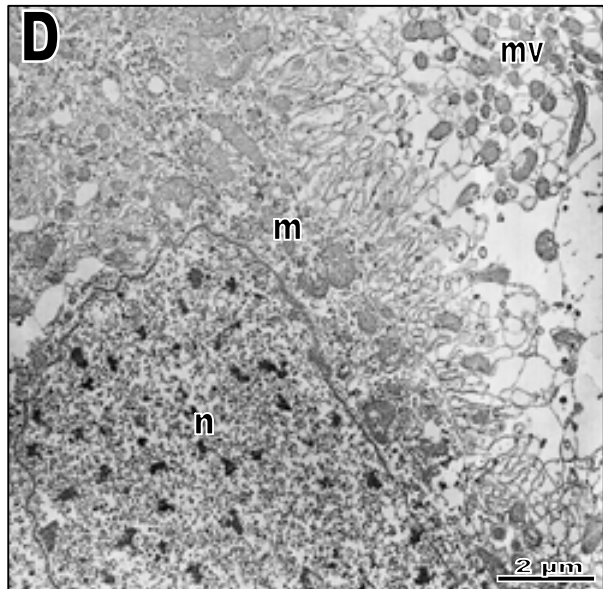
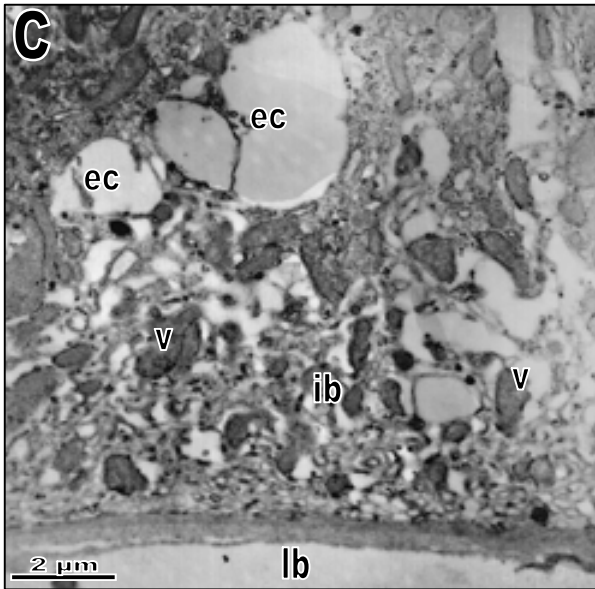
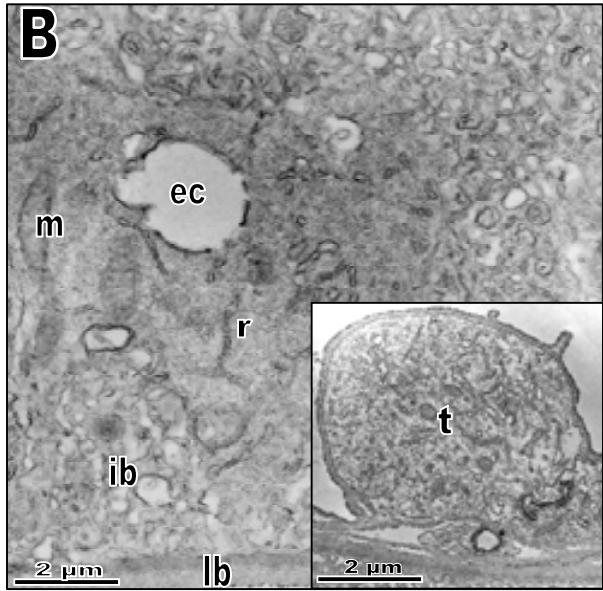
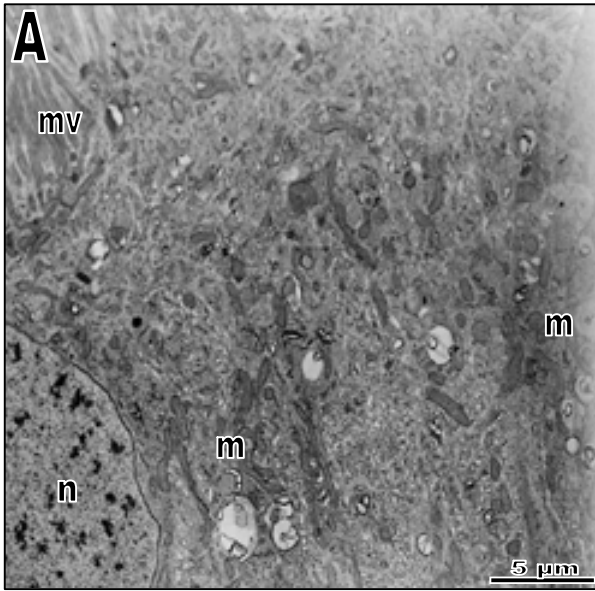
Na análise utilizando MEV, em 24 h p. i., os túbulos apresentaram aspecto ressecado e flácido, com sua superfície repleta de reentrâncias pouco profundas e contendo traquéolos ressecados associados (Fig. 9D). Além disso, não foram observadas rugosidades na superfície. Mais tarde, a flacidez e as reentrâncias resultaram na formação de depressões ao longo da superfície dos túbulos de Malpighi, por volta de 72 h p. i. (Fig. 9E). Com 120 h p. i., houve uma invaginação da lâmina basal, resultando em depressões profundas na superfície dos túbulos, semelhantes a poros e a presença de traquéolos degenerados (Fig. 9F). Os túbulos apresentavam protuberâncias semelhantes a bolhas juntamente com acúmulo de cristais ao longo da extensão de sua superfície, indicando possível ruptura da lâmina basal (Fig. 9F - detalhe).

Quando analisados ao MET, os túbulos de Malpighi de larvas infectadas com 24 h p. i. mostraram as células com microvilosidades bem organizadas e contendo mitocôndrias em seu interior e na região apical das células (Fig. 10A). Além disso, percebeu-se uma lâmina basal íntegra e contínua, sem deformações. As invaginações basais apresentaram um aspecto mais compacto,

porém seu tamanho era semelhante ao controle. Os espaços citoplasmáticos aumentaram em número, porém seus tamanhos foram reduzidos (Fig. 10B). Algumas células traqueolares observadas não mostraram partículas virais em seu interior, mas sua morfologia estava alterada, apresentando um tamanho desproporcional e deformado (Fig. 10B - detalhe). Com 72 h p. i., observou-se um aumento do tamanho dos espaços citoplasmáticos juntamente com dilatação e ruptura das invaginações basais (Fig. 10C). As mitocôndrias da região apical e microvilosidades começaram a ficar arredondadas e densas (dados não mostrados). Enquanto isso, outras células se apresentaram lisadas, revelando um núcleo com aspecto degenerado (Fig. 10D). Observou-se, com 120 h p. i., células traqueolares contendo partículas virais em seu interior, poliedros em seus núcleos e outras células lisadas (Fig. 10E). Alguns espaços citoplasmáticos foram preenchidos, formando enormes vesículas contendo provável material lipídico, enquanto outros menores, eram formados próximos à região basal das células (Fig. 10F). A desorganização tecidual progrediu concomitantemente à infecção viral, havendo presença de mais células em processo de morte celular, com suas microvilosidades e mitocôndrias apicais rompidas (Fig. 10F - detalhe). Contudo, não foram observados sinais de infecção viral nas células dos túbulos de Malpighi nos períodos descritos.



**Figura 9.** Micrografias de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por *vAgp2100egfp*. (A-C) Micrografias de fluorescência; (A) 24 h p. i., (B) 72 h p. i., (C) 120 h p. i. Asteriscos indicam fluorescência da proteína EGFP. (D-F) MEV; (D) 24 h p. i., (E) 72 h p. i., (F) 120 h p. i. – detalhe: cristais na superfície dos túbulos. c – cristais, cabeças de seta indicam poros, setas indicam traquéolos.



**Figura 10.** MET. (A-B) Imagens provenientes de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por vAgp2100*egfp* com 24 h p. i. (C-D) 72 h p. i. (E-F) 120 h p. i.; ec – espaços citoplasmáticos, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, p – poliedro, r - retículo endoplasmático rugoso, t – célula traqueolar, v – vesícula e cabeça de seta indica partícula viral.

## 2.4) vAgEGT $\Delta$ egfp

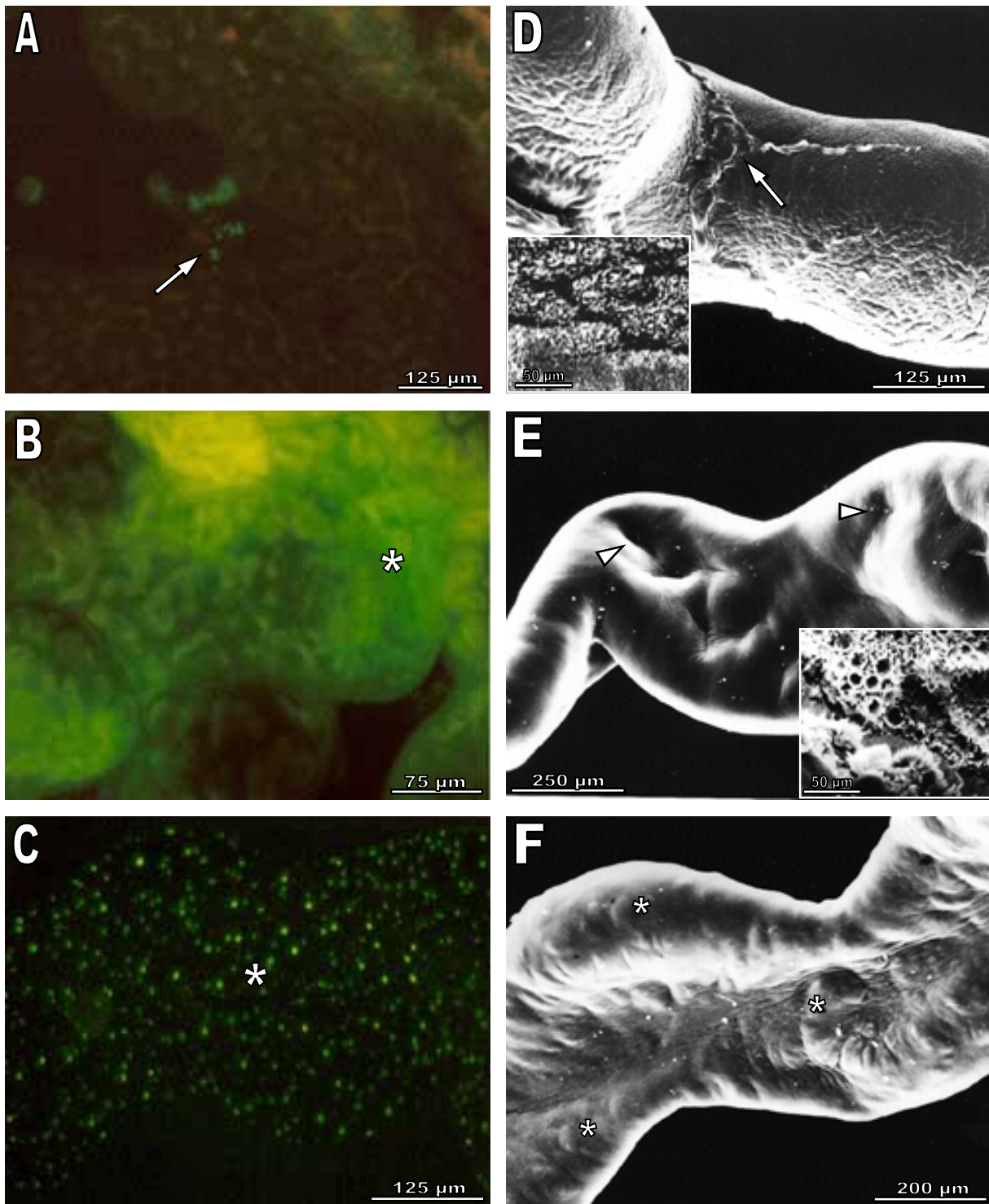
Da infecção por vAgEGT $\Delta$ egfp constatou-se a presença de traquéolos emitindo fluorescência verde característica de EGFP (Fig. 11A), indicando que as células traqueolares estão infectadas, em 24 h p. i. Além disso, poucos focos difusos de EGFP foram observados no interior dos túbulos, mascarados pela autofluorescência. Em 72 h p. i., a quantidade de focos de EGFP continuou constante, porém havia um número maior de traquéolos emitindo uma fluorescência mais intensa (Fig. 11B). Com o passar do tempo, por volta de 120 h p. i., os túbulos foram degenerando e a fluorescência proveniente de EGFP no interior dos túbulos enfraqueceu, enquanto vários focos de autofluorescência se acumulavam no interior das células dos túbulos de Malpighi (Fig. 11C), provavelmente pelo acúmulo de substâncias comumente armazenadas por estas células, como ácido úrico, por exemplo.

Ausência de rugosidades vistas em túbulos controle, traquéolos flácidos e aparecimento de reentrâncias pouco profundas, porém extensas, na superfície dos túbulos de larvas infectadas por vAgEGT $\Delta$ egfp em 24 h p. i. foram observadas em MEV (Fig. 11D). No entanto, a análise da superfície do epitélio no interior dos túbulos revelou um tecido com alta integridade estrutural e morfologia usual (Fig. 11D - detalhe). Por volta de 72 h p. i., algumas regiões apresentavam depressões, que pareciam princípio de poros, no lugar de reentrâncias (Fig. 11E). Enquanto isso, no interior dos túbulos, o tecido apresentou deformações e desorganização estrutural, porém permitindo a visualização das secreções apócrinas (Fig. 11E - detalhe). Finalmente, com 120 h p. i., na superfície dos túbulos, foram observadas protuberâncias semelhantes a bolhas juntamente com algumas reentrâncias indicando progresso na degeneração dos túbulos (Fig. 11F).

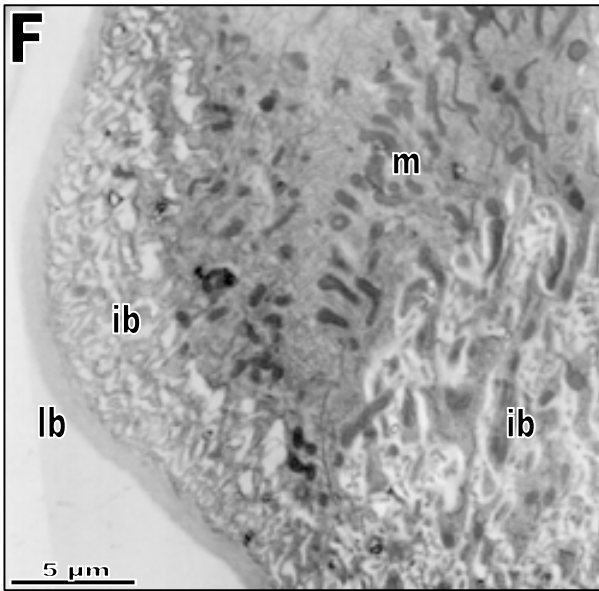
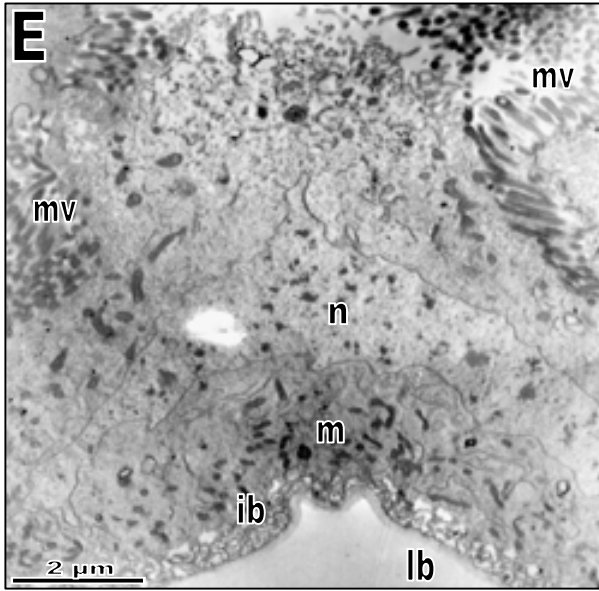
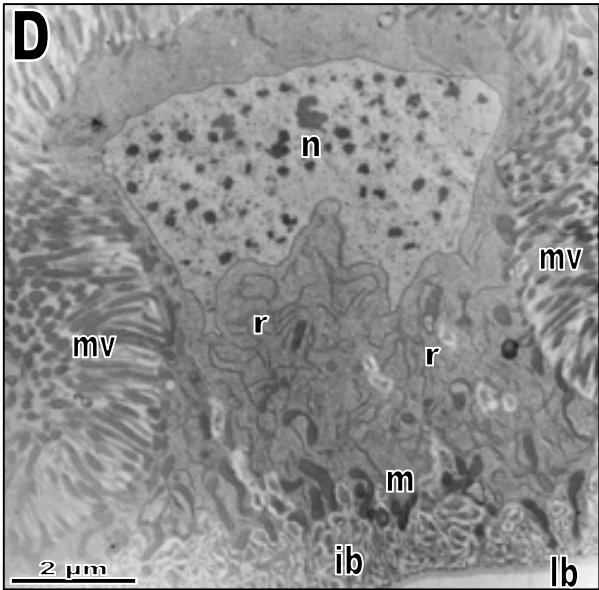
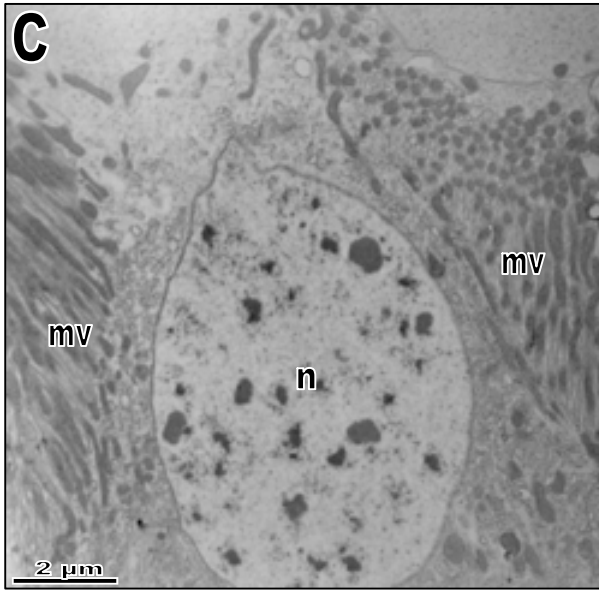
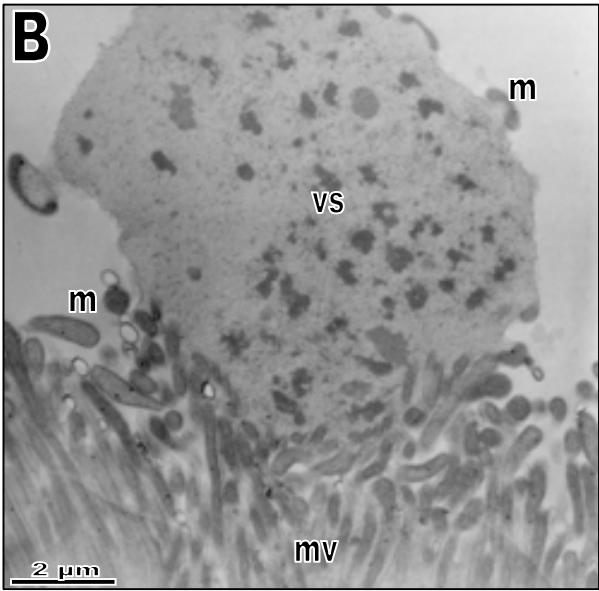
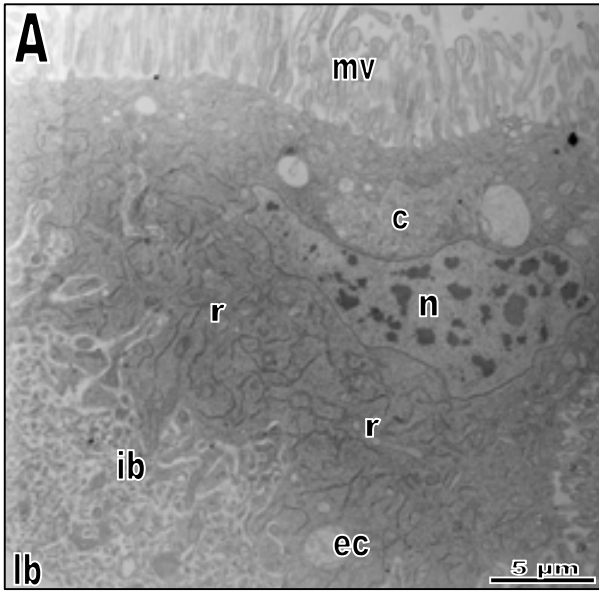
Alterações ultra-estruturais observadas por MET apontaram, em 24 h p. i., dilatação e princípio de ruptura das invaginações basais em algumas regiões dos túbulos. As invaginações ocupavam grande parte da altura (área) celular, as microvilosidades apresentavam poucas ou nenhuma mitocôndria em seu interior, enquanto algumas células apresentavam vacúolos contendo

prováveis concreções. A maior presença de concreções pode estar associada com uma maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 12A). Algumas células principais expulsavam grandes porções do conteúdo citoplasmático contendo mitocôndrias no centro e na periferia (Fig. 12B). Mais tardiamente, em 72 h p. i., túbulos apresentavam células principais lisadas, com princípio de expulsão nuclear (Fig. 12C). Enquanto isso, outras células apresentavam redução do comprimento das invaginações basais para cerca de 15% do tamanho celular, com ausência de espaços citoplasmáticos e predominância de mitocôndrias nas microvilosidades e na região basal (Fig. 12D). As mudanças morfológicas ocorridas em 72 h p. i. mantiveram-se em 120 h p. i., inclusive o rompimento de grande parte da membrana plasmática de algumas células, levando à saída de citoplasma para o lúmen dos túbulos e a lâmina basal apresentou algumas deformações próximas a regiões de células lisadas (Fig. 12E). Por outro lado, em algumas regiões, as invaginações basais sofreram expansão (Fig. 12F). Não foi observado nenhum indício de infecção viral nas células dos túbulos de Malpighi nos períodos analisados.





**Figura 11.** Micrografias de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por *vAgEGTΔegfp*. (A-C) Micrografias de fluorescência; (A) 24 h p. i., (B) 72 h p. i., (C) 120 h p. i. Asteriscos indicam fluorescência da proteína EGFP e seta indica célula traqueolar infectada. (D-F) MEV; (D) 24 h p. i., (E) 72 h p. i., (F) 120 h p. i. Detalhes: superfície do interior dos túbulos, asteriscos indicam protuberâncias, cabeças de seta indicam poros, setas indicam traquéolos.



**Figura 12.** MET. (A-B) Imagens provenientes de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por vAgEGT $\Delta$ *egfp* com 24 h p. i. (C-D) 72 h p. i. (E-F) 120 h p. i.; c – concreção, ec – espaços citoplasmáticos, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, r - retículo endoplasmático rugoso, vs – vesícula secretora, cabeça de seta indica deformação da lâmina basal.

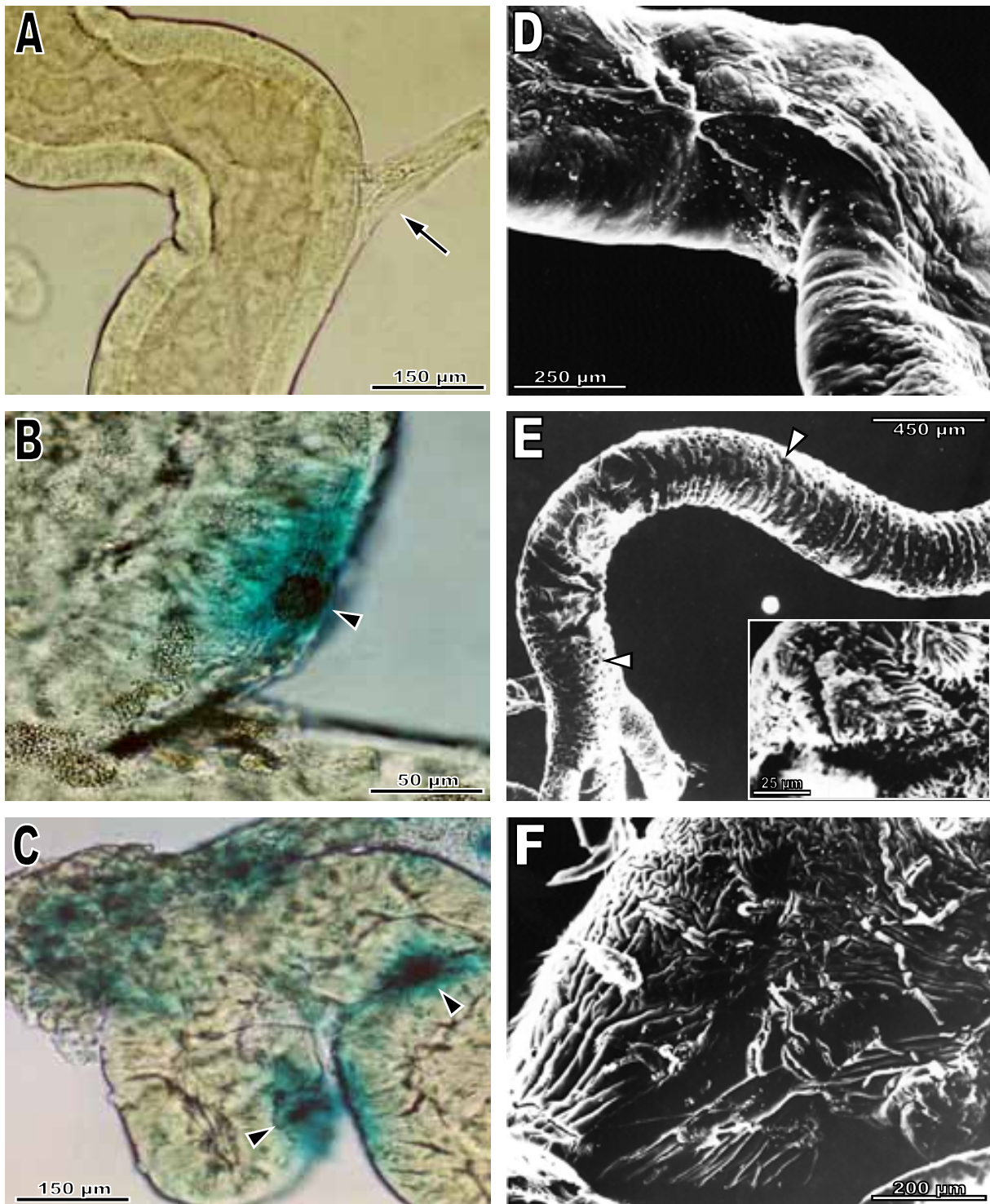
## 2.5) vAgGalA2

Os túbulos de Malpighi de larvas infectadas pelo baculovírus vAgGalA2 apresentaram, no período de 24 h p. i., um aspecto normal semelhante aos túbulos controle (Fig. 13A). No intervalo entre 48 e 72 h p. i., observou-se o aparecimento de focos azuis nas células traqueolares associadas aos túbulos. Ainda, manchas azuis foram observadas no interior dos túbulos nas regiões de contato com as células traqueolares (Fig. 13B). Mais tarde, já a 120 h p. i., havia grandes focos e manchas azuis da mesma natureza dos descritos no período anterior, juntamente com outros focos no tecido adiposo. Além disso, foram observadas manchas difusas, mais claras, no interior dos túbulos, porém em áreas outras que não as regiões de contato com as células traqueolares (Fig. 13C), o que indica filtração de LacZ ( $\beta$ -galactosidase) da hemolinfa ou difusão da proteína marcadora entre as células.

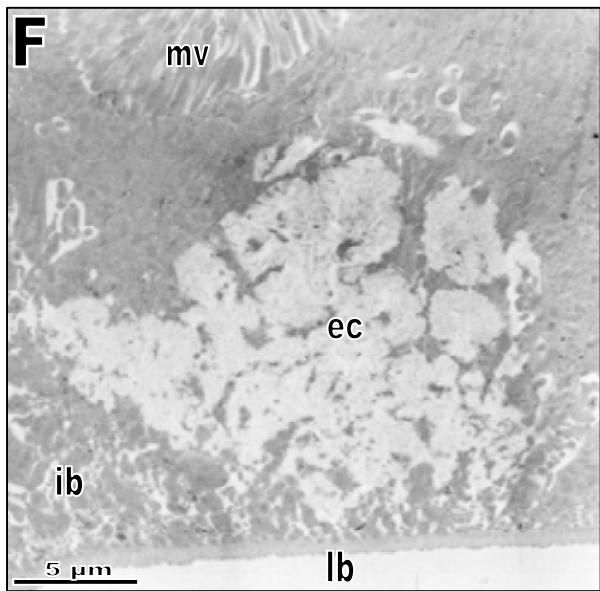
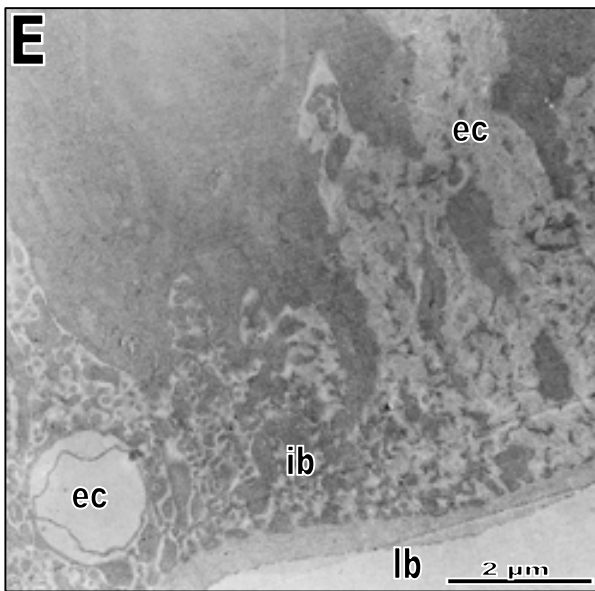
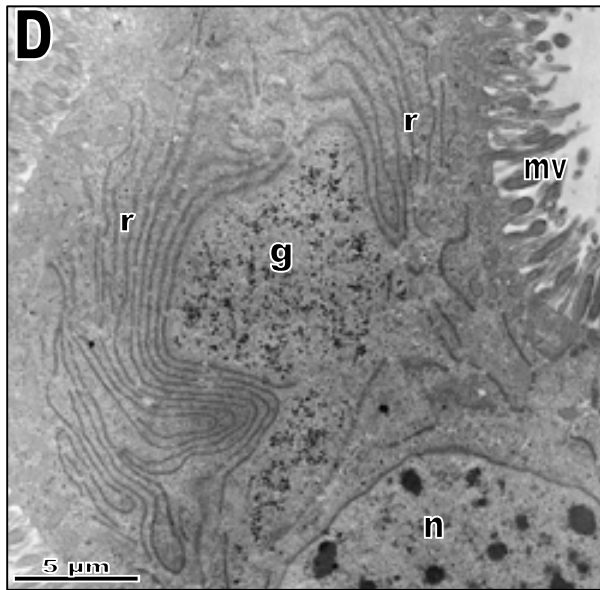
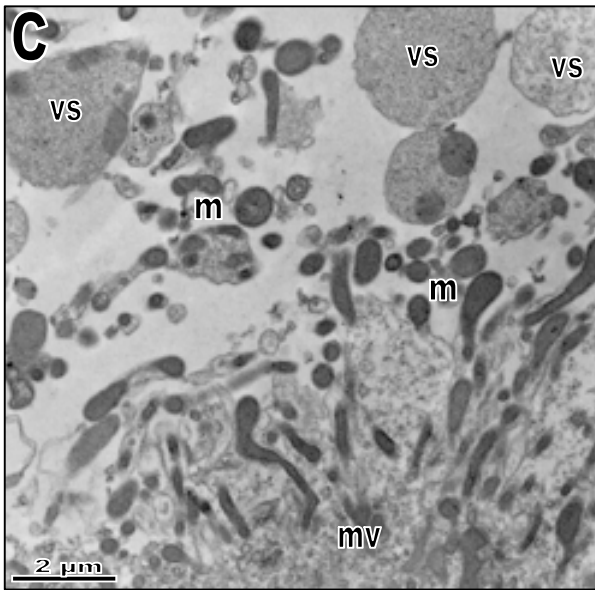
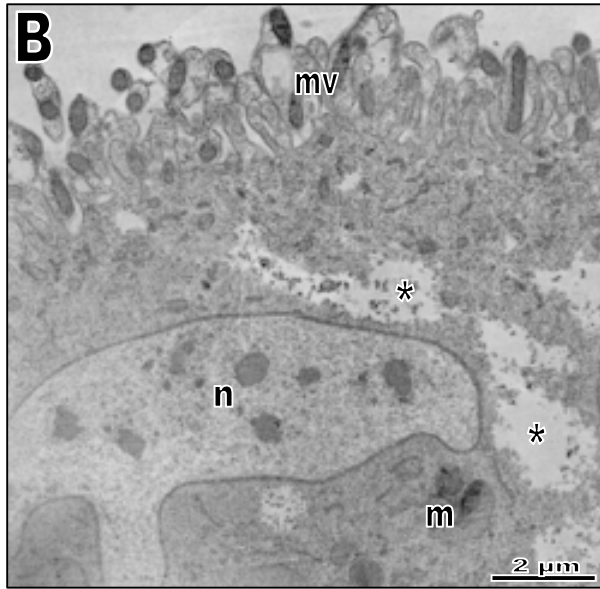
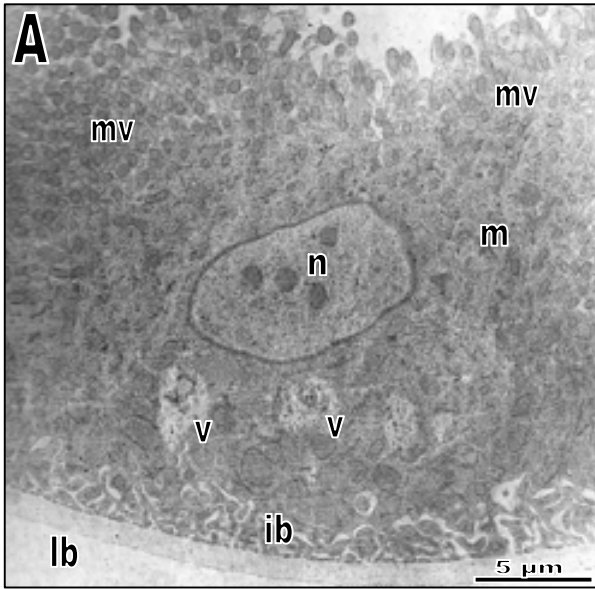
Ao analisar os túbulos por MEV, constatou-se novamente a ausência de rugosidades e a presença de reentrâncias rasas, mas numerosas, juntamente com um aspecto flácido e ressecado, em 24 h p. i. (Fig. 13D). Já com 72 h p. i., observou-se extensa degeneração da superfície traqueal ocasionada por poros (Fig. 13E). As reentrâncias da superfície tornaram-se mais severas e profundas. No interior dos túbulos, o epitélio indicava sinais de desorganização estrutural e de degeneração (Fig. 13E - detalhe). No período de 120 h p. i., os níveis avançados de degeneração não eram vistos apenas nos túbulos, mas também nas traquéias. Percebeu-se poucas diferenças na superfície dos túbulos, em relação a 72 h p. i., havendo apenas maior profundidade das reentrâncias, indicando provável degeneração na parte interior dos túbulos (Fig. 13F).

Observações iniciais ao MET mostraram alterações nas células principais em suas invaginações basais, espaços citoplasmáticos e microvilosidades. Com 24 h p. i., as invaginações basais, representavam cerca de 10% ou menos da altura (área) celular. Os espaços citoplasmáticos estavam menores e pouco numerosos, e as microvilosidades mantiveram sua organização, mas estavam menores e mais compactadas (Fig. 14A). Em outras regiões dos túbulos, observou-se acúmulo de provável material protéico na região apical de algumas células juntamente com redução

e desorganização das microvilosidades (Fig. 14B). O período de 72 h p. i. revelou uma diminuição ainda maior na quantidade de espaços citoplasmáticos nas células. Além disso, as invaginações basais continuavam reduzidas, porém as células apresentavam grande atividade secretora, tanto de vesículas quanto de secreções apócrinas. Em várias regiões pôde-se observar uma secreção massiva de vesículas de tamanhos variados, entre 1 e 6  $\mu\text{m}$ , contendo mitocôndrias em sua periferia (dados não mostrados), como descrito anteriormente. Observou-se também, indícios de expulsão celular do tecido, com uma região apical celular bastante desorganizada (Fig. 14C). Células apresentavam granulações electrón-densas em seu citoplasma próximos ao retículo endoplasmático rugoso e redução no tamanho das microvilosidades, porém a organização sofreu poucas alterações (Fig. 14D). As granulações são, provavelmente, moléculas de glicogênio que costumam ocupar todos os segmentos dos túbulos de Malpighi. Com o progresso da infecção na larva, os túbulos sofreram novas mudanças em 120 h p. i., observou-se dilatação das invaginações basais, fundindo-se em alguns pontos com os espaços citoplasmáticos (Fig. 14E). Essas fusões provocaram o aparecimento de grandes lacunas entre as células e a lâmina basal (Fig. 14F). Uma maior densidade do citoplasma das células foi observada nesse período. Não houve indícios de infecção viral nessas células em nenhum dos períodos observados.



**Figura 13.** Micrografias de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por vAgGalA2. (A-C) Micrografias de luz; (A) 24 h p. i., (B) 72 h p. i., (C) 120 h p. i. Seta indica traquéia e cabeça de seta indica célula traqueolar infectada. (D-F) MEV; (D) 24 h p. i., (E) 72 h p. i. – detalhe: superfície do interior dos túbulos, (F) 120 h p. i. Cabeças de seta indicam poros.



**Figura 14.** MET. (A-B) Imagens provenientes de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por vAgGalA2 com 24 h p. i. (C-D) 72 h p. i. (E-F) 120 h p. i.; ec – espaços citoplasmáticos, g – grânulos de glicogênio, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, r - retículo endoplasmático rugoso, vs – vesícula secretora, asteriscos indicam agregados de provável material protéico.



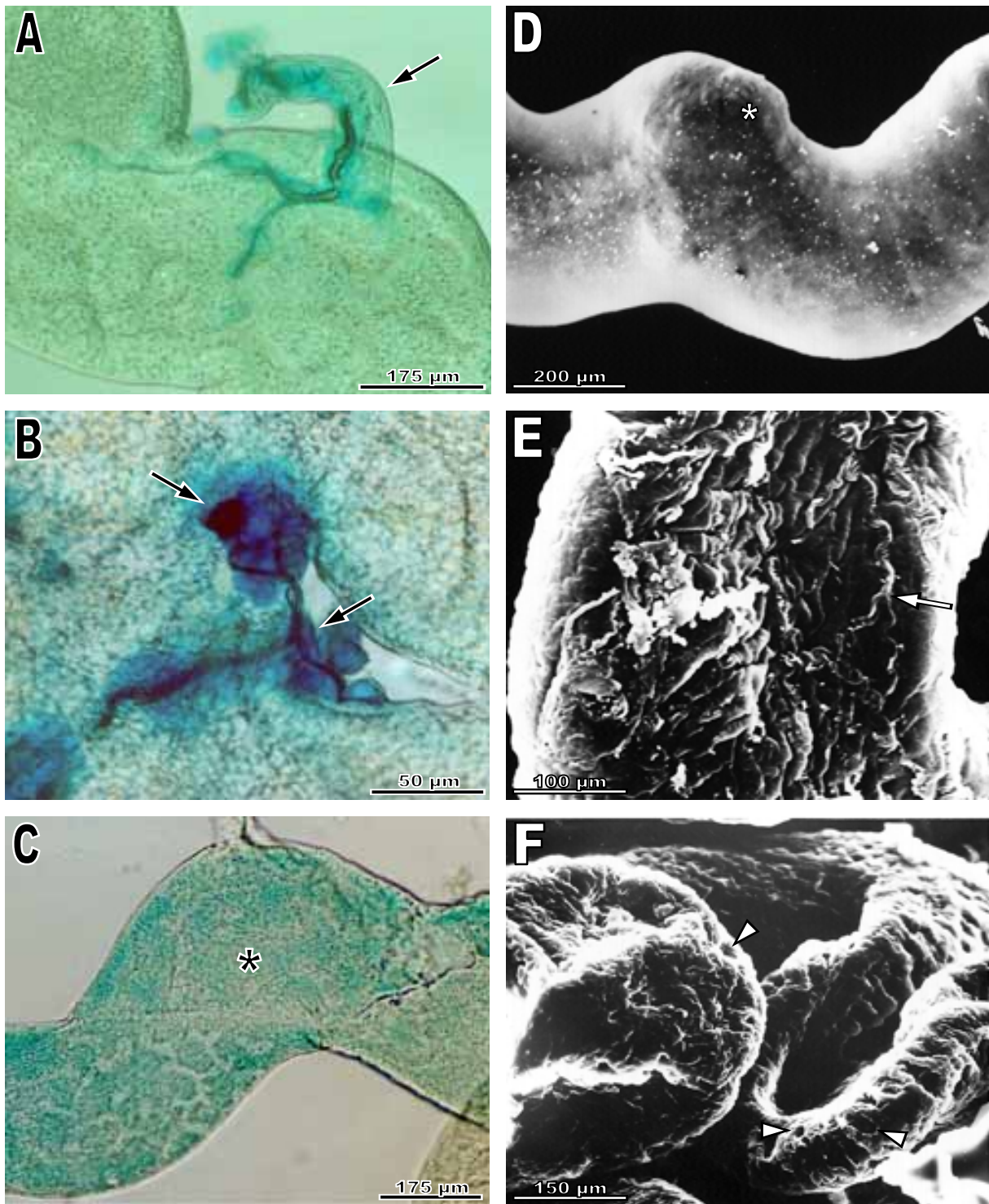
## 2.6) vAgEGTΔ-lacZ

Utilizando o inóculo contendo o gene *egt* deletado, a infecção por vAgEGTΔ-lacZ revelou uma predominância de focos azuis em células traqueolares associadas aos túbulos de Malpighi a partir de 48 h p. i., sendo que o período de 24 h p. i. foi marcado por escassos focos ao longo dos túbulos (Fig. 15A). Observou-se indícios de degeneração epitelial e áreas com manchas azuladas como as descritas anteriormente para o vírus vAgGalA2. Com o decorrer da infecção, os túbulos continuaram a apresentar os focos azuis nas células traqueolares, porém adquiriram um aspecto granuloso por toda sua extensão às 72 h p. i. (Fig. 15B) e esse padrão progrediu para uma granulação e degeneração, juntamente com a difusão da proteína LacZ por grandes extensões dos túbulos durante o período de 120 h p. i. (Fig. 15C).

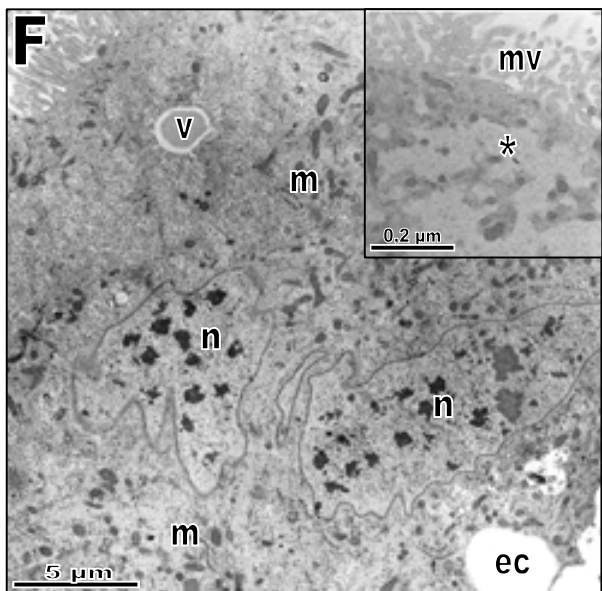
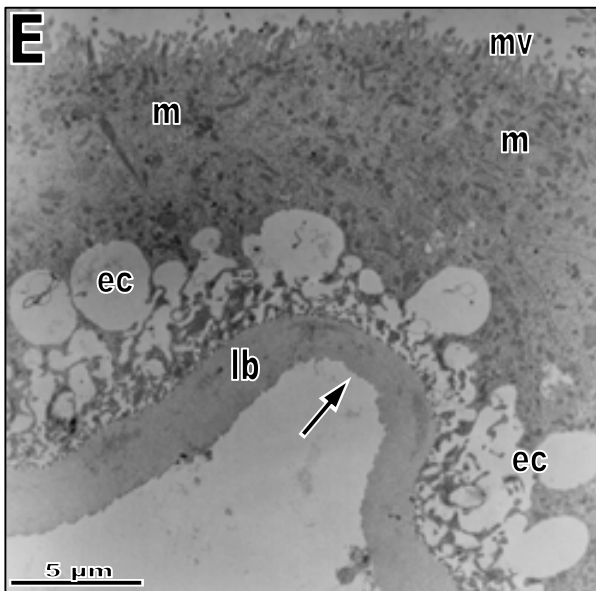
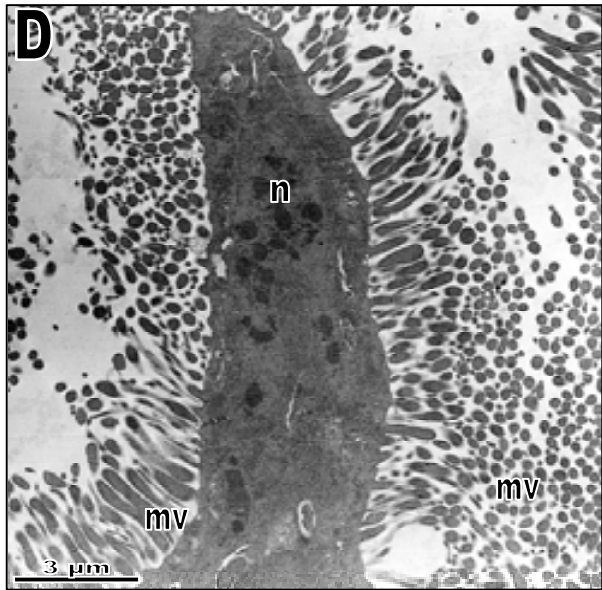
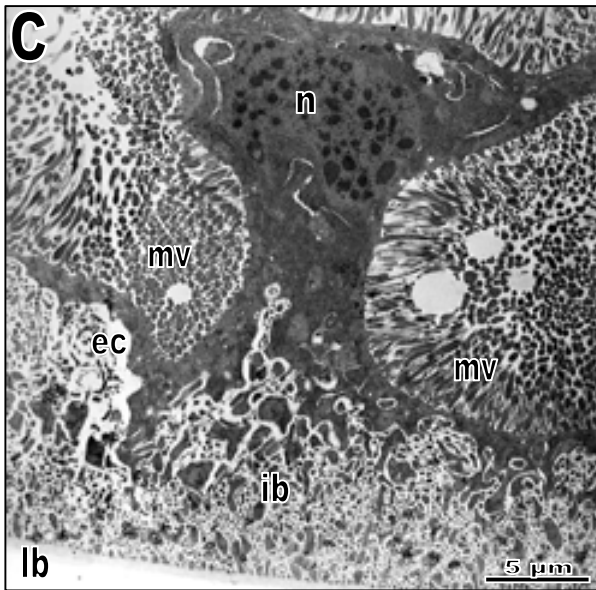
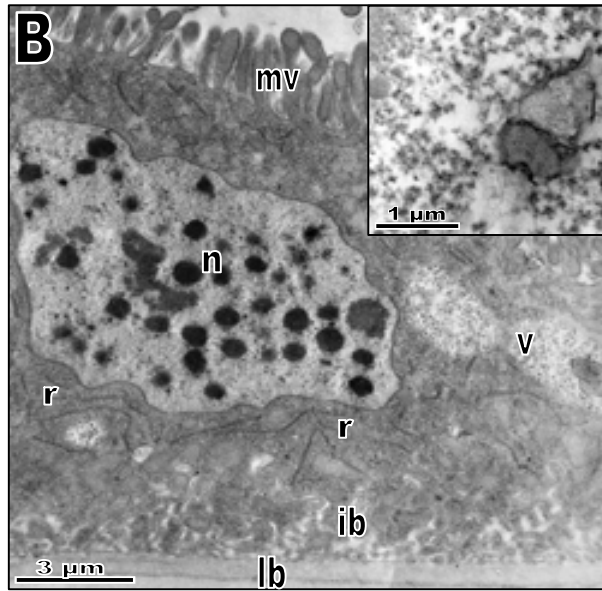
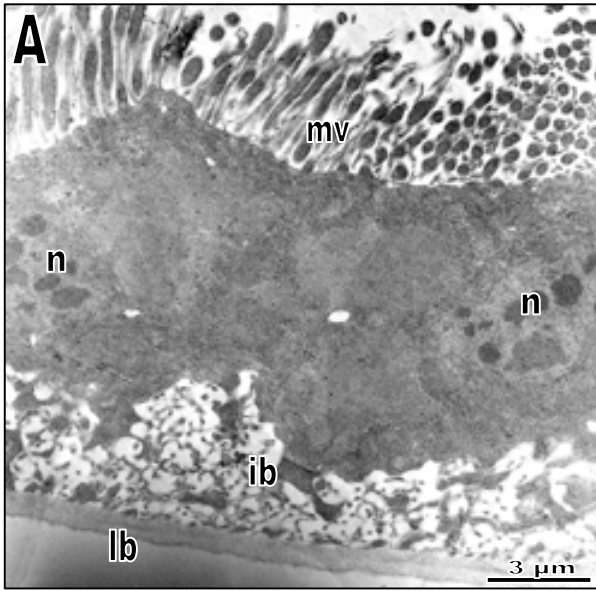
Alterações ultra-estruturais na superfície dos túbulos assemelharam-se muito às provocadas pelos outros baculovírus. Com 24 h p. i., observações por MEV revelaram o desaparecimento das rugosidades presentes em túbulos controle, porém sem apresentar o aspecto ressecado e flácido, apresentando apenas pequenas protuberâncias na superfície (Fig. 15D). Com o passar do tempo, os túbulos adquiriram o aspecto ressecado e flácido apresentando reentrâncias de profundidade moderada e traquéolos lesionados, por volta de 72 h p. i. (Fig. 15E). Ao final da infecção, os túbulos apresentaram alto grau de degeneração, apresentando grandes protuberâncias juntamente com reentrâncias profundas, causando poros na superfície dos túbulos em 120 h p. i. (Fig. 15F).

Análises por MET, em 24 h p. i., permitiram a observação do alargamento das invaginações basais das células principais em algumas regiões (Fig. 16A). Em outras regiões, as invaginações encontravam-se normais, porém nos espaços citoplasmáticos, pôde ser observado um material granular fino. As microvilosidades encontravam-se levemente reduzidas (Fig. 16B). Conforme o progresso da infecção, os túbulos sofreram grandes modificações. Os espaços citoplasmáticos desapareceram, em virtude da extensa dilatação ocorrida nas invaginações basais em 72 h p. i., em várias regiões dos túbulos, ocupando entre 40 a 90% da altura (área) celular. Na região apical das

células foram observadas estruturas semelhantes a espaços citoplasmáticos (Fig. 16C). Foram observados padrões morfológicos incomuns do núcleo, como alta condensação da cromatina; o citoplasma dessas células estava muito denso, dificultando a localização de possíveis organelas e apresentava indícios de ruptura. Além disso, as microvilosidades mostravam-se desorganizadas (Fig. 16D). A lâmina basal manteve-se íntegra e contínua até o período de 120 h p. i., em que se pôde observar forte deformação da membrana semelhante às reentrâncias observadas por MEV anteriormente e ruptura das invaginações basais, juntamente com diminuição e desorganização das microvilosidades (Fig. 16E). Nesse período, também se observou em outras células alta desorganização citoplasmática ocasionada pela presença massiva de prováveis agregados protéicos entre as mitocôndrias, as quais já se encontravam fora das microvilosidades, nas regiões apical e intermediária do citoplasma (Fig. 16F). Em nenhum dos períodos observados houve indícios de ocorrência de infecção viral nas células dos túbulos de Malpighi das larvas.



**Figura 15.** Micrografias de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por *vAgETA-lacZ*. (A-C) Micrografias de luz; (A) 24 h p. i., (B) 72 h p. i., (C) 120 h p. i. Asterisco indica área de degeneração tecidual e setas indicam traquéias contendo a proteína LacZ. (D-F) MEV; (D) 24 h p. i., (E) 72 h p. i., (F) 120 h p. i. Asterisco indica protuberância, cabeças de seta indicam poros e seta indica traquéolo.



**Figura 16.** MET. (A-B) Imagens provenientes de túbulos de Malpighi de larvas infectadas por vAgEGTΔ-*lacZ* com 24 h p. i. (C-D) 72 h p. i. (E-F) 120 h p. i.; ec – espaços citoplasmáticos, ib – invaginações basais, lb – lâmina basal, m - mitocôndrias, mv – microvilosidades, n –núcleo, r - retículo endoplasmático rugoso, v – vesícula, asterisco indica agregado de material protéico e seta indica deformação da lâmina basal.

As principais alterações morfológicas causadas pelos diferentes baculovírus utilizados estão sumarizadas e sistematizadas de forma comparativa na tabela 1. Estas alterações referem-se a compactações, expansões, rupturas, deformações e degenerações das estruturas celulares. A comparação entre os efeitos morfológicos está baseada na presença e intensidade de cada alteração observada nos túbulos de Malpighi.

**Tabela 1.** Intensidade e presença das alterações morfológicas nos túbulos de Malpighi de *A. gemmatilis* infectadas por AgMNPV e recombinantes.

Alterações morfológicas	AgMNPV	vAgp2100egfp	vAgEGTΔegfp	vAgGalA2	vAgEGTA-lacZ
<b>MET</b>					
Desorganização das microvilosidades	*	*	**	***	***
Alterações nos espaços citoplasmáticos	**	*	**	**	***
Alterações nas invaginações basais	**	**	**	***	***
Alterações nas mitocôndrias	**	**	**	*	*
Secreções apócrinas	*	-	**	**	*
Deformações na lâmina basal	-	-	**	*	**
Densidade citoplasmática	*	*	*	**	**
Morte celular	*	**	**	**	**
<b>MEV</b>					
Aspecto flácido e ressecado	**	**	*	***	**
Profundidade das reentrâncias	**	**	*	**	***
Protuberâncias	-	*	**	-	*
Invaginações (poros)	*	**	-	-	**
Cristais	-	*	-	-	-

Asteriscos (\*) representam a intensidade e presença das respectivas alterações morfológicas comparativamente entre os baculovírus utilizados: baixa (\*), média (\*\*) e alta (\*\*\*).

### 3) Bioensaios

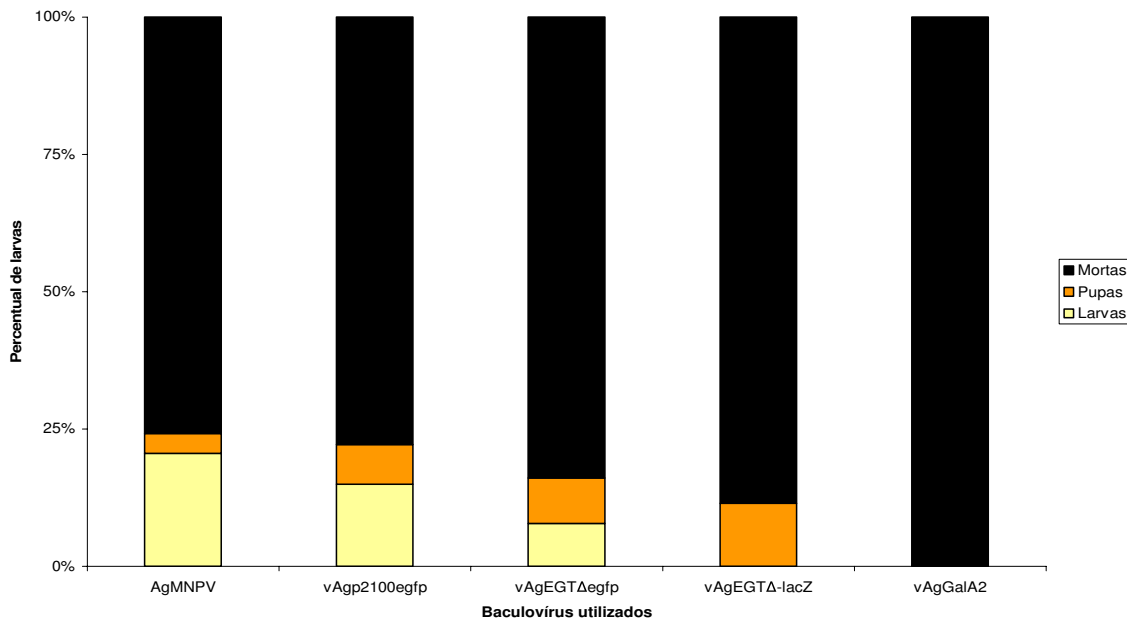
O progresso do bioensaio permitiu o acompanhamento do comportamento das larvas pós-infecção. Algumas horas pós-infecção as larvas já se alimentavam e se locomoviam menos. As larvas que morreram até 48 h p. i. não indicavam sintomas de infecção e algumas continham forte melanização na região oral e do intestino anterior, indicando possível trauma resultante da inoculação oral. Após 72 h p. i., muitas larvas tornaram-se esbranquiçadas, enquanto um percentual muito baixo de outras larvas conseguiu realizar muda para o 5º instar. As larvas mortas apresentaram liquefação do tegumento juntamente com uma leve melanização, por volta de 24 h pós-morte.

As infecções realizadas com AgMNPV resultaram em uma mortalidade larval de 75,83% após 11 dias pós-infecção (d p. i.). Apenas 3,6% das larvas tornaram-se pupas, enquanto 20,57% ainda estavam vivas e em estado larval. Para as infecções por vAgp2100*egfp*, 77,83% das larvas morreram após 11 d p. i. Tornaram-se pupas, apenas 7,2% dos indivíduos e, 14,97% estavam em estágio larval. As infecções por vAgEGTΔ*egfp* resultaram em 83,9% de mortalidade após 11 d p. i., sendo que 8,3% dos indivíduos tornaram-se pupas, e 7,8% estavam vivas e em estágio larval. Utilizou-se o vírus vAgGalA2 (co-ocluído com o vírus selvagem) e obteve-se 100% de mortalidade em 11 d p. i. Não houve formação de pupas. Por sua vez, infecções por vAgEGTΔ-*lacZ* resultaram em 88,55% de mortalidade em 11 d p. i. Apenas 11,45% tornaram-se pupas, sendo que não restaram indivíduos no estado larval (Figura 17).

Os dados de tempo letal 50% (LT<sub>50</sub>) revelaram que o baculovírus selvagem AgMNPV levou aproximadamente 7,67 dias para eliminar metade da população de larvas. Por sua vez, os recombinantes vAgp2100*egfp* e vAgEGTΔ*egfp* levaram aproximadamente 6,92 e 6,59 dias, respectivamente. Já os recombinantes vAgGalA2 e vAgEGTΔ-*lacZ* obtiveram um LT<sub>50</sub> aproximado de 5,08 e 5,99 dias, mostrando uma diferença significativa em relação ao tipo selvagem (Tabela 2)

(Figura 18). Os valores de  $\chi^2$  não foram significativos, o que indica que os dados se encaixam no modelo Probit utilizado.

Os valores da  $LT_{50}$  dos recombinantes contendo *egfp* ficaram próximos (~0,75 - 1,08 dias) dos valores obtidos por AgMNPV. Houve uma sobreposição entre os intervalos dos limites fiduciais dos três baculovírus, o que indica que não há uma diferença estatística significativa entre os valores de  $LT_{50}$  dos vírus. Por sua vez, a comparação entre os resultados obtidos para os baculovírus recombinantes contendo o gene *lacZ* e o baculovírus selvagem revelou uma grande diferença (~1,68 - 2,59 dias), não havendo sobreposição entre os limites fiduciais de vAgEGTΔ-*lacZ* e vAgGalA2 com os de AgMNPV. Isso indica que a diferença entre os resultados dos recombinantes contendo *lacZ* e de AgMNPV é estatisticamente significativa. Os recombinantes contendo *egfp* não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si e em relação ao AgMNPV. Relacionando-se todos os recombinantes, apenas o vAgGalA2 não apresenta sobreposição dos limites fiduciais, sendo sua diferença estatisticamente significativa em relação aos outros recombinantes e ao baculovírus selvagem.



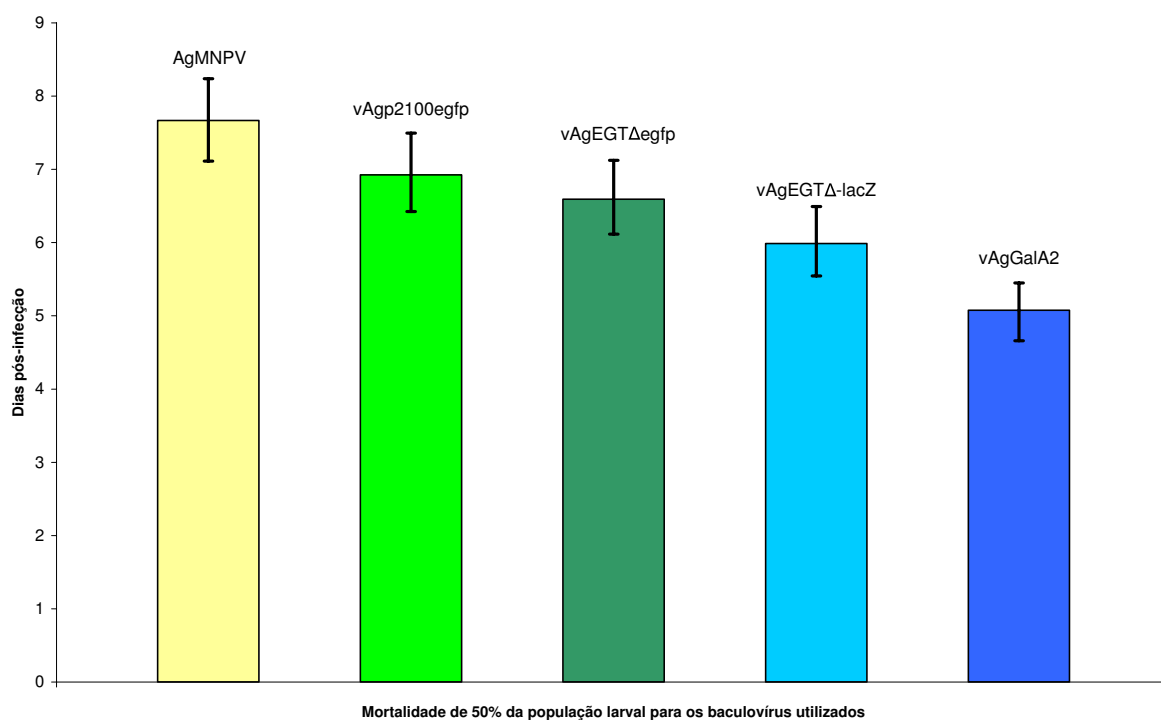
**Figura 17.** Larvas de *A. gemmatilis* infectadas com AgMNPV selvagem e recombinantes apresentando os diferentes estágios larvais durante o período do experimento (11 d p. i.) e o percentual de mortalidade (n=30).



**Tabela 2.** Valores de tempo letal médio (LT<sub>50</sub>), limites fiduciais de 95% da LT<sub>50</sub> (95% LF), inclinação e qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as larvas de *A. gemmatalis* infectadas com os baculovírus.

Vírus testados	LT <sub>50</sub>	95% LF	Inclinação	$\chi^2$
AgMNPV	7,67	7,11 - 8,24	4,9	4,0 <sup>ns</sup>
vAgp2100egfp	6,92	6,42 - 7,49	4,9	22,4 <sup>ns</sup>
vAgEGTΔegfp	6,59	6,11 - 7,12	5,3	8,5 <sup>ns</sup>
vAgEGTΔ-lacZ	5,99	5,54 - 6,49	5,9	7,6 <sup>ns</sup>
vAgGalA2	5,08	4,66 - 5,45	8,4	6,5 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> Valores não significativos.



**Figura 18.** Tempo levado para atingir 50% de mortalidade da população (LT<sub>50</sub>) de larvas de *A. gemmatalis* infectadas por AgMNPV e recombinantes (n=30).

## DISCUSSÃO

As principais alterações morfológicas causadas em tecidos de larvas de lepidópteros durante as mudanças de instar também são observadas na fase pupal, em que ocorre a metamorfose da larva. Essas alterações ocorrem principalmente no epitélio intestinal, onde é observada a escamação, e nos

neurônios motores e músculos, havendo degeneração desses tecidos e, conseguinte regeneração dos mesmos (Chapman, 1998). Recentemente foi demonstrado que 20-hidroxicidisona induz apoptose nas células das glândulas de seda de *B. mori*, provavelmente por vias genômicas e não-genômicas (Iga *et al.*, 2007).

A análise da patologia da infecção nos órgãos de larvas de *A. gemmatalis* com uso do baculovírus recombinante vAgEGTΔ-*lacZ* (Soares, 2005; Soares & Ribeiro, 2005) mostrou que túbulos de Malpighi de *A. gemmatalis* sofrem degeneração precoce. São observados poros em sua superfície e grandes vacúolos citoplasmáticos em suas células por meio de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, respectivamente. Porém, não houve indícios de infecção nas células dos túbulos de Malpighi (Soares, 2005).

Eventos semelhantes foram observados em túbulos de Malpighi de larvas de *Calpodex ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae) inoculados com d-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Reisner *et al.*, 1989), havendo inibição da secreção de fluídos e indução de alterações que culminaram em lise celular e desorganização epitelial. Dessa forma, a degeneração parece não estar relacionada diretamente com a infecção viral. É possível que o produto do gene *egt* viral preserve os túbulos de Malpighi contra degeneração precoce, o que resulta em um retardamento da morte do hospedeiro e conseqüente benefício na produção de progênie viral. Pinedo *et al.* (2003) observaram que a deleção do gene *egt* resultava em redução da progênie viral em cerca de 50% em relação ao baculovírus selvagem.

Focos de expressão de LacZ e EGFP nas regiões de contato entre o sistema traqueal e os túbulos de Malpighi foram observados em microscopia de luz. A infecção e morte das células traqueolares, assim como a degeneração de traquéolos, foram relatadas por meio das microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. O aparecimento de focos de infecção, por volta de 24 h p. i., observados por microscopia de luz em células traqueolares associadas aos túbulos de Malpighi está de acordo com o observado e descrito em outros trabalhos (Engelhard *et al.*, 1994; Barret *et al.*, 1998). Além de prejudicar o suprimento de oxigênio do organismo, o que afeta diretamente a

respiração celular, a infecção também pode atacar as glândulas epitraqueais, que fazem parte do sistema traqueal e que são conhecidas apenas em lepidópteros. Em *Manduca*, cada glândula epitraqueal é um grupo de três ou quatro células ligadas a uma traquéia próxima de cada espiráculo. Essas células são a fonte do hormônio iniciador de ecdise (Zitnan *et al.*, 1996). Dessa forma, a inibição da mudança de instar também pode ser influenciada pela infecção viral em si, ocorrendo a infecção e morte das células traqueolares associadas a essas glândulas ou até mesmo as próprias células constituintes da glândula, e não apenas pela presença do gene *egt* viral. Além disso, as mudanças comportamentais ocasionadas pela infecção por baculovírus relacionadas à redução na alimentação também influenciam nas mudas das larvas, pois insetos não sintetizam esteróides. Os esteróis, geralmente colesterol ou uma estrutura parecida são constituintes essenciais da dieta dos insetos (Chapman, 1998).

Apesar da presença das proteínas marcadoras no interior dos túbulos e das células, não foram constatados indícios morfológicos característicos de infecção de baculovírus em células de inseto nos túbulos de Malpighi, como arredondamento celular, formação do estroma virogênico e presença de agregados protéicos e partículas virais no núcleo e/ou citoplasma (Williams & Faulkner, 1997). Dessa forma, pode-se imaginar que os BV conseguem entrar nas células, mas não conseguem se replicar, o que é pouco provável. Provavelmente, os BV da hemolinfa não são capazes de atravessar a lâmina basal dos túbulos de Malpighi, que pode ter sua composição diferente da lâmina basal intestinal. Além disso, mesmo para a lâmina basal intestinal, foi proposto que os baculovírus desviam dessa barreira, infectando células da traquéia (Engelhard *et al.*, 1994). Existem dados na literatura mostrando absorção e excreção de corantes pelos túbulos de Malpighi, como índigo-carmin, fluoresceína e vermelho neutro; os corantes muitas vezes são excretados, podendo ficar armazenados nas células, devolvidos ao lúmen e reabsorvidos, formando gradientes ao longo da extensão dos túbulos, dependendo do corante (Wigglesworth, 1972).

Os focos iniciais de fluorescência nos túbulos de Malpighi, por volta de 24 h p. i., eram decorrentes provavelmente e principalmente da filtração da hemolinfa, pois a infecção viral já havia

alcançado os hemócitos (Barret *et al.*, 1998). Isso poderia estar causando o aparecimento de focos difusos, que dificultaram uma localização mais precisa da proteína, pois as proteínas fluorescentes perdem a sensibilidade da observação quando estão com baixa intensidade (Billington & Knight, 2001), nesse caso, devido à baixa concentração de EGFP filtrada por cada célula, individualmente. Além disso, provavelmente havia difusão de EGFP, que permitia sua passagem das células traqueolares para o interior dos túbulos de Malpighi, ocasionando o aparecimento de outros focos difusos nas regiões de contato.

Comparando-se os recombinantes contendo o mesmo gene repórter, observou-se pouca diferença entre as alterações morfológicas produzidas pela infecção e a intensidade das mesmas. Porém, como esperado, em relação ao baculovírus selvagem AgMNPV, os recombinantes demonstraram ser capazes de causar maiores efeitos patológicos, em termos gerais. Contudo, devem ser feitas considerações sobre as alterações provocadas pelos recombinantes para avaliar a influência de suas construções moleculares.

As infecções dos recombinantes *vAgp2100egfp* e *vAgEGTΔegfp* produziram padrões e intensidades de fluorescência semelhantes tanto temporalmente, quanto espacialmente, nos túbulos de Malpighi das larvas infectadas. Em MEV, os túbulos de larvas infectadas por *vAgp2100egfp* apresentaram um maior grau de frouxidão e ressecamento, juntamente com formação de poros ao longo da superfície, enquanto os túbulos de larvas infectadas por *vAgEGTΔegfp* mostravam reentrâncias pouco profundas, juntamente com depressões e protuberâncias em sua superfície. No período avançado de 120 h p. i., a infecção por *vAgEGTΔegfp* produziu protuberâncias mais nítidas ao longo dos túbulos enquanto a infecção por *vAgp2100egfp* produziu poros profundos e cristais na superfície. Ambos eventos dos recombinantes indicam degeneração interna e morte celular. No caso do *vAgp2100egfp*, isso causou rompimento da lâmina basal, resultando no vazamento de componentes inorgânicos armazenados nas células, como oxalato de cálcio (Flipsen *et al.*, 1995a), para fora dos túbulos, que acabaram se cristalizando. Em MET, *vAgEGTΔegfp* apresentou alterações morfológicas mais severas em tempos iniciais, como secreções apócrinas,

expansão das invaginações basais e morte celular, enquanto vAgp2100*egfp* assemelhou-se a este apenas no período tardio de 120 h p. i., em que, a princípio, ambas infecções mostraram grande avanço dos efeitos patológicos.

Os recombinantes contendo LacZ, vAgEGTΔ-*lacZ* e vAgGalA2, por sua vez, mostraram algumas discrepâncias. O aparecimento antecipado de focos azuis provenientes da reação de X-Gal com seu substrato LacZ da infecção pelo vírus vAgEGTΔ-*lacZ* em relação ao vAgGalA2 deve-se ao fato de que o cassete gênico *lacZ* de vAgGalA2 encontra-se no locus da poliedrina, sob controle de seu promotor, que é um promotor tardio, tendo seu ápice de expressão por volta de 48 h p. i. (Willians & Faulkner, 1997). Enquanto isso, o *lacZ* de vAgEGTΔ-*lacZ* está sob controle do promotor *hsp70*, que é um promotor constitutivo, que é ativo desde o princípio da replicação viral, ou seja, entre 30 min p. i. e 6 h p. i. (Friesen, 1997). Em MEV, vAgGalA2 mostrou causar alterações de forma mais branda do que vAgEGTΔ-*lacZ*. Enquanto o primeiro apresentava ressecamento e reentrâncias, o segundo apresentava poros e protuberâncias na superfície dos túbulos, em tempos tardios. Em MET, as observações não foram diferentes. O recombinante vAgGalA2 provocou alterações morfológicas relevantes a partir do período de 72 h p. i., resultando em ampla desorganização tecidual, provocada principalmente pela expansão das invaginações basais e espaços citoplasmáticos. Enquanto isso, vAgEGTΔ-*lacZ* causou efeitos patológicos desde períodos iniciais até períodos avançados, culminando em alterações mais severas, como deformações na lâmina basal e rompimento das invaginações basais. Em síntese, o forte promotor de *lacZ* de vAgGalA2, não causou maiores efeitos patológicos do que o gene *egt* deletado de vAgEGTΔ-*lacZ* e seu promotor *hsp70*, fato este que pode estar relacionado com o momento de expressão do promotor, o qual é tardio.

Fazendo uma comparação geral entre os baculovírus recombinantes utilizados na pesquisa, constatou-se que vAgEGTΔ-*lacZ* foi o mais patogênico, seguido de vAgGalA2, vAgEGTΔ*egfp*, vAgp2100*egfp* e AgMNPV. O baculovírus do tipo selvagem demonstrou ser menos patogênico devido ao fato de causar menos dano ao tecido, isso parece estar relacionado com a ausência de

modificações moleculares. Os recombinantes contendo *lacZ* apresentaram maior grau de efeitos patológicos provavelmente devido a uma maior citotoxicidade da proteína LacZ em relação a proteína EGFP. A ausência da expressão do gene *egt* também resultou em maiores efeitos patológicos morfológicos quando comparados os recombinantes que contém o mesmo gene marcador. Existe também a possibilidade da degeneração dos túbulos também estar associada a algum produto viral que se gera intermediários tóxicos ao ser metabolizado por este órgão, contudo isso não pôde ser avaliado no trabalho.

A ausência de rugosidades em MEV durante as infecções pode ser produto de um inchaço ou aumento de volume do órgão devido a uma possível participação dos túbulos de Malpighi em respostas imunes (McGettigan *et al.*, 2005), como visto em alguns órgãos linfáticos de vertebrados. Em MEV foi possível observar alterações antes de 24 h p. i. Isso pode ser explicado pelo fato dos túbulos de Malpighi serem um dos primeiros órgãos a entrar em contato com os BV e proteínas virais que chegam à hemolinfa, devido à sua localização livre no sistema aberto desses insetos e sua atividade filtradora. A presença de grandes vesículas formadas em meio a tanta morte celular, visualizadas em MET, pode estar relacionada com essa possível função imune dos túbulos de Malpighi, que aumenta significativamente sua síntese protéica e atividade secretora quando em contato com patógenos, podendo haver substâncias antimicrobianas nessas vesículas (McGettigan *et al.*, 2005).

Muitas das alterações visualizadas por MEV estão relacionadas com mudanças ultra-estruturais observadas em MET, como por exemplo: o aspecto ressecado e flácido observado em MEV pode estar relacionado com a dilatação e ruptura das invaginações basais, retirando o contato entre o epitélio interno e a lâmina basal que proporcionava sustentação ao tecido. Outro exemplo é a formação de invaginações, reentrâncias e poros na superfície dos túbulos, que podem estar relacionadas com a frouxidão descrita acima, ausência de sustentação interna e pontos de dobramento da própria membrana.

Há indícios de que estejam ocorrendo pelo menos dois tipos de morte celular nas células dos túbulos de Malpighi de larvas infectadas. Algumas células apresentaram rompimento de membrana, com vazamento do conteúdo citoplasmático para o lúmen dos túbulos, organelas degeneradas e padrão incomum de organização nuclear, porém não apresentando lise nuclear, o que indica possível oncose (revisado por Majno & Joris, 1995); considerando necrose como um termo que define a presença de células mortas e soma de alterações ocorridas nas células após sua morte independente do processo pré-letal (revisado por Fink & Cookson, 2005). Oncose, também conhecida por necrose primária, é representada morfológicamente por eventos que levam à visualização da necrose, como degeneração celular e de organelas, *blebbing*, aumento de permeabilidade e rompimento de membrana. Este processo de morte celular pode resultar da presença de agentes tóxicos que interferem na geração de ATP, ou processos que causam consumo de energia da célula, levando a mesma a um esgotamento energético e falha das bombas de íons da membrana (revisado por Fink & Cookson, 2005). Foi proposto em alguns modelos experimentais que patógenos podem induzir oncose, como por exemplo, infecção por rotavírus e *Pseudomonas aeruginosa*, em que as células apresentaram degeneração de organelas, rápida ruptura de membrana e degeneração nuclear sem fragmentação internucleossomal do DNA (revisado por Fink & Cookson, 2005). Portanto, é provável que as células principais do túbulo de Malpighi, que possuem alta atividade metabólica relacionada com produção de proteínas, secreção e transporte ativo na membrana, possam entrar em oncose devido à diminuição de oxigenação e de nutrição dos túbulos resultantes da infecção viral no inseto e da morte das células traqueolares. Algumas células mostraram possíveis grânulos de glicogênio em seu citoplasma, o que indica utilização de suas reservas energéticas a partir da quebra do polímero de glicogênio, visando a liberação de moléculas de glicose para uso imediato após atividades metabólicas extenuantes e repentinas (Berg *et al.*, 2002).

Por outro lado, outras células conseguiam organizar seu citoplasma e lançar grandes volumes de seu conteúdo citoplasmático para o lúmen, levando consigo mitocôndrias, outras

organelas e fragmentos nucleares, ocasionalmente. Provavelmente, essas células estavam em processo de apoptose. Apoptose é um evento marcado por encolhimento celular e condensação citoplasmática, marginação e condensação da cromatina no núcleo e distorções da membrana plasmática denominadas brotamentos, que eventualmente podem dar origem a corpos apoptóticos formados por extensões intactas de membrana plasmática contendo organelas e/ou fragmentos nucleares, resultando em um processo não-inflamatório (revisado por Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Fink & Cookson, 2005).

O fato de não haver indícios de infecção nessas células reduz drasticamente as chances das células dos túbulos de Malpighi estarem protegidas contra a indução de apoptose pela expressão de genes virais como *iap* e *p35* (Clem & Miller, 1994). Outro fator que reforça a probabilidade de eventos apoptóticos é o acúmulo das proteínas marcadoras EGFP e LacZ, que foram mostradas capazes de induzir apoptose em certas concentrações intracelulares. Liu *et al.* (1999) observaram apoptose em cerca de 3% de uma população celular com 48 h pós-transfecção plasmidial em cultura de células animais e tumorais geradas por produção e acúmulo de GFP. Além disso, Zheng e colaboradores (2000) relataram parada no ciclo celular e retardo no crescimento em cerca de 33% de uma população de células de mamífero infectada com um adenovírus contendo o gene *lacZ*, em 24 h p. i. Ainda foi verificado um alto índice de acúmulo de  $\beta$ -galactosidase no citoplasma dessas células. As proteínas heterólogas produzidas de maneira desregulada, acumulam no citoplasma (Brand *et al.*, 1999), e proteínas produzidas de maneira desbalanceada e anormal podem induzir apoptose (Aridor & Balch, 2000). No caso dos túbulos de Malpighi, foi observado que ambas as proteínas eram absorvidas da hemolinfa pelos túbulos ou difundidas pelas células traqueolares associadas aos túbulos de Malpighi e, em alguns casos, pôde-se observar acúmulo de agregados provavelmente protéticos no citoplasma das células. Foi visualizado em microscopia de luz, que os recombinantes contendo *egfp* apresentaram pequenas vesículas fluorescentes, em 120 h p. i., enquanto os recombinantes contendo *lacZ* apresentaram grandes manchas de LacZ, o que indica que provavelmente EGFP está sendo processada e expelida das células, enquanto LacZ está se



acumulando no citoplasma. Além disso, oncoses e apoptose não são processos mutualmente exclusivos, pois oncoses envolve fragmentação não-internucleossomal do DNA, que por sua vez pode ativar vias apoptóticas (revisado por Fink & Cookson, 2005).

Os maiores níveis de densidade citoplasmática foram observados nos recombinantes contendo *lacZ*, em que também se relatou níveis intermediários de células em processo de morte celular. Nos recombinantes contendo *egfp* observou-se níveis semelhantes de morte celular, porém havia baixa densidade citoplasmática em relação aos recombinantes contendo *lacZ*. Provavelmente, houve um acúmulo maior de LacZ no citoplasma das células do que de EGFP devido às diferenças de promotores, no caso de vAgGalA2, ou mesmo das próprias características bioquímicas das moléculas. Ou talvez, o aumento de densidade citoplasmática seja uma consequência do processo de morte celular.

As outras alterações morfológicas vistas por MET, como desorganização e diminuição das microvilosidades, migração e degeneração de mitocôndrias, deformações e rupturas das invaginações basais e espaços citoplasmáticos também estão relacionadas com o avanço do processo de morte celular. As microvilosidades, invaginações basais e espaços citoplasmáticos são afetados pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática das células e consequente perda de integridade causada pelo desequilíbrio osmótico resultante da falha das bombas iônicas da membrana (Fink & Cookson, 2005). O aparecimento de vesículas contendo provável material lipídico, também deve estar relacionado com o estresse oxidativo nas células dos túbulos, pois lipofuscina é um lipídio presente nos túbulos de Malpighi e sua formação está relacionada com envelhecimento e acúmulo de espécimes reativos de oxigênio (ROS) (revisado por Billinton & Knight, 2001). As alterações da estrutura celular como um todo, principalmente em relação ao posicionamento das organelas e a manutenção da morfologia celular, estão provavelmente relacionadas com a desorganização do citoesqueleto, ocasionada pelas caspases do processo de apoptose (revisado por Majno & Joris, 1995) e/ou pelo acúmulo de ROS (Lum & Roebuck, 2001). As mitocôndrias, por sua vez, migram das microvilosidades devido às mudanças ocorridas na

membrana e sofrem degeneração por ação de proteínas da via apoptótica relacionadas com a permeabilidade das membranas mitocondriais, que formam um megacanal chamado de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Marzo *et al.*, 1998), resultando na liberação de citocromo c no citosol. Esse evento também pode ocorrer na oncose, mas nesse caso, o metabolismo celular já está danificado a ponto de não poder realizar a ativação das caspases (revisado por Fink & Cookson, 2005). As alterações semelhantes a essas, observadas por Reisner *et al.* (1989) em túbulos de Malpighi de larvas de *C. ethlius* inoculadas com d-endotoxina de *B. thuringiensis* também estão relacionadas com alterações dos gradientes iônicos, desequilíbrio osmótico e rompimento da membrana plasmática devido ao modo de ação dessas toxinas, que formam poros nas membranas dessas células (Knowles, 1994).

Comparando-se os resultados de  $LT_{50}$  de vAgGalA2 obtidos nesse trabalho com os de vAgEGT $\Delta$ -lacZ em relação ao baculovírus AgMNPV obtidos por Pinedo *et al.* (2003), têm-se uma maior diferença entre vAgGalA2 e AgMNPV, assim como observado nesse trabalho. Eles obtiveram uma diferença estatisticamente significativa de cerca de 20% entre vAgEGT $\Delta$ -lacZ e o baculovírus selvagem. Em nossa pesquisa, obtivemos resultados semelhantes para os vírus, sendo a diferença de aproximadamente 22% de redução da  $LT_{50}$ . Contudo, existe uma grande proximidade (~0,09 dias) entre os valores dos limites fiduciais de vAgEGT $\Delta$ -lacZ e vAgGalA2, que pode ser interpretada como uma sobreposição dos limites, considerando os erros matemáticos envolvidos nos cálculos e diferenças na administração oral dos poliedros, em que as larvas podem acabar regurgitando diferentes quantidades de vírus. Dessa forma, pode ser sugerido que o menor tempo médio de morte de vAgGalA2 em relação ao vAgEGT $\Delta$ -lacZ não é significativo, indicando a possibilidade de ter ocorrido ao acaso.

De acordo com os resultados do bioensaio, pode-se inferir que a proteína marcadora LacZ mostrou maior toxicidade em relação a proteína EGFP, resultando em um tempo médio de morte mais curto. Dentre os recombinantes contendo o gene *egfp*, a ausência de EGT não se mostrou significativa, uma vez que houve sobreposição dos limites fiduciais entre eles, mas para os

recombinantes contendo *lacZ* houve uma diferença estatisticamente significativa. Contudo, o fato de haver uma diferença significativa entre os recombinantes contendo *lacZ* e o AgMNPV, e de não haver para os recombinantes contendo *egfp*, indica que o que causa um aumento significativo na eficácia viral, em termos de mortalidade, é a deleção do gene *egt* e a presença da proteína marcadora LacZ. Muitos dos trabalhos que relacionaram maior eficiência viral devido à ausência do gene *egt*, utilizaram baculovírus recombinantes contendo *lacZ* e *egt* deletado (O'Reilly & Miller, 1991; Pinedo *et al.*, 2003), às vezes relacionando isso com a degeneração dos túbulos de Malpighi (Flipsen *et al.*, 1995a; Soares, 2005; Soares & Ribeiro, 2005).

Excetuando pelo fato de vAgGalA2 ter obtido um menor tempo médio de morte, os resultados do bioensaio estão de acordo com o que foi observado nas análises pelas microscopias. Ou seja, a redução no tempo médio de morte está relacionada com a intensidade das alterações morfológicas nos tempos observados. Dessa forma, comparando-se todos os baculovírus utilizados no trabalho, têm-se os recombinante contendo *lacZ* como os baculovírus mais eficientes contra *A. gemmatalis*, havendo uma semelhança entre eles, seguidos de vAgEGT $\Delta$ *egfp*, vAgp2100*egfp* e AgMNPV.

## CONCLUSÃO

Os túbulos de Malpighi são os principais constituintes do sistema excretor de insetos, os quais regulam a composição da hemolinfa através da retirada de resíduos nitrogenados. Eles também têm importância na desintoxicação e na resposta imune do inseto. Como não houve indícios de infecção nas células dos túbulos de Malpighi, acredita-se que a degeneração do tecido esteja ocorrendo devido a um aumento na taxa de morte celular. Isto está provavelmente relacionado à infecção do inseto como um todo, uma vez que altera seu comportamento e esgota sua saúde pela infecção de outros órgãos importantes, como por exemplo, o sistema traqueal, levando a uma redução no suprimento de oxigênio no tecido e a infecção dos hemócitos, que perturba o transporte de nutrientes. Isso, por sua vez, reduz drasticamente a energia disponível afetando órgãos de alta atividade metabólica como os túbulos de Malpighi, ativando oncofóscose em suas células. Essa degeneração do órgão pode estar relacionada também ao acúmulo das proteínas marcadoras EGFP e LacZ, que podem ser tóxicas quando em alta concentração nas células dos túbulos, o que é capaz de induzir apoptose e acelerar o processo de morte celular no tecido.

Assim, é razoável pensar que a ausência de EGT, que permite que o inseto realize muda, está fazendo com que ocorra um gasto energético ainda maior relacionado com a mudança de instar; e isso, por sua vez, aumenta ainda mais a degeneração dos túbulos de Malpighi, que mostraram ser bastante sensíveis à presença de patógenos e alterações no metabolismo do inseto. As análises mostraram que somente a deleção do gene *egt* não foi suficiente para causar uma diferença estatisticamente significativa no tempo de morte do hospedeiro, nas condições desse trabalho. A presença de proteínas marcadoras, em especial LacZ, provavelmente apresentando propriedades citotóxicas, unidas à ausência de EGT viral, provocaram redução significativa da  $LT_{50}$ .

Pesquisas futuras envolvendo a capacidade de indução de apoptose das proteínas marcadoras em células de inseto e a definição do tipo de morte celular ocorrida nas células dos túbulos durante a infecção por baculovírus, poderão ajudar a elucidar a questão da degeneração dos túbulos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, C. H.; RUSSEL, R. L.; FUNK, C. J.; EVANS, J. T.; HARWOOD, S. H. & ROHRMANN, G. F. 1997. **The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome.** *Virology*, 229, 381–399.
- ALLEN, G. E. & KNELL, J. D. 1977. **A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity.** *Florida Entomol.*, 60, 233-240.
- AOKI, H.; SAKODA, Y. JUKUROKI, K.; TAKADA, A.; KIDA, H. & FUKUSHO, A. 1999. **Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells.** *Vet. Microbiol.*, 68, 197-207.
- ARIDOR, M. & BALCH, W. E. 2000. **Regulating export of ER cargo.** *Science*, 287, 816-817.
- ARIF, B. M. 1986. **The structure of the viral genome.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 131, 21-29.
- AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M. & POSSE, R. D. 1994. **The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** *Virology*, 202, 586–605.
- BARRET, J. W.; BROWNRIGHT, A. J.; PRIMAVERA, M. J.; RETNAKARAN, A. & PALLI, S. R. 1998. **Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus.** *Tissue Cell*, 30, 602-616.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. **Biochemistry.** 5<sup>th</sup> ed., New York: W.H. Freeman & Company, 2002.
- BILLINTON, N. & KNIGHT, A. W. 2001. **Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence.** *Analyt. Biochem.*, 291, 175-197.

- BOYCE, F. M. & BUCHER, N. L. 1996. **Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2348-2352.
- BRAND, K.; POBLING, A.; PAUL, D. & STRAUSS, M. 1999. **Induction of apoptosis and G<sub>2</sub>/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection.** *Gen. Ther.*, 6, 1054-1063.
- CATANIA, F.; KAUER, M. O.; DABORN, P. J.; YEN, J. L.; FRENCH-CONSTANT, R. H. & SCHOLOTTERER, C. 2004. **World-wide survey of an accord insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*.** *Mol. Ecol.*, 13, 2491-2504.
- CHALFIE, M.; YU, T.; GUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. & PARSHER, D. C. 1994. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science*, 263, 802-805.
- CHAPMAN, R. F. (Ed.). **The insects: Structure and Function.** 4<sup>th</sup> ed., London: Cambridge University Press, 1998, 788p.
- CHARLTON, C. A. & VOLKMAN, L. E. 1991. **Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells.** *J. Virol.*, 65, 1219-1227.
- CLEM, R. J. & MILLER, L. K. 1994. **Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*.** *Mol. Cell Biol.*, 14, 5212-5222.
- CORY, J. S. & MYERS, J. H. 2003. **The ecology and evolution of insect baculoviruses.** *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34, 239-272.
- CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A. & TSIEN, R. Y. 1995. **Understanding, improving and using green fluorescent proteins.** *Trends Biochem. Sci.*, 20, 448-455.
- DABORN, P. J.; YEN, J. L.; BOGWITZ, M. R.; LE GOFF, G.; FEIL, E.; JEFFERS, S.; TIJET, N.; PERRY, T.; HECKEL, D.; BATTERHAM, P.; FEYEREISEN, R.; WILSON, T. G. &

- FFRENCH-CONSTANT, R. H. 2002. **A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*.** *Science*, 297, 2253-2256.
- ENAYATI, A. A.; RANSON, H. & HEMINGWAY, J. 2005. **Insect glutathione transferases and insecticide resistance.** *Insect Mol. Biol.*, 14, 3-8.
- ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. 1994. **The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3224–3227.
- ENGELHARD, E. K. & VOLKMAN, L. E. 1995. **Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus.** *Virology*, 209, 384-389.
- EVANS, O. P. & O'REILLY, D. R. 1998. **Purification and kinetic analysis of baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase.** *Biochem. J.*, 330, 1265–1270.
- FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (ed). **The Baculoviruses.** New York, Plenum Press, 1997, p. 33-59.
- FESCEMEYER, H. W.; MASLER, E. P.; KELLY, T. J. & LUSBY, W. R. 1995. **Influence of development and prothoracicotropic hormone on the ecdysteroids produced *in vitro* by the prothoracic glands of female gypsy moth (*Lymantria dispar*) pupae and pharate adults.** *J. Insect Physiol.*, 41, 489-500.
- FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2005. **Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells.** *Am. Soc. Microbiol.*, 73, 1907-1916.
- FINNEY, D. J. (Ed.). **Probit Analysis.** Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- FLIPSEN, J. T. M.; MAN, R. M. W.; KLEEFSMAN, A. W. F.; KNEBEL-MORS DORF, K. & VLAK, J. M. 1995a. **Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects.** *J. Virol.*, 69, 4529-4532.

- FLIPSEN, J. T. M.; MARTENS, J. W. M.; VAN OERS, M. M. & VAN LENT, J. W. M. 1995b. **Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae.** *Virology*, 208, 328–335.
- FRIESEN, P. D. Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. In: MILLER, L. K. (ed). **The Baculoviruses.** New York, Plenum Press, 1997, p. 141-170.
- FUNK, C. J.; BRAUNAGEL S. C. & ROHRMANN, G. F. Baculovirus Structure. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses.** New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32.
- GOMI, S.; MAJIMA, K. & MAEDA, S. 1999. **Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.** *J. Gen. Virol.*, 80, 1323–1337.
- GRANADOS, R. R. & LAWLER, K. A. 1981. ***In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection.** *Virology*, 108, 297–308.
- HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. 2004. **P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae.** *J. Virol.*, 78, 6786-6791.
- HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MEIRELLES, M. N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M. J.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T. & SOUZA, W. (Ed). **Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 179p.
- HAGENBUCH, B. & MEYER, P. J. 2003. **The superfamily of organic anion transporting polypeptides.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1609, 1-18.
- 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.**



Brasília: UNB, 2005, 77p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

HARRAP, K. A. 1970. **Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus.** *Virology*, 42, 311–318.

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

IGA, M.; IWAMI, M. & SAKURAI, S. 2007. **Nongenomic action of an insect steroid hormone in steroid-induced programmed cell death.** *Mol. Cell Endocrinol.*, 263, 18-28.

IJKEL, W. F. J.; VAN STRIEN, E. A.; HELDENS, J. G. M.; BROER, R.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W. & VLAK, J. M. 1999. **Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome.** *J. Gen. Virol.*, 80, 3289–3304.

JARVIS, D. L. Baculovirus expression vectors. In: Miller, L. K. (ed.). **The Baculoviruses.** Plenum Press, New York, 1997, p. 389-431.

JONHSON, D. W. & MARUNIAK, J. E. 1989. **Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA.** *J. Gen. Virol.*, 70, 1877-1883.

KARIM, F. D. & THUMMEL, C. S. 1992. **Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone.** *EMBO J.*, 11, 4083–4093.

KAWASAKI, Y.; MATSUMOTO, S. & NAGAMINE, T. 2004. **Analysis of baculovirus IE1 in living cells: dynamics and spatial relationships to viral structural proteins.** *J. Gen. Virol.*, 85, 3575-3583.

KEDDIE, B. A.; APONTE, G. W. & VOLKMAN, L. E. 1989. **The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host,** *Science*, 243, 1729.

KENOUTIS, C.; EFROUSE, R. C.; SWEVERS, L.; LAVDAS, A. A.; GAITANOU, M.; MATSAS, R. & IATROU, K. 2006. **Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does**

**not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression.** *J. Virol.*, 80, 4135-4146.

KNOWLES, B. H. 1994. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins.** *Adv. Insect Physiol.*, 24, 275-308.

KOOLMAN, J. 1995. **Control of ecdysone biosynthesis in insects.** *Netherl. J. Zool.*, 45, 83-88.

KOST, T. A. & CONDREAY, J. P. 1999. **Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 428-433.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. & JARVIS, D. L. 2005. **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells.** *Nature Biotech.*, 23, 567-575.

KUZIO, J.; PEARSON, M. N.; HARWOOD, S. H.; FUNK, C. J.; EVANS, J. T.; SLAVICEK, J. M. & ROHRMANN, G. F. 1999. **Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*.** *Virology*, 253, 17-34.

LEE, J. H.; JOHNSON, S. J. & WRIGHT, V. L. 1990. **Quantitative survivorship analysis of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) pupae in soybean fields in Louisiana.** *Env. Entomol.*, 19, 978-986

LINDOW, S. E. 1995. **The use of reporter genes in the study of microbial ecology.** *Mol. Ecol.*, 4, 555-556.

LIU, H.; JAN, M.; CHOU, C.; CHEN, P. & KE, N. 1999. **Is green fluorescent protein toxic to the living cells?** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 260, 712-717.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L. S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. & DARNELL, J. (Eds.) **Molecular Cell Biology.** 4<sup>th</sup> ed., New York: W.H. Freeman & Company, 2000.

LU, A. & MILLER, L. K. 1997. Regulation of baculoviruses late and very late expression. In: Miller, L. K. (ed.). **The baculoviruses.** New York; Plenum Press, 1997, p. 193-216.

- LUM, H. & ROEBUCK, K. A. 2001. **Oxidant stress and endothelial cell dysfunction.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280, C719-C741.
- MACHIN, J. & O'DONNELL, M. J. 1991. **Rectal complex ion activities and electrochemical gradients in larvae of the desert beetle, *Onymacris*: comparisons with *Tenebrio*.** *J. Insect Physiol.*, 37, 829-838.
- MADDRELL, S. H. P. 1978. Transport across insect excretory epithelia. In: GIEBISCH, G.; TOSTESON, D. C.; USSING, H. H. (Eds.). **Membrane Transport in Biology**, vol. III, Springer-Verlag, Heidelberg, 1978, p. 239-271.
- MADDRELL, S. H. P. & GARDINER, B. O. C. 1976. **Excretion of alkaloids by Malpighian tubules of insects.** *J. Exp. Biol.*, 64, 267-281.
- MADDRELL, S. H. P. & O'DONNELL, M. J. 1992. **Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport.** *J. Exp. Biol.*, 172, 417-429.
- MAJNO, G. & JORIS, I. 1995. **Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death.** *Am. J. Pathol.*, 146, 3-15.
- MARTINS, E. S. **Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga.** Brasília: UNB, 2005. 126p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- MARTOJA, R. & BALLAN-DUFRANÇAS, C. Digestive and excretory organs ultrastructure. In: KING, R. C. & AKAI, H. (Eds.) **Insect ultrastructure**, vol. II., New York: Plenum Press, 1984, p. 119-268.
- MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (Eds.) **The biology of baculovirus**, vol. I. CRC Press, Florida, 1986, p. 129-146.

- MARZO, I.; BRENNER, C. & KROEMER, G. 1998. **The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria and purified protein complexes.** *Biomed. Pharmacother.*, 52, 248-251.
- MCGETTIGAN, J.; MCLENNAN, R. K.; BRODERICK, K. E.; KEAN, L.; ALLAN, A. K.; CABRERO, P.; REGULSKI, M. R.; POLLOCK, V. P.; GOULD, G. W.; DAVIES, S. A.; DOW, J. A. 2005. **Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection.** *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 741-754.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta-da-soja. In: Alves, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos.** Manole, São Paulo, 1986, p. 188-202.
- MOSCARDI, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 257-289.
- MURGES, D.; KREMER, A. & KNEBEL-MÖRSDORF, D. 1997. **Baculovirus transactivator IE-1 is functional in mammalian cells.** *J. Gen. Virol.*, 78, 1507-1510.
- NAPPI, A. J.; VASS, E.; FREY, F. & CARTON, Y. 2000. **Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity.** *Nitric oxide*, 4, 423-430.
- O'DONNELL, M. J.; MADDRELL, S. H. P. & GARDINER, B. O. C. 1983. **Transport of uric acid by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* and other insects.** *J. Exp. Biol.*, 103, 169-184.
- O'DONNELL, M. J. & MADDRELL, S. H. P. 1995. **Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*.** *J. Exp. Biol.*, 198, 1647-1653.
- OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E. & ZANOTTO, P. M. A. 2006. **Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus.** *J. Gen. Virol.*, 87, 3233-3250.

- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K., 1989. **A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase.** *Science*, 245, 1110–1112.
- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K., 1990. **Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene.** *J. Virol.*, 64, 1321–1328.
- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K., 1991. **Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene.** *Bio/Technology*, 9, 1086–1089.
- 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.; KELLY, T. J.; MASLER, E. P.; THYAGARAJA, B. S.; ROBSON, R. M.; SHAW, T. C. & MILLER, L. K. 1995. **Overexpression of *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors.** *Biochem. Mol. Biol.*, 25, 475-485.
- O'REILLY, D. R.; HAILS, R. S. & KELLY, T. J. 1998. **The impact of host developmental status on baculovirus replication.** *J. Invert. Pathol.*, 72, 269-275.
- PAYNE, C. C. 1986. **Insect pathogenic viruses as pest control agents,** *Forstsch. Zool.*, 32, 183–200.
- PILLOFF, M. G.; BILEN, M. F.; BELAICH, M. N; LOZANO, M. E. & GHIRINGHELLI, P. D. 2003. **Molecular cloning and sequence analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus GP64 glycoprotein.** *Virus Genes*, 26, 57-69.
- PINEDO, F. J. R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J. A. & RIBEIRO, B. M. 2003. **Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host.** *Biol. Control*, 27, 336–344.
- PLAUTZ, J. D.; DAY, R. N.; DAILEY, G. M.; WELSH, S. B.; HALL, J. C.; HALPAIN, S. & KAY, S. A. 1996. **Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for**

- gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells.** *Gene*, 173, 83-87.
- PRASHER, D. C.; ECKENRODE, V. K.; WARD, W. W.; PRENDERGAST, F. G. & CORMIER, M. J. 1992. **Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.** *Gene*, 111, 229-233.
- RAFAELI-BERNSTEIN, A. & MORDUE, W. 1978. **The transport of the cardiac glycoside ouabain by the Malpighian tubules of *Zonocerus variegatus*.** *Physiol. Ent.*, 3, 59-63.
- RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B.; VARGAS, J. H.; WOLFF, J. L. & RIBEIRO, B. M. 2002. **Characterization of the p10 gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus.** *Virus Genes*, 23, 243 - 247.
- REISNER, W. M.; FEIR, D. J.; LAVRIK, P. B. & RYERSE, J. S. 1989. **Effect of *Bacillus thuringiensis kurstaki* d-endotoxin on insect Malpighian tubule structure and function.** *J. Invert. Pathol.*, 54, 175-190.
- RIBEIRO, B. M., SOUZA, M. L. & KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 481-507
- RIBEIRO, B. M.; GATTI, C. D.; COSTA, M. H.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; POSSEE, R. D. & ZANOTTO, P. M. 2001. **Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harboring the betagalactosidase gene.** *Arch. Virol.*, 146, 1355–1367.
- RODRIGUES, J. C. M.; DE SOUZA, M. L.; O'REILLY, D. R.; VELLOSO, L. M.; PINEDO, F. J. R.; RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B. & RIBEIRO, B. M. 2001. **Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus.** *Virus Genes*, 22, 103–112.

- RUZIN, S. E. & SYLVESTER, A. W. Light microscopy. II. Observation, photomicrography and image analysis. In: FREELING, M. & WALBOT, V. (Eds). **The maize handbook**. New York: Springer, 1994, p. 95-107.
- SHIMOMURA, O. 1979. **Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein**. *FEBS Letters*, 104, 220-222.
- SOARES, J. S. **Análise da patologia da infecção em larvas de *Anticarsia gemmatalis* com o uso de baculovírus AgMNPV recombinantes**. Brasília: UNB, 2005. 115 p. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- SOARES, J. S. & RIBEIRO, B. M. 2005. **Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses**. *Res Microbiol.*, 156, 263-269.
- STOLZ, D. B.; PAVAN, C. & DA CUNHA, A. B. 1973. **Nuclear polyhedrosis vírus: A possible example of *de novo* intranuclear membrane morphogenesis**. *J. Gen. Virol.*, 19, 145-150.
- SUMMERS, M. D. 1971. **Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni***. *J. Ultrastruc. Res.*, 35, 606-625.
- TANI, H.; LIMN, C. K.; YAP, C. C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K. & MATSUURA, Y. 2003. **In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses**. *J. Virol.*, 77, 9799-9808.
- TORRIE, L. S.; RADFORD, J. C.; SOUTHALL, T. D.; KEAN, L.; DINSMORE, A. J.; DAVIS, S. A. & DOW, J. A. T. 2004. **Resolution of the insect ouabain paradox**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 13689-13693.
- VAN CRUCHTEN, S. & VAN DEN BROECK, W. 2002. **Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis**. *Anat. Histol. Embryol.*, 31, 214-223.

- VAUGHN, J. L. & DOUGHERTY, E. M. The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. **Viral insecticides for Biological Control**. Long Island: Academic Press, p. 569-633, 1985.
- VOLKMAN, L. E. 1986. **The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus**. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 131, 103-118.
- VOLKMAN, L. E. & KEDDIE, B. A. 1990. **Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis**. *Seminars in Virology 1*, p. 249-256.
- VOLKMAN, L. E.; SUMMERS, M. D. & HSIEH, C. H. 1976. **Occluded and non-occluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: Comparative neutralization, comparative infectivity, and *in vitro* growth studies**. *J. Virol.*, 19, 292-302.
- VOLKMAN, L. E.; GOLDSMITH, P. A.; HESS, R. T. & FAULKNER, P. 1984. **Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen**. *Virology*, 133, 354-362.
- VOLKMAN, L. E.; BLISSARD, G. W.; FRIESEN, P.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R. & THEILMANN, D. A. Family Baculoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A. & SUMMERS, M. D. (Eds.), **Virus Taxonomy: sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Springer-Verlag, Vienna and New York. 1995. p. 104-113.
- WANG, J.; KEAN, L.; YANG, J.; ALLAN, A. K.; DAVIES, S. A.; HERZYK, P. & DOW, J. A. T. 2004. **Function-informed transcriptome analysis of *Drosophila* renal tubule**. *Gen. Biol.*, 5, R69.
- WASHBURN, J. O.; WONG, J. F. & VOLKMAN, L. E. 2001. **Comparative pathogenesis of *Helicoverpa zea* S nucleopolyhedrovirus in noctuid larvae**. *J. Gen. Virol.*, 82, 1777-1784.
- WASHBURN, J. O.; TRUDEAU, D.; WONG, J. F. & VOLKMAN, L. E. 2003. **Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa***



- zea single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: A comparison of the ‘M’ and ‘S’ strategies for establishing fatal infection.** *J. Gen. Virol.*, 84, 343-351.
- WATERS, D. J. & BARFIELD, C. S. 1989. **Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species.** *Env. Entomol.*, 18, 1006-1010.
- WELSH, S. & KAY, S. A. 1997. **Reporter gene expression for monitoring gene transfer.** *Curr. Bio.Biotechnol.*, 8, 617-622.
- WIGGLESWORTH, V. B. (ed.) **The principles of insect physiology.** 7<sup>th</sup> ed. London: Chapman and Hall, 1972.
- WILKERSON, G. G.; MISHOE, J. W. & STIMAC, J. L. 1986. **Modeling velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) populations in soybeans.** *Environ. Entomol.*, 15, 809-816.
- WILLIAMS, G. V. & FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses.** New York, Plenum Press, 1997, p. 61-107.
- WILLIAMS, G. V.; ROHEL, D. Z.; KUZIO, J. & FAULKNER, P. A. 1989. **A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants.** *J. Gen. Virol.*, 70, 187-202.
- ZANOTTO, P. M. A., KESSING, B. D. & MARUNIAK, J. E. 1993. **Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations.** *J. Invert. Pathol.*, 62, 147-164.
- ZHENG, C.; GOLDSMITH, C. M.; O’CONNELL, B. C. & BAUM, B. J. 2000. **Adenoviral vector cytotoxicity depends in part of the transgene encoded.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274, 767-771.
- ZITNAN, D.; KINGAN, T. G.; HERMESMAN, J. L. & ADAMS, M. E. 1996. **Identification of ecdysis-triggering hormone from an epitracheal endocrine system.** *Science*, 271, 88-91.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.