



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

**Prospecção de genes *pif* (*per os infectivity factor*)
em variantes genotípicos de *Anticarsia
gemmaealis* MNPV e construção de recombinante
com interrupção do gene *pif-1***

Briana Cardoso Ferreira

Brasília - DF
2008



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

**Prospecção de genes *pif* (*per os infectivity factor*)
em variantes genotípicos de *Anticarsia
gemmatalis* MNPV e construção de recombinante
com interrupção do gene *pif-1***

Briana Cardoso Ferreira

Orientadora: Dra. Ildinete Silva Pereira
Co-Orientadora: Dra. Marlinda Lobo de Souza

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

Brasília – DF
2008

Trabalho realizado no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Ildinete Silva Pereira e co-orientação da Dra. Marlinda Lobo de Souza, com suporte financeiro do CNPq.

Brasília – DF, 28 de Julho de 2008

Banca Examinadora:

- Dra. Marlinda Lobo de Souza (Co-Orientadora) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
- Dr. Renato de Oliveira Resende – Universidade de Brasília
- Dra. Eni Braga da Silveira – Associação das Pioneiras Sociais - Rede Sarah de Hospitais da Reabilitação.
- Suplente: Dr. Peter Ward Inglis – Consultor da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

*Ao meu avô, Ferreirão que
para mim é um verdadeiro
mestre. Com todo meu
carinho!*

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade de realização do curso.

A Deus por ter sido todo esse tempo minha fortaleza e meu refúgio, por me proteger e me guiar todos os dias da minha vida e por permitir que eu atingisse mais essa meta.

À minha mãe por sempre ter me apoiado e me incentivado em todas as minhas decisões em relação à minha formação, por seu carinho, amor e dedicação proporcionados todos esses anos.

Ao meu pai por ter sempre me proporcionado recursos para minha formação profissional e por todo seu carinho e atenção.

Ao Fábio, meu namorado, que durante os anos desse mestrado me apoiou, me ajudou de todas as maneiras possíveis, me incentivou sempre com seu carinho, sua garra, sua paciência e sua vontade de me ver crescer profissionalmente. Agradeço por todas as vezes que achei que não fosse conseguir e você esteve ao meu lado me dando força. Obrigada por tudo o que você foi e é na minha vida!

À minha família em geral que eu amo, em especial à Wanda, que sempre mostrou preocupação em relação a minha dissertação e em saber como ia o andamento do trabalho.

À Dra. Marlinda que me acompanha desde a graduação e sempre acreditou em meu potencial. Agradeço a confiança que sempre depositou em mim, pelo incentivo que sempre me deu e por acreditar na minha capacidade em realizar esse trabalho.

À professora Ildinete por ter me aceitado como sua aluna me dando a oportunidade de realizar esse mestrado.

À Dra. Elita por ter me ajudado sempre, me apoiado e por acreditar que sou capaz de vencer barreiras e obstáculos. Obrigada pelas correções da dissertação e por inúmeras vezes me ajudar no dia-a-dia do laboratório.

Aos técnicos do laboratório, Zildinha por seu carinho todos os dias e por me conceder inúmeras garrafinhas com células; ao William pela ajuda com as fotos e experimentos; e à Raimundinha por seu carinho comigo e por muitas vezes ter me ajudado dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos de laboratório: Juliana, Saluana, Lorena, Geraldo e João Paulo pela colaboração, risos nos momentos de descontração e ajuda que me deram. Obrigada principalmente à minha amiga Ju pela ajuda com o recombinante e as fotos, e ao João Paulo pelos inúmeros géis.

À minha amiga Syomara que me acompanha durante todos esses anos no laboratório. Obrigada pelas palavras de incentivo em situações difíceis que passei, pelos momentos de descontração e pela ajuda no laboratório.

Ao Dr. Pinedo por ter me ajudado muitas vezes, principalmente na obtenção do vírus recombinante.

Ao professor Bergmann pelas relevantes sugestões e pela concessão de seu laboratório para uso da ultracentrífuga.

À Dra. Rose Monnerat e aos colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, Érica e Vinícius, por me ajudarem tanto e terem sempre paciência e boa vontade comigo.

Às minhas mais novas amigas, Anabele e Gláucia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (UnB), por me ajudarem, me incentivarem e mostrarem tanta dedicação comigo. Agradeço de coração por toda a ajuda de vocês!

Às minhas amigas Neiva e Larissa que neste período me ajudaram a manter a mente saudável para enfrentar o cotidiano da bancada e pelo apoio incondicional que me dedicaram.

E a todos que de um modo geral me apoiaram e me ajudaram a seguir em frente, vencer e realizar essa etapa tão importante da minha vida.

Muito obrigada!!!

Índice

Agradecimentos.....	6
Índice.....	9
Índice de ilustrações.....	11
Abreviaturas e símbolos.....	14
Resumo.....	17
Abstract.....	19
1. Introdução.....	21
1.1. Características e Classificação Taxonômica dos Baculovirus.....	21
1.1.1. Fenótipos Virais	25
1.2. Processo de Infecção e Disseminação Viral.....	28
1.3. Expressão Gênica em Baculovirus.....	31
1.4. Genes pif (per os infectivity factor).....	35
1.4.1. Estrutura dos Genes pif (per os infectivity factor) e Proteínas PIF.....	35
1.4.2. Efeitos da Deleção de Genes pif.....	37
1.5. Variantes Genótipicos em Populações de Baculovirus.....	39
1.6. Aplicações Tecnológicas dos Baculovirus.....	41
1.7. Uso de Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) como inseticida biológico	45
2. Objetivos.....	48
2.1. Objetivos Específicos.....	49
3. Materiais e Métodos.....	50
3.1. Vírus.....	50
3.2. Insetos.....	50
3.3. Linhagens Celulares de Insetos.....	51
3.4. Multiplicação do Vírus Selvagem AgMNPV-79 in vivo.....	51
3.5. Coleta de Hemolinfa de Lagartas Infectadas.....	51
3.6. Purificação de Clones de AgMNPV-79 por Diluição Serial.....	52
3.7. Multiplicação de Clones Virais in vitro.....	53
3.8. Infecção de Lagartas por BV - Injeção Intrahemocélica.....	53

3.9. Purificação Parcial de Partículas Virais.....	54
3.10. Extração de DNA de Vírus Não Ocluídos (BV).....	54
3.11. PCR dos Genes pif-1 e pif-2 a partir de DNA Viral.....	55
3.12. Eletroforese em Gel de Agarose.....	56
3.13. Ensaio de Virulência com Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	56
3.14. Análise de Restrição dos Clones Virais.....	57
3.15. Identificação da ORF do gene pif-3 de AgMNPV.....	58
3.16. Construção do Baculovirus Recombinante com Deleção do Gene pif-1.....	59
3.16.1. Bactérias.....	59
3.16.2. Plasmídeos.....	59
3.16.3. PCR da região a montante ao gene pif-1.....	60
3.16.4. Clonagem do fragmento da região a montante (upstream) ao gene pif-1.....	62
3.16.5. Defosforilação do plasmídeo pGEMUp.....	63
3.16.6. Liberação e clonagem do gene repórter gfp (green fluorescent protein) no plasmídeo pGEMUp.....	64
3.16.7. PCR da região a jusante ao gene pif-1.....	64
3.16.8. Clonagem do fragmento da região a jusante (downstream) ao gene pif-1.....	66
3.16.9. Clonagem do fragmento a jusante (dw) no plasmídeo pGEMUpGFP.....	67
3.16.10. Co-transfecção de células de inseto: produção de AgMNPV recombinante.....	68
3.16.11. Seleção e purificação do vírus recombinante.....	68
4. Resultados.....	69
4.1. Seleção de genótipos virais de AgMNPV.....	69
4.2. Verificação da heterogeneidade entre os genótipos da população de AgMNPV.....	72
4.4. Detecção dos genes pif-1 e pif-2 em genótipos de AgMNPV.....	74
4.5. Avaliação da virulência dos genótipos de AgMNPV em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	76
4.5.1. Concentração letal média (CL50).....	76
4.5.2. Tempo Letal Médio (TL50).....	78
4.5.3. Tempo Médio de Morte (TM).....	80
4.7. Identificação da ORF do gene pif-3 de AgMNPV.....	82
4.6. Construção do baculovirus recombinante vAgGFPΔpif-1.....	84

4.6.1. Construção de plasmídeos contendo as regiões homólogas ao gene pif-1.....	84
4.6.2. Transfecção e co-transfecção do plasmídeo pGEMUpGFPDw em células de inseto – Ensaio de interrupção do gene pif-1 por recombinação homóloga.....	93
4.6.3. Purificação do vírus recombinante vAgGFP Δ pif-1.....	95
5. Discussão.....	96
6. Conclusões e Perspectivas.....	102
7. Referências Bibliográficas.....	104

Índice de ilustrações

Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão de partículas virais.....	24
Figura 2: Ilustração dos fenótipos virais ODV e BV formados durante o ciclo de infecção dos baculovirus.....	26
Figura 3: Ilustração do processo de infecção viral no intestino médio de uma larva infectada por baculovirus.....	30
Figura 4: Larvas infectadas com o baculovirus <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>	31

Figura 5: Ilustração do processo temporal de formação das partículas virais.....	34
Figura 6: Ilustração do processo de interrupção de um gene de interesse através do processo de recombinação homóloga.....	44
Figura 7: Inseto-praga desfolhador da soja, <i>Anticarsia gemmatalis</i>	46
Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>pif-1</i> e <i>pif-2</i> , e a localização desses e dos respectivos genes no genoma do baculovirus AgMNPV-2D.....	55
Tabela 2: Programas de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA dos genes <i>pif</i> de AgMNPV.....	56
Tabela 3: Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>pif-3</i> e a localização desse no genoma do baculovirus AgMNPV-2D.....	58
Tabela 4: Programas de PCR para a amplificação do fragmento de DNA do gene <i>pif-3</i> de AgMNPV.....	58
Tabela 5: Relação dos plasmídeos construídos e utilizados para o ensaio de deleção do gene <i>pif-1</i>	59
Figura 8: Seqüência da região a montante ao gene <i>pif-1</i> . Ilustração da localização dos <i>primers</i> e dos sítios de restrição inseridos e presentes na seqüência.....	60
Tabela 6: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região a montante ao gene <i>pif-1</i> e a localização no genoma do baculovirus AgMNPV-2D.....	61
Figura 9: Esquema de amplificação por PCR da região a montante ao gene <i>pif-1</i>	61
Tabela 7: Programa de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA da região a montante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV.....	62
Figura 10: Seqüência da região a jusante ao gene <i>pif-1</i> . Ilustração da localização dos <i>primers</i> e dos sítios de restrição inseridos e presentes na seqüência.....	65
Tabela 8: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região a jusante ao gene <i>pif-1</i> e a localização no genoma do baculovirus AgMNPV-2D.....	65
Figura 11: Esquema de amplificação por PCR da região a jusante ao gene <i>pif-1</i>	66
Tabela 9: Programa de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA da região a jusante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV.....	66
Figura 12: Células Tn5B1-4 infectadas com 18 clones virais derivados do isolado selvagem AgMNPV-79, 48h p.i.....	70 e 71
Figura 13: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima <i>Pst</i> I.....	72
Figura 14: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima <i>Hind</i> III.....	73

Figura 15: Amplificação do gene <i>pif-1</i> pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79.....	75
Figura 16: Identificação do gene <i>pif-2</i> pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79.....	75
Tabela 10: Concentração letal média (CL ₅₀) dos clones virais (grupo A) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	77
Tabela 11: Concentração letal média (CL ₅₀) dos clones virais (grupo B) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	77
Tabela 12: Tempo letal médio (TL ₅₀) dos clones virais (Grupo A) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	79
Tabela 13: Tempo letal médio (TL ₅₀) dos clones virais (Grupo B) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	79
Tabela 14: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo A) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	80
Tabela 15: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo B) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (método de Probit).....	81
Figura 17: Alinhamento da seqüência protéica da ORF 114 de AgMNPV com seqüências de PIF-3 já conhecidas.....	82
Figura 18: Regiões de similaridade e identidade da ORF 114 de AgMNPV e a ORF 115 (<i>pif-3</i>) de AcMNPV.....	83
Figura 19: Identificação do gene <i>pif-3</i> pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79.....	84
Figura 20: Amplificação por PCR da região a montante ao gene <i>pif-1</i>	85
Figura 21: Esquema da clonagem do fragmento <i>up</i> no vetor pGEM-T-Easy.....	86
Figura 22: Confirmação da orientação e inserção do fragmento <i>up</i> clonado no vetor pGEM-T-Easy.....	87
Figura 23: Esquema da construção do plasmídeo pGEMUpGFP.....	88
Figura 24: Confirmação da clonagem do cassete gênico <i>hsp70/gfp</i> no plasmídeo pGEMUp.....	89
Figura 25: Amplificação por PCR da região a montante ao gene <i>pif-1</i>	90
Figura 26: Esquema da clonagem do fragmento <i>dw</i> no vetor pGEM-T-Easy.....	90
Figura 27: Confirmação da clonagem do fragmento <i>dw</i> clonado no vetor pGEM-T-Easy.....	91
Figura 28: Esquema da construção do plasmídeo pGEMUpGFPDw.....	92

Figura 29: Confirmação da construção do plasmídeo pGEMUpGFPDw.....	93
Figura 30: Células Tn5B1-4 transfectadas com o plasmídeo pGEMUpGFPDw.....	94
Figura 31: Células Tn5B1-4 co-transfectadas com o plasmídeo pGEMUpGFPDw e DNA do clone viral AgMNPV-2D.....	94
Figura 32: Células Tn5B1-4 infectadas com o vírus recombinante vAgGFPΔpif-1 e com o vírus AgMNPV-2D.....	95

Abreviaturas e símbolos

AcMNPV - *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

AgMNPV – *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*

Amp⁺ - Adição de ampicilina

B.O.D – Demanda bioquímica de oxigênio

BSA – Albumina sérica bovina

BV - *Budded Virus*

CfDefNPV - *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus*

CfMNPV - *Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus*

CIP - Alkaline Phosphatase

CL₅₀ - Concentração letal média

CpGV - *Cydia pomonella granulovirus*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

dpi – Dias pós-infecção

dw – Fragmento *downstream*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

g - Grama

GFP – *Green Fluorescent Protein*

GV - *Granulovirus*

GV - *Granulovirus*

h – Hora(s)

h p.i. – Horas pós-infecção

h p.t. – Horas pós-transfecção

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kb – Kilobase = 1000 pares de base

kDa - Kilodalton

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

M - Molar

min. – Minuto(s)

mM - Milimolar

MNPV – *Multiple nucleopolyhedrovirus*

NPV - *Nucleopolyhedrovirus*

nt. - Nucleotídeos

OB - *Occlusion Body*

°C – Graus Celsius

ODV – Vírus derivados do poliedro ou vírus oclusos (*Occluded Derived Virus*)

ORF – Fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

pb – Pares de base

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial de hidrogênio

PIB - *Polyhedral Inclusion Body*

pif – *per os infectivity factor*

RNA – Ácido ribonucléico

RNase - Ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

s – Segundo(s)

SeMNPV - *Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus*

SNPV – *Single nucleopolyhedrovirus*

SpliNPV - *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*

Taq polimerase – Polimerase de *Thermus aquaticus*

TE – Tampão Tris-EDTA

TL₅₀ - Tempo letal médio

TM - Tempo médio de morte

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

U – Unidade enzimática

up – Fragmento *upstream*

UV - Ultravioleta

vAgGFP Δ pif-1 – Vírus recombinante AgMNPV com inserção do gene *gfp* no locus do gene *pif-1*

x-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μ l – Microlitro = 10^{-6} litro

η g – Nano grama = 10^{-9} gramas

~ - Aproximadamente

Resumo

Os baculovirus são vírus patogênicos a insetos, principalmente aos da ordem Lepidoptera. É comum o aparecimento de mutantes defectivos em populações de campo, com ausência de genes essenciais, que são mantidos pela co-infecção de células por diferentes genótipos virais. Esses genótipos quando purificados podem perder a capacidade de infectar a larva hospedeira, devido a deleções em genes *pif* (*per os infectivity factor*), essenciais para a infecção por via oral. Sabe-se que as proteínas PIF estão associadas ao envelope da partícula ODV, necessária para o estabelecimento da infecção primária no inseto. O genoma do *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi recentemente seqüenciado sendo então relatada a

presença dos genes *pif-1* e *pif-2* no vírus. Neste trabalho, genótipos de AgMNPV derivados do isolado de campo AgMNPV-79 foram selecionados e, através de análise de perfil de restrição do DNA viral, foi confirmada a existência de variantes genotípicos na população. Para a investigação da possível presença de mutantes defectivos, ampliações das regiões de *pif-1* e *pif-2* por PCR foram realizadas em cada variante sendo que todos os clones da população apresentaram ampliações dos dois genes. Todos os clones mostraram-se altamente infecciosos por ingestão oral, porém o genótipo Ag79-01 apresentou maior virulência entre eles. A presença de um terceiro gene *pif* (*pif-3*) foi identificada recentemente no genoma do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Da mesma forma, esse gene é também essencial para o estabelecimento da infecção primária por via oral. Por análise de BLAST o gene foi então identificado como a ORF 114 do genoma do vírus AgMNPV, a qual apresentou uma identidade de aminoácidos de 67% com a ORF do vírus AcMNPV. Com base nessa informação, *primers* para o gene *pif-3* foram desenhados e amostras de DNA dos diferentes genótipos virais foram submetidas a ampliações por PCR. Novamente todos os clones virais apresentaram amplificação de um fragmento correspondente à região de *pif-3*. Uma vez que os genes *pif* estavam presentes em todos os variantes genotípicos analisados, foi elaborada uma estratégia para a construção de um vírus recombinante com deleção do gene *pif-1*, visando o estudo de seu papel na infecção oral do inseto. O vírus recombinante vAgGFP Δ pif-1, obtido por recombinação homóloga, teve o gene *pif-1* substituído por um cassete gênico contendo um gene repórter (*gfp*) sob comando do promotor constitutivo *hsp70*. Esse vírus foi selecionado a partir da visualização de células infectadas emitindo fluorescência, devido à expressão da proteína GFP. O vírus vAgGFP Δ pif-1 encontra-se sob processo de purificação.

Abstract

Baculovirus are pathogenic viruses to insects, mainly to the ones belonging to the Lepidoptera order. The appearance of defective mutants, lacking essential genes, which are maintained by cells co-infected by different viral genotypes, is a common event in field population. These genotypes, when purified may lose the capacity to infect the host larvae due to deletions in genes *pif* (*per os* infectivity factor), essential for oral infectivity. It is known that PIF proteins are associated with the ODV particle envelope, required for the establishment of the primary infection in the insect. The genome of the *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) was recently sequenced, and the presence of the genes *pif-1* and *pif-2* in the virus was described. In the present work, genotypes of AgMNPV derived from the field isolate

AgMNPV-79 were selected and the existence of genotypic variants in the population was confirmed by viral DNA restriction analysis. To determine the possible presence of defective mutants, amplifications of the *pif-1* and *pif-2* regions have been carried out by PCR in each variant, so that all clones of the population presented amplifications for those two genes. All clones were revealed to be highly infective by oral ingestion, but the virulence assay revealed that the Ag79-01 genotype presented the greatest virulence. Recently, the presence of a third *pif* gene (*pif-3*) was identified in the genome of the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). In the same way, this gene is also essential for the establishment of the primary infection by oral ingestion. In our studies, based on BLAST analysis, the gene *pif-3* was identified as ORF 114 of the viral genome of the AgMNPV, which presented an identity of 67% with the AcMNPV virus ORF. Primers for the *pif-3* gene were then designed and samples of DNA of the different viral genotypes were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). Again all viral clones presented a fragment amplification corresponding to the *pif-3* region. Once the *pif* genes were present in all the analyzed genotype variants, a strategy was elaborated in order to assemble a recombinant virus with a *pif-1* gene deletion, aiming to study its role in insect oral infection. A recombinant virus named vAgGFPΔ*pif-1* was obtained by homologous recombination which had its *pif-1* gene replaced by a genic cassette containing a reporter gene (*gfp*) under the control of the constitutive promoter *hsp70*. This virus was selected by visualizing infected cells emitting fluorescence, due to the GFP protein expression. The virus vAgGFPΔ*pif-1* is being purified.

1. Introdução

1.1. Características e Classificação Taxonômica dos Baculovirus

Os baculovirus compreendem vírus que infectam artrópodes que habitam ecossistemas aquáticos e terrestres (Miller, 1997). Constituem o maior grupo de vírus de insetos, sendo principalmente encontrados em espécies da ordem Lepidoptera, e outras ordens tais como Hymenoptera e Diptera (Federici, 1997; Theilmann *et al.*, 2005).

Esses vírus foram adaptados para sobreviver fora de seus hospedeiros naturais e podem ser encontrados tanto no solo como em alimentos ingeridos. Não há relatos de doenças provocadas em organismos que não pertençam ao filo Arthropoda, por isso

esses vírus têm sido alvo de estudo para o controle de pragas naturais em cultura de plantas economicamente importantes (Payne, 1986; Moraes *et al.*, 1999; Barreto *et al.*, 2005). Os baculovirus são inofensivos a outros invertebrados, microorganismos, vertebrados e plantas devido a sua alta especificidade e a segurança em seu manejo, embora eles possam sob condições especiais, entrar em células de vertebrados sem se replicarem (Boyce e Bucher, 1996; Kost *et al.*, 2005).

As doenças causadas por baculovirus são freqüentes, principalmente em lepidópteros, causando uma alta mortalidade nas larvas desses insetos. A persistência dos baculovirus no campo é essencial para a ecologia do vírus, uma vez que eles ocorrem de forma natural em seus hospedeiros (Castro e Souza, 2006). As relações entre baculovirus e seus hospedeiros a nível individual são influenciados por muitos fatores. A evolução da estrutura dos baculovirus parece ser em resposta a fatores do ciclo de vida de seus hospedeiros que são freqüentemente caracterizados por suas expansões populacionais devido a fatores sazonais ou ecológicos que podem levar ao aumento das partículas virais na população durante muitos anos (Funk *et al.*, 1997; revisado por Cory e Myers, 2003). Entretanto, algumas variáveis ambientais como temperatura e outros fatores como nutrição da larva e compatibilidade do vírus com seu hospedeiro, podem afetar a resposta do inseto à infecção. O estágio larval do hospedeiro e também a concentração do inóculo viral, influenciam na patogenicidade do vírus e no tempo que o inseto leva para morrer (Cory *et al.*, 1997; Federici, 1997).

Os baculovirus possuem um genoma de DNA fita dupla, circular e covalentemente ligada, de aproximadamente 80 a 180kb em tamanho, podendo codificar de 100 a 200 proteínas (Theilmann *et al.*, 2005). O DNA é circundado por uma proteína básica com massa molecular de 7kDa (p6.9) que neutraliza a carga negativa do DNA. Além disso, essa estrutura está envolta por proteínas que protegem o

DNA e formam o nucleocapsídeo, a unidade infecciosa do vírus (Arif, 1986; Jehle *et al.*, 2006a; Szewczyk *et al.*, 2006).

Os baculovirus pertencem à família *Baculoviridae* que, com base na morfologia dos corpos de oclusão (OB), está dividida em dois gêneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (Theilmann *et al.*, 2005).

O gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) é composto por baculovirus que produzem corpos de oclusão em forma de poliedro (Figura 1a) com tamanho variando de 0,15 a 15µm cuja principal proteína é a poliedrina. O gênero *Granulovirus* (GV) é constituído por baculovirus com pequenos corpos de oclusão (grânulos) geralmente ovóides (Figura 1b) com tamanho variando entre 0,3 x 0,5µm, cuja proteína principal é a granulina (Funk *et al.*, 1997; Daimon *et al.*, 2007; Jehle *et al.*, 2006a). As proteínas poliedrina dos NPV e granulina dos GV variam de 25-33kDa (Theilmann *et al.*, 2005).

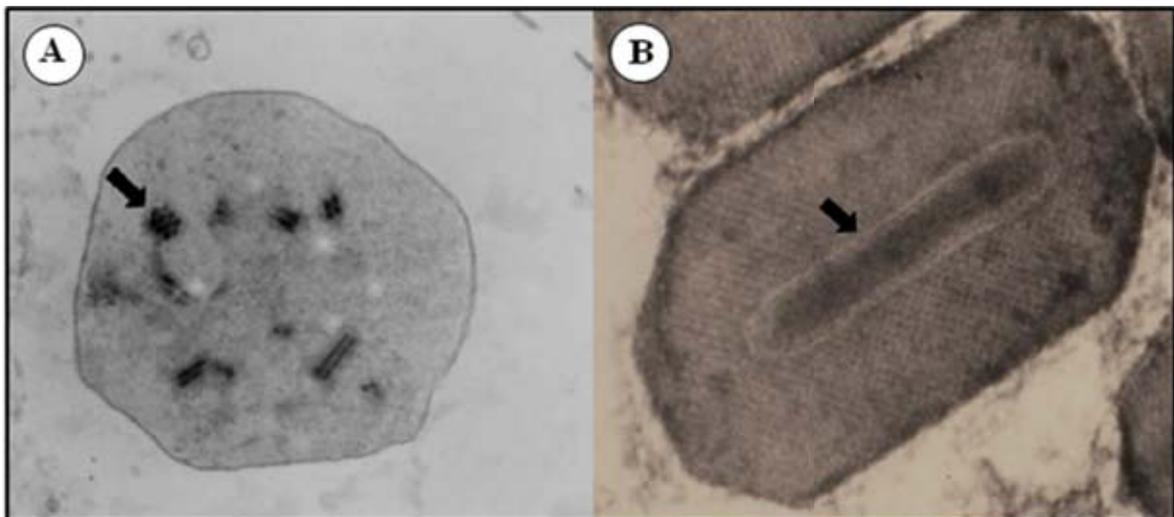


Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão de partículas virais. (A) Poliedro do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). A seta aponta uma partícula ODV com múltiplos nucleocapsídeos (Fonte: Rodas *et al.*, 2005). (B) Grânulo do baculovirus *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV). A seta aponta o nucleocapsídeo (Fonte: www.mpg.de).

Os NPV podem apresentar nucleocapsídeos com somente um vírion, *single* (SNPV) ou apresentar duas ou mais partículas virais em um único nucleocapsídeo, *multiple* (MNPV). Já os GV possuem somente um, ou raramente dois ou mais vírions, dentro do corpo de oclusão (Federici, 1997). As partículas virais possuem forma de bastão e estão circundadas por um envelope. Para o gênero *Nucleopolyhedrovirus*, o envelopamento das partículas infecciosas ocorre no núcleo da célula hospedeira, já nos baculovirus do gênero *Granulovirus* esse envelopamento se dá na interface núcleo-citoplasma depois da ruptura da membrana nuclear da célula do inseto (Theilmann *et al.*, 2005).

Comparações entre as seqüências dos genes da poliedrina e da DNA polimerase de diferentes NPV sugeriram que esse grupo pode ser dividido em NPV do grupo I e NPV do grupo II. (Zanotto *et al.*, 1993), e este dividido em subgrupos (Bulach *et al.*, 1999; Dalmolin *et al.*, 2005).

Mais recentemente, uma proposta de alteração na classificação da família *Baculoviridae*, gêneros NPV e GV, tem sido apresentada com base na especificidade do hospedeiro (Jehle *et al.*, 2006b). Análises de seqüências genômicas realizadas demonstram que NPV das ordens Diptera e Himenoptera representam grupos ancestrais (polifiléticos) que são filogeneticamente separados dos grupos monofiléticos formados por NPV e GV específicos da ordem Lepidoptera ([Afonso *et al.*, 2001](#); [Garcia-Maruniak *et al.*, 2004](#); [Herniou *et al.*, 2004](#); [Lauzon *et al.*, 2005](#); Jehle *et al.*, 2006a).

Assim Jehle *et al.* (2006b) sugeriram, através de evidências filogenéticas, a divisão da família *Baculoviridae* em quatro gêneros:

a) *Alphabaculovirus* inclui todos os NPV específicos de lepidópteros, *single* ou *multiple* nucleocapsídeo formadores dos fenótipos virais BV e ODV;

- b) *Betabaculovirus* compreende os GV específicos de lepidópteros que também formam partículas BV e ODV durante o ciclo de infecção;
- c) *Gammabaculovirus* engloba os NPV específicos de himenópteros os quais não possuem em seus genomas genes correspondentes às proteínas específicas da partícula BV sugerindo que ela possa estar ausente em membros desse grupo;
- d) *Deltabaculovirus* inclui o baculovirus CuniNPV (Afonso *et al.*, 2001), específico do díptero *Culex nigripalpus*, o qual não apresenta em seu genoma homólogos ao gene da poliedrina característico dos demais NPV.

1.1.1. Fenótipos Virais

Na replicação dos baculovirus, tanto dentro de um inseto hospedeiro como em células susceptíveis em cultivo, duas partículas infecciosas, geneticamente idênticas e estruturalmente distintas, são formadas. As duas formas virais são mostradas na Figura 2: a partícula ODV (*Occlusion Derived Virus*) que possui vírions em forma de bastão derivados de sua forma oclusa denominada OB (*Occlusion Body*) ou PIB (*Polyhedral Inclusion Body*); e a partícula BV (*Budded Virus*) que é a forma viral não ocluída, polarizada, gerada pelo brotamento do nucleocapsídeo através da membrana plasmática (Granados e Williams, 1986; Theilmann *et al.*, 2005).

Baculovirus Fenótipos Virais

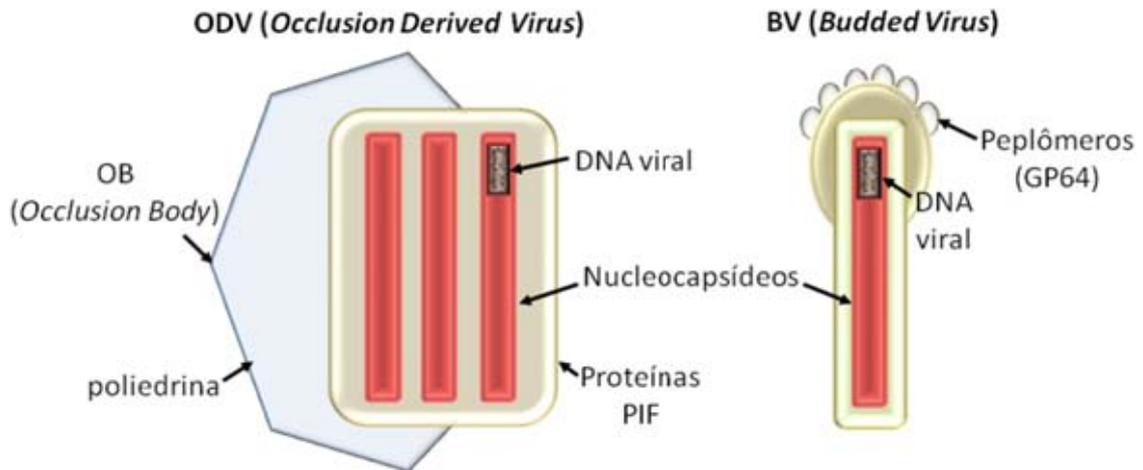


Figura 2: Ilustração dos fenótipos virais ODV e BV formados durante o ciclo de infecção dos baculovírus.

As duas formas virais diferem quanto à morfologia de seus envelopes, composição protéica, tropismo tecidual, vias de infecção no inseto e tempo de aparecimento durante o ciclo de infecção viral (Horton e Burand, 1993).

O envelope do fenótipo BV é adquirido por brotamento da membrana plasmática e está adaptado para movimento e infecção de tecidos dentro do inseto, enquanto que o envelope do ODV é adquirido dentro do núcleo celular e está adaptado para interagir com estruturas poliédricas no processo de oclusão, facilitando a infecção do epitélio no ambiente do intestino do inseto (Faulkner *et al.*, 1997; Funk *et al.*, 1997).

A habilidade dos fenótipos BV e ODV em persistir na natureza pode estar relacionada às proteínas associadas ao envelope de cada tipo viral. Os BV possuem projeções em seus envelopes denominadas peplômeros, cujo principal componente é a glicoproteína GP64 ou proteína F em NPV do grupo II (Pearson e Rohrmann, 2002). Essa proteína baixo pH dependente (pH 6,4 – 6,8) tem atividade fusogênica, é de

fundamental importância para a infectividade dos BV e não está presente no fenótipo ODV (Volkman e Goldsmith, 1985; Hefferon *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2006). Os BV são capazes de infectar as células de diferentes tecidos dispersando a doença na lagarta, sendo esse fenótipo duas mil vezes mais infeccioso dentro da hemocele em relação aos ODV, que por sua vez são três vezes mais infecciosos no intestino do que na hemocele da lagarta (Blissard e Rhormann, 1990; Kikhno *et al.*, 2002; Haas-Stapleton *et al.*, 2004).

A forma ODV está envolvida por uma membrana lipídica fortemente associada com os nucleocapsídeos. Essa membrana desempenha um papel integral na associação com a poliedrina durante a cristalização para formação do corpo de oclusão como também no processo de infecção (Funk *et al.*, 1997).

O mecanismo de fusão ao envelope ODV e seus receptores de membrana, ainda não estão bem elucidados. Porém algumas proteínas do envelope ODV têm sido descritas e associadas à entrada dessa partícula viral na célula hospedeira. Alguns genes conhecidos como fatores de infectividade oral, *pif* – *per os infectivity factor* estão associados à habilidade do vírus em infectar o inseto por essa via (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003; Ohkawa *et al.*, 2005). Um dos primeiros genes *per os* identificados foi o *p74* cuja proteína (P74) é componente estrutural do envelope ODV e está diretamente envolvida com a infectividade por via oral do fenótipo ocluído (Kuzio *et al.*, 1989).

Sabe-se que na ausência de um desses genes a infecção mediada por ODV não ocorre, indicando que os genes *pif* são essenciais para o estabelecimento da infecção primária no inseto. Para o fenótipo BV a ausência de genes *pif* não altera a infectividade uma vez que as proteínas PIF estão ausentes na superfície de sua membrana (Faulkner *et al.*, 1997; Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005).

Braunagel *et al.* (2003) identificaram no protótipo viral *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) 31 proteínas relacionadas ao envelope ODV, entre elas proteínas associadas à replicação do DNA viral (ex.: DNA polimerase, IE-1, helicase e LEF-1) e outras específicas ao envelope ODV como proteínas hidrofóbicas que direcionam a fusão da membrana viral com o endossomo celular – ODV-E66 e ODV-E25 (Hong *et al.*, 1997). Um total de 44 proteínas associadas ao ODV foram identificadas em estudos realizados com o baculovirus *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV) (Perera *et al.*, 2007).

O fenótipo ODV é produzido em estágios tardios da infecção e possui vários nucleocapsídeos envelopados e ocluídos em uma matriz protéica, o que permite sua estabilidade no ambiente externo garantindo a persistência do vírus. Já a forma não ocluída é sintetizada em estágios precoces da infecção e embora possua um só nucleocapsídeo por envelope, permite a eficiente dispersão da infecção no corpo da lagarta garantindo a replicação viral e a formação de novos corpos de oclusão (Funk *et al.*, 1997; Lu e Miller, 1997).

1.2. Processo de Infecção e Disseminação Viral

A infecção por baculovirus em seus hospedeiros é caracterizada por um ciclo de replicação bifásica, produzindo duas progênes infecciosas, BV e ODV, em diferentes estágios da replicação. Essa habilidade confere ao vírus uma replicação eficiente e a dispersão da doença na população do inseto hospedeiro.

Na natureza o ciclo de infecção inicia-se pela ingestão das partículas virais, na forma oclusa (poliedros) presentes na superfície foliar, pelo inseto hospedeiro. A

proteína poliedrina forma a matriz cristalina dos poliedros juntamente com a proteína p10 que realiza um arranjo fibroso para a formação dos OB. O capsídeo é de fundamental importância para a permanência do vírus no meio ambiente uma vez que ele protege o DNA viral da degradação pela radiação da luz UV, mantém a atividade biológica dos vírions enquanto esses se encontrarem fora do hospedeiro e preserva a integridade das partículas virais durante o ataque proteolítico nos estágios finais de infecção (Hu *et al.*, 1999; Ramachandran *et al.*, 2001).

Chegando ao intestino médio (Figura 3) os OB são rapidamente dissolvidos pela ação do pH altamente alcalino (pH8 a 10) e pela ação de enzimas proteolíticas (Federici, 1997). Esse processo ocorre no intestino médio porque os intestinos anterior e posterior da lagarta são revestidos por uma membrana composta por quitina, dificultando a passagem do vírus. As partículas ODV então, após liberadas do corpo de oclusão, entram em contato primeiramente com as células epiteliais do intestino médio (Billimoria, 1991; Federici, 1997).

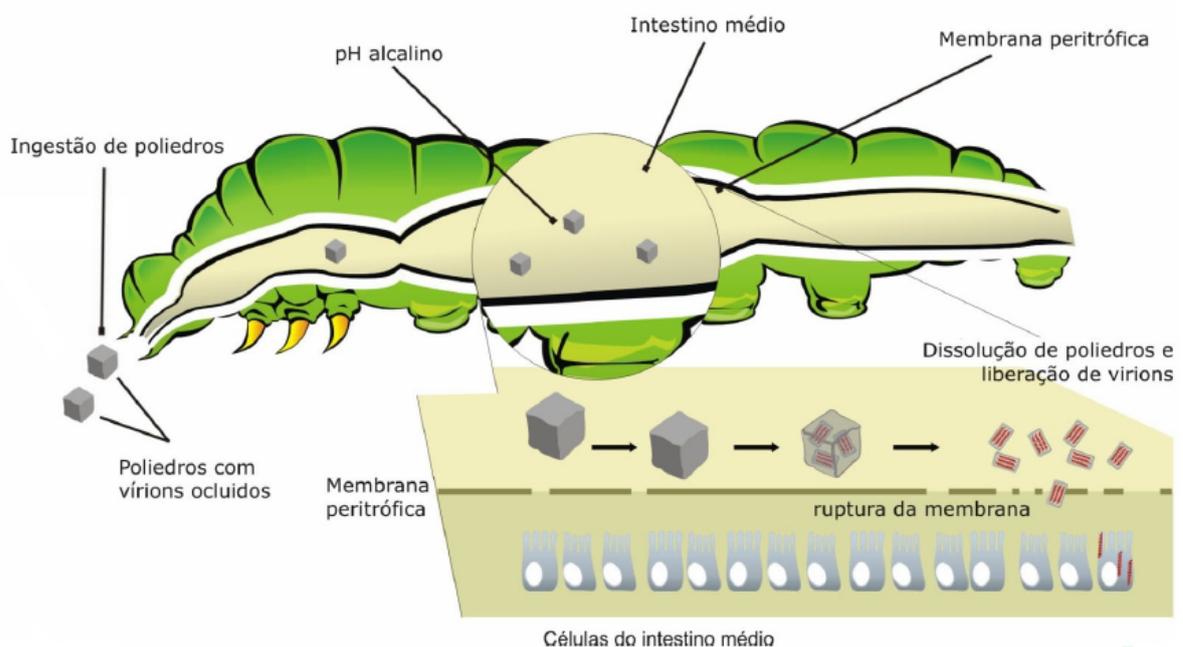


Figura 3: Ilustração do processo de infecção viral no intestino médio de uma larva infectada por baculovirus. Ingestão e entrada dos poliedros na lagarta, liberação das partículas ODV, passagem pela membrana peritrófica e entrada dos nucleocapsídeos nas células colunares do intestino médio. Fonte: Castro e Souza, 2006 (*ilustração adaptada de Kalmakoff e Ward 2003*).

Os vírions liberados passam através da membrana peritrófica que consiste em um revestimento protetor constituído de glicoproteínas e proteoglicanas secretadas pelas células anteriores do intestino médio da lagarta. Essa membrana acelular funciona como uma barreira para a passagem de pequenas partículas. (Federici, 1997; Levy *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007). A passagem do vírus pela membrana peritrófica ocorre de uma maneira ainda não elucidada. Uma proteína, chamada *Enhancin*, codificada por algumas espécies de baculovirus mostrou ser capaz de degradar a membrana peritrófica resultando em um aumento da infecção viral por facilitar a passagem de partículas virais (Wang *et al.*, 1994).

Assim o ODV entra nas células epiteliais por um processo de ligação e fusão direta através de receptores específicos presentes na superfície celular. Essa interação entre a célula e a membrana do envelope ODV é mediado por produtos dos genes *pif* os quais estão presentes no genoma da maioria dos baculovirus já seqüenciados (NPV Grupos I e II).

Os nucleocapsídeos então entram no citoplasma celular, são transportados ao núcleo, têm seus DNA desnudados após uma hora de infecção e tem início a transcrição de genes essenciais à replicação do DNA genômico e à formação de BV.

A infecção por baculovirus desencadeia uma série de mudanças comportamentais e morfológicas, tornando o inseto debilitado devido à habilidade do vírus de se replicar em diversos tecidos. Por volta do terceiro ou quarto dia de ingestão de poliedros a larva apresenta redução de sua alimentação, retardo no crescimento,

flacidez tecidual, descoloração da epiderme e diminuição da mobilidade aumentando a exposição à predação. Ocorre freqüentemente descoloração do tegumento e as larvas migram para o topo da planta hospedeira (Figura 4) ficando presas pelas patas traseiras (geotropismo negativo) morrendo após o quinto dia de infecção (Granados & Williams, 1986; Moscardi, 1999; Castro e Souza, 2006).

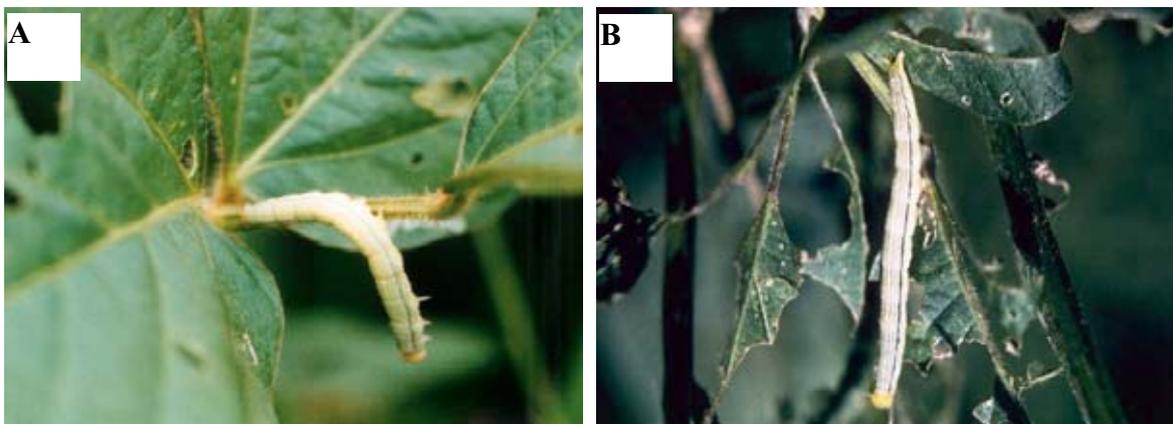


Figura 4: Larvas infectadas com o baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*. Comportamento de geotropismo negativo e descoloração do tegumento (Fonte: (A) www.tulha.com.br; (B) www.gaipm.org).

Jarvis (1997) acrescenta que após a morte da larva do inseto ocorre uma liquefação de seus tecidos pela ação de enzimas codificadas pelo genoma viral, rompendo-se com facilidade e liberando grande quantidade de poliedros no ambiente. As enzimas responsáveis pela ruptura da cutícula do inseto são as quitinase e catepsina que são secretadas na fase tardia de infecção. (Hawtin *et al.*, 1997; Miller, 1997; Merzendorfer e Zimoch, 2003; Daimon *et al.*, 2007).

1.3. Expressão Gênica em Baculovirus

A expressão gênica dos baculovirus envolve uma série de eventos em cascata temporalmente regulados onde os genes expressos em uma fase são dependentes dos produtos dos genes expressos na fase anterior. As fases de expressão irão regular a formação dos dois fenótipos virais durante o ciclo de replicação dentro da célula hospedeira (Friesen e Miller, 1986; Blissard e Rhormann, 1990).

Os genes de baculovirus podem ser classificados inicialmente de acordo com duas fases de expressão temporal: fase precoce, que antecede a replicação do DNA viral e fase tardia, que inicia logo após a replicação do DNA. A complexidade dessa via regulatória pode ser evidenciada pela síntese de várias proteínas virais que vão sendo expressas no decorrer de cada estágio da infecção (Friesen e Miller, 1986; Blissard e Rhormann, 1990; Ramachandran *et al.*, 2001)

A expressão de genes da fase precoce ocorre durante as primeiras seis horas de infecção, depois do desnudamento do genoma viral no interior do núcleo celular. É mediada por uma RNA polimerase derivada da célula hospedeira e parte dos genes da fase precoce não depende da síntese de outros produtos gênicos virais para sua expressão. A fase precoce resulta na transcrição de genes codificadores de proteínas necessárias para a replicação do DNA viral e para a transcrição de genes tardios (Lu e Carstens, 1993; Ribeiro *et al.*, 1994; Lin e Blissard, 2002).

Vários genes da fase precoce possuem elementos em sua região promotora que se assemelham aos elementos eucarióticos e requerem apenas a RNA polimerase II do hospedeiro para a expressão. O elemento CAGT é altamente conservado em genes da fase precoce, e qualquer substituição de sua sequência resulta na redução da transcrição. Os genes *ie-0* e *ie-2* são exemplos importantes de genes regulatórios da fase precoce expressos apenas no início da infecção e são elementos responsáveis pela transativação

de promotores de outros genes virais da fase precoce (Friesen, 1997; Ramachandran *et al.*, 2001; Lin e Blissard, 2002).

A transição entre as fases precoce e tardia é dependente da replicação do DNA viral e dos produtos expressos pelos genes da fase precoce. Genes da fase tardia começam a ser expressos de 6 até 20 – 24hpi (Lu e Miller, 1997) e são dependentes de uma RNA polimerase viral, resistente à α -amanitina, um inibidor da RNA polimerase II eucariótica. O aumento da transcrição de genes do vírus durante a fase tardia contrasta com o declínio de mRNA da célula hospedeira (Guarino *et al.*, 1998; Lu e Miller, 1997; Ramachandran *et al.*, 2001).

Durante as primeiras oito horas de infecção há uma intensa replicação do DNA e síntese de BV (Figura 5). Nos estágios tardios, os nucleocapsídeos que deverão ser envelopados vão sendo maturados, dentro do núcleo das células, no espaço denominado peristromal (zona em anel). Partículas ODV maduras são ocluídas dentro de uma matriz paracristalina primariamente composta da proteína viral poliedrina, no caso dos NPV (Volkman, 1983; Billimoria, 1991).

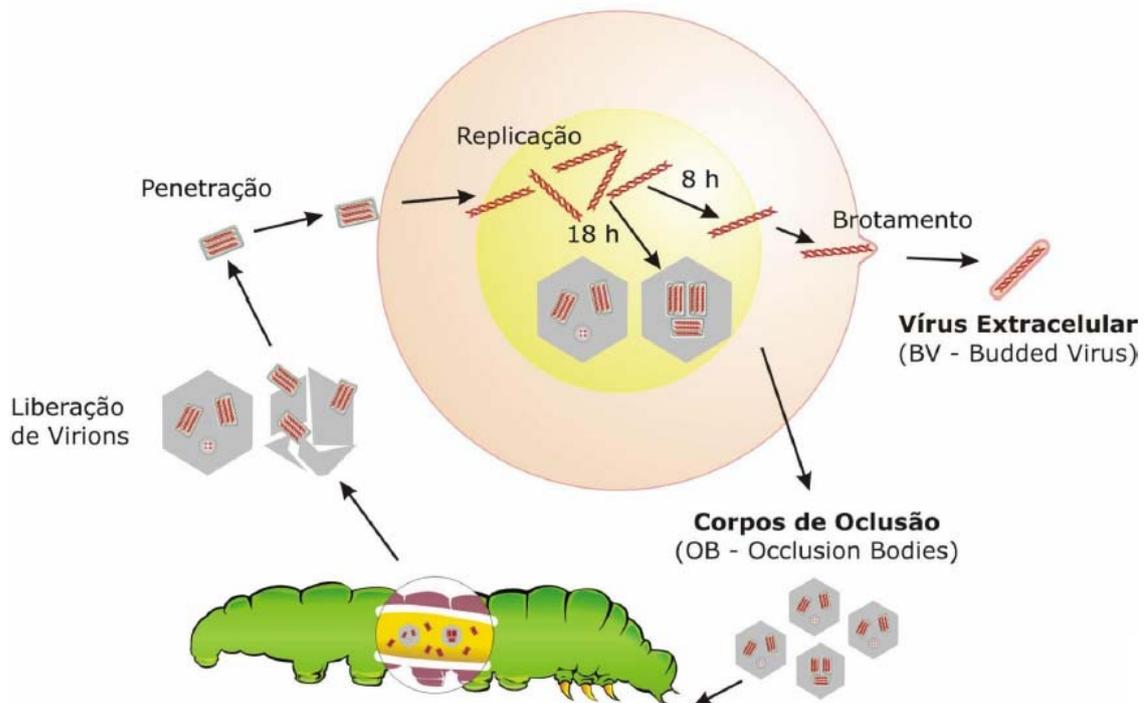


Figura 5: Ilustração do processo temporal de formação das partículas virais. (Fonte: Castro e Souza, 2006).

A fase tardia pode ser dividida em duas classes: tardia e muito tardia. Essas fases coincidem com a produção das formas virais (BV e ODV). Genes codificadores de proteínas estruturais do nucleocapsídeo são abundantemente transcritos na fase tardia, enquanto genes que codificam polipeptídeos relacionados aos corpos de oclusão têm sua transcrição mais intensa na fase muito tardia (Lu e Miller, 1997).

Os níveis de mRNA de genes da fase tardia diminuem no decorrer de 18hpi., enquanto há uma notável expressão dos genes da fase muito tardia. Os transcritos de genes dessas classes iniciam dentro da sequência (A/G/T) TAAG. Esse motivo tetranucleotídico é absolutamente essencial para a atividade promotora desses genes (Blissard e Rhormann, 1990; O'Reilly *et al.*, 1992; McLachlin e Miller, 1994; Lu e Miller, 1997).

Dois genes pertencentes às fases tardia e muito tardia são: *p10* e *polh*, respectivamente. Esses genes estão envolvidos no processo de oclusão das partículas virais e por possuírem promotores muito fortes e não serem essenciais para a propagação do vírus *in vitro*, têm sido escolhidos para clonagem e expressão de genes heterólogos.

1.4. Genes *pif* (*per os infectivity factor*)

1.4.1. Estrutura dos Genes *pif* (*per os infectivity factor*) e Proteínas PIF

Os genes *pif* têm sido atualmente identificados como fatores essenciais na infecção oral da larva hospedeira. As proteínas PIF são exclusivas do fenótipo ODV, localizadas na fração do envelope e estão relacionadas a eventos iniciais da infecção como o processo de ligação e entrada da partícula viral nas células colunares do intestino médio da lagarta. Três genes pertencentes à família *pif*, denominados *pif-1*, *pif-2* e *pif-3* já foram identificados em *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV) (Kikhno *et al.*, 2002), *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) (Pijlman *et al.*, 2003) e *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) (Ohkawa *et al.*, 2005), respectivamente, além do gene *p74*, que foi o primeiro a ser relatado em estudos de infecção com o baculovirus AcMNPV (Kuzio *et al.*, 1989). O *p74* tem sido considerado um gene da família *pif* uma vez que é também essencial para a infectividade por via oral do inseto.

Esses genes são expressos em eventos tardios da infecção e seus produtos estão presentes em quantidades muito baixas. Gutiérrez *et al.* (2004) verificaram que o gene *pif-1* de *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus* (SpliNPV) possui uma unidade de transcrição complexa, onde cerca de seis RNA mensageiros são sintetizados. A

quantidade desses mensageiros é cerca de 300 vezes mais baixa em relação aos transcritos de outros genes como o da poliedrina, tendo como consequência a baixa quantidade expressa dessa proteína. Observaram também que a transcrição de *pif-1* parece ser regulada por uma região promotora curta e esta pode ser regulada por uma sobreposição de múltiplos mensageiros.

As pequenas amostras de PIF podem ser suficientes para a produção da infecção por via oral, tendo em vista que sua região promotora pode ser reduzida ao máximo sem que ocorram mudanças no nível de transcritos. O baixo grau de expressão e a presença de genótipos com ausência deste gene indica que *pif* pode ser regulado dentro de certos limites a níveis transcricionais e a nível de população viral (Simón *et al.*, 2004).

O motivo (A/G/T) TAAG é encontrado em promotores de genes expressos na fase tardia da infecção e está presente nos genes *pif*. Esse motivo é essencial para obter a expressão suficiente da proteína PIF, já que na ocorrência de inversão de alguma base na região não variável desse motivo verifica-se a não formação da progênie viral infecciosa por via oral. TAAG está presente nas regiões promotoras de todos os baculovirus seqüenciados e parece ser o único elemento o qual é conservado na região promotora de *pif* como é o caso de outros genes da fase tardia de baculovirus (Gutiérrez *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2005a).

As proteínas PIF possuem seqüências N-terminal hidrofóbicas ricas em valinas, isoleucinas e leucinas. Outras proteínas do envelope ODV (ODV-E66 e ODV-E25) também possuem seqüências similares e são muito conservadas em todos os baculovirus já seqüenciados. A seqüência hidrofóbica N-terminal de PIF atua como peptídeo sinal, essencial para o tráfego de proteínas ao núcleo, sugerindo que pode ser secretada ou localizada na membrana. Ensaios de competição implicaram que as proteínas P74, PIF-1 e PIF-2 podem funcionar como proteínas anexadas para a ligação do ODV às células

alvo no intestino médio. A proteína PIF-3 media outro evento ainda não identificado embora importante durante o início da infecção primária (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

Na proteína PIF-1 do baculovirus SpliMNPV, Kikhno *et al.* (2002) não detectaram nenhum tipo de glicosilação sugerindo que essa proteína não entra no lúmen do retículo endoplasmático, confirmando que o domínio hidrofóbico N-terminal pode atuar como uma seqüência de ancoramento na membrana. Relataram ainda que a remoção da proteína da membrana celular foi muito difícil, e essa observação sugere que esse ancoramento pode ser do tipo lipídico.

P74 e PIF podem interagir para ativar a entrada do vírus nas células pelo contato direto ou pela atuação em cascata nos passos de ligação e fusão propostos por Horton e Burand (1993). Em resumo, PIF parece ser uma proteína requerida entre a ligação de ODV às células do intestino médio e o início da replicação de DNA do vírus com a subsequente produção da progênie de BV (Kikhno *et al.*, 2002).

1.4.2. Efeitos da Deleção de Genes *pif*

A deleção de alguns dos genes *pif* reduz dramaticamente as chances do vírus em infectar seu hospedeiro e de se espalhar na natureza, podendo bloquear sua transmissão. A interrupção dos genes *pif* implica na não liberação do nucleocapsídeo do envelope ODV, impedindo a replicação do vírus em qualquer célula (Gutiérrez *et al.*, 2005). Kikhno *et al.* (2002) estudaram um mutante de SpliNPV apresentando uma deleção que compreendia toda a ORF do gene *pif*. Esse vírus foi incapaz de infectar a larva por via oral, porém em cultura de células o vírus foi capaz de estabelecer a infecção com formação de poliedro. Esse vírus também foi incapaz de realizar recombinação quando

na presença de um plasmídeo contendo a seqüência de *pif*, porém os ODV produzidos continham a proteína devido ao seqüestro desta, mas no DNA do vírus mutante não houve detecção do gene.

Lauzon *et al.* (2005) seqüenciaram o genoma completo do vírus defectivo *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus (CfDefNPV), que só consegue infectar a lagarta por via oral na presença do vírus completo *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV), ou se injetados na hemocele da lagarta. Entretanto, no genoma desse vírus defectivo os genes *pif* estão presentes. Todas as proteínas homólogas de PIF possuem 19 cisteínas conservadas e o vírus CfDefNPV possui o último aminoácido cisteína diferente das demais homólogas, sugerindo que essa característica possa alterar a formação de pontes dissulfídicas e o dobramento da proteína PIF. Embora a proteína PIF-2 neste vírus tenha mostrado homologia com as demais já estudadas, há uma inversão envolvendo a ORF correspondente ao gene *pif-2* em relação aos demais genomas dos NPV do grupo I. Porém, não se sabe se isto de alguma forma pode afetar a expressão de *pif-2*. Esses estudos apenas salientam a importância desses genes para o estabelecimento da infecção oral pela rota natural dos baculovirus em seus hospedeiros.

Com base nos estudos de deleção de genes de virulência, tecnologias baseadas em sistemas de expressão em baculovirus estão promovendo a biosegurança desses vetores através da deleção dos genes de infecção *per os* (Gutiérrez *et al.*, 2005). Estudos feitos com o vírus AcMNPV com deleção do gene *pif-1* (Gutiérrez *et al.*, 2005) demonstraram que não houve infecção oral dos hospedeiros por esse baculovirus e durante a infecção na presença do genótipo do tipo selvagem, também não houve infecção pelo recombinante. Além disso, o vírus com o *pif-1* deletado e com inserção de uma proteína heteróloga (CAT) demonstrou expressão maior da proteína em relação ao

vírus recombinante com o gene *pif-1* íntegro. Apesar da deleção dos genes *pif* dificultar o estabelecimento da infecção do hospedeiro pelo vírus, a construção destes recombinantes pode representar uma medida de segurança ambiental. Isso serviria para minimizar a possível dispersão de genes na natureza e a infecção de hospedeiros não-alvo pelo vírus recombinante.

1.5. Variantes Genotípicos em Populações de Baculovirus

Os baculovirus, na natureza, possuem em seus corpos de oclusão (OB) partículas ODV que abrigam diversos nucleocapsídeos por envelope. Essa estrutura de envelopamento das partículas virais permite ao vírus abrigar uma extensa variabilidade de genótipos em somente um corpo de oclusão. A infecção de uma célula hospedeira decorrente de genótipos distintos resulta em uma mistura de genomas característica dos baculovirus em campo. A força que mantém essa diversidade pode incluir vários componentes principalmente recombinação entre diferentes genótipos e interações dentro do hospedeiro entre genomas parasitas competidores (López-Ferber *et al.*, 2003).

Essa heterogeneidade pode decorrer da infecção por múltiplos genótipos ou pode ser gerada durante o ciclo de infecção através de mutações pontuais, duplicação de genes, e inserções ou deleções no DNA (revisado por Cory e Myers, 2003). Isso ocorre com frequência nas populações de vírus, principalmente em baculovirus do gênero NPV e em consequência disso é comum encontrar mutantes surgidos espontaneamente. Esses genótipos individuais podem diferir entre si quanto à virulência ou patogenicidade, embora se saiba que cada genótipo é capaz de se replicar e ser transmitido de forma independente. Entretanto, esses mutantes podem sofrer deleções de parte de seu genoma ou apenas em genes essenciais para a replicação viral ou para o estabelecimento da

infecção oral, impedindo sua entrada inicial na célula e a replicação individual dentro do hospedeiro por falta de proteínas específicas (López-Ferber *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2005b; Simón *et al.*, 2006).

Apesar da falta de estruturas essenciais para o estabelecimento da infecção primária, esses variantes prevalecem na população através da co-infecção de células infectadas por genótipos completos (conhecidos como *helpers*) contidos na mistura de nucleocapsídeos do envelope ODV. O mutante defectivo então atua como um parasita utilizando produtos transcritos do genótipo completo tais como proteínas estruturais, enzimas ou fatores de regulação, compensando a ausência desses genes. A vantagem seletiva desses variantes é uma replicação mais rápida em relação ao genótipo completo, entretanto eles não podem se replicar sem a ajuda do genótipo *helper* (Simón *et al.*, 2006).

López-Ferber *et al.* (2003) identificaram dentro de uma população de baculovirus de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* uma mistura de genótipos na qual havia alguns desses variantes defectivos. Observaram também que esses mutantes sozinhos não eram capazes de infectar a larva por via oral, entretanto quando eram injetados dentro da hemocele da lagarta ou misturados com variantes completos conseguiam estabelecer a infecção. Contrários à corrente teórica, López-Ferber *et al.* verificaram que dentro da população de baculovirus SfMNPV as interações entre genótipos defectivos misturados com genótipos completos resultam em um aumento da patogenicidade da população do tipo selvagem, quando comparado ao genótipo completo sozinho. Simón *et al.* (2005b) acrescentam que os baculovirus exibem um alto grau de heterogeneidade genética e o fato da minoria dos genótipos defectivos não ser eliminada por completo da população sugere que esta heterogeneidade é importante para a sobrevivência do vírus. Essa diversidade genética,

encontrada em isolados do campo confere ao vírus um melhor desempenho para o biocontrole de pragas em relação aos isolados com baixa heterogeneidade (Simón *et al.*, 2004).

Os variantes genotípicos, embora muito relacionados entre si, podem ser distinguidos uns dos outros pelo polimorfismo apresentado nas diferenças de tamanho de seus fragmentos de restrição ou por alterações em suas regiões genômicas como adições, deleções ou duplicações de bases nucleotídicas. Essa alta prevalência de recombinação, comum aos baculovirus, junto com o envelopamento de múltiplos genótipos em um único vírion, podem ser consideradas estratégias evolucionárias garantindo a preservação de altos níveis de variabilidade genética em populações de NPV (Simón *et al.*, 2004).

Algumas vezes as deleções podem afetar genes importantes à virulência de um determinado fenótipo viral. Isso explica o fato de genótipos defectivos selecionados, na maioria das vezes, apresentarem baixa ou nenhuma infecção quando isolados, porém suas partículas BV, uma vez na hemolinfa, causam infecção. A ausência da infecção por via oral desses genótipos defectivos está então associada aos genes *pif* que são essenciais para o estabelecimento da infecção primária da larva hospedeira.

1.6. Aplicações Tecnológicas dos Baculovirus

Um maior conhecimento sobre a genômica do baculovirus permitiu a sua manipulação genética. O vírus AcMNPV tem sido usado como vetor de expressão devido a sua capacidade de infectar uma variedade de espécies hospedeiras (Miller,

1997). O fato dos baculovirus produzirem uma quantidade alta da proteína poliedrina durante a sua infecção foi um condicionante fundamental para o desenvolvimento de vetores de expressão. Além disso, o fato do vírus não necessitar desse gene para se replicar em cultura de células, abriu espaço para que genes de interesse fossem inseridos no *locus* do gene *polh* e conseqüentemente levasse à produção de proteínas heterólogas (Jarvis, 1997).

Um dos objetivos no emprego de sistemas de expressão é a produção de proteínas em grandes quantidades e a custos baixos. Sistemas baseados em bactérias, embora sejam mais econômicos em relação ao com uso de células de insetos, possuem um custo elevado quando relacionado ao processo de purificação da proteína. Sistemas baseados em leveduras realizam mudanças pós-traducionais não desejáveis modificando a proteína de interesse ou tornando-a imunogênica. Em sistemas baseados em células de mamíferos, o processamento da proteína ocorre de uma maneira adequada, porém os custos para a manutenção dessas células em cultura são muito elevados (Montor e Sogayar, 2003).

Uma das principais características do sistema de expressão baseado em baculovirus é a capacidade apresentada pelas células de inseto, por serem células de eucariotos superiores, de promover alterações pós-traducionais nas proteínas produzidas adequadas ao ambiente eucariótico. Dentre as vantagens da utilização de baculovirus como vetor de expressão, está a capacidade de inserção de grandes fragmentos de DNA. Além disso, esse sistema pode oferecer um alto nível de produção da proteína de interesse, uma vez que o gene heterólogo permanece sob o comando de um promotor viral forte; facilidade na produção e purificação da proteína heteróloga através do sobrenadante celular (proteínas secretáveis) ou extrato celular (proteínas não - secretáveis); e obtenção de uma proteína funcionalmente ativa, uma vez que as

modificações pós-traducionais, atividade biológica e estabilidade protéica se assemelham ao natural da proteína de interesse (Philipps *et al.*, 2004).

O sistema de expressão baseado em baculovirus fornece um ambiente apropriado para a síntese protéica oferecendo condições para o dobramento adequado da proteína, formação de pontes dissulfídicas, oligomerização e modificações pós-traducionais similares às produzidas em células de mamíferos (O'Reilly *et al.*, 1992).

Muitas técnicas têm permitido o uso de genes marcadores para a identificação de baculovirus recombinantes. A proteína GFP (*green fluorescent protein*) tem aprimorado a seleção desses recombinantes (Grasella *et al.*, 2000; Philipps *et al.*, 2004). GFP é uma proteína de 238 aminoácidos com peso molecular de 25kDa (Prasher *et al.*, 1992). Foi isolada da água-viva bioluminescente *Acquorea victoria* e o cromóforo formado por resíduos de aminoácidos modificados absorve a luz UV em 395nm, emite uma intensa fluorescência verde com um pico de 509nm (Cody *et al.*, 1993). A proteína GFP não necessita de nenhum co-fator, é espécie-independente e pode ser visualizada em tecidos vivos. Esta proteína vem sendo utilizada para localização e purificação protéica, estudo de interação entre proteínas, monitoramento e visualização de infecção por baculovirus (Barret *et al.*, 1998; Cha e Bentley, 2007).

A obtenção de baculovirus recombinantes com a inserção de genes marcadores pode ser feita a partir da estratégia de recombinação homóloga. Como em baculovirus recombinações, mutações e transposições são ocorrências comuns, torna-se fácil a inserção de genes em regiões pré-determinadas no genoma viral. A recombinação homóloga *in vitro* baseia-se na troca entre o DNA genômico do vírus e um plasmídeo contendo um gene marcador flanqueado pelas seqüências homólogas ao gene alvo (Kamita *et al.*, 2003). Essa técnica também é muito utilizada para realização de deleção de genes alvo (Figura 6), através da recombinação com plasmídeos contendo genes

marcadores. Pijlman *et al.* (2003) construíram diversos baculovirus recombinantes com deleções em várias ORF para a identificação e o estudo do gene *pif-2*.

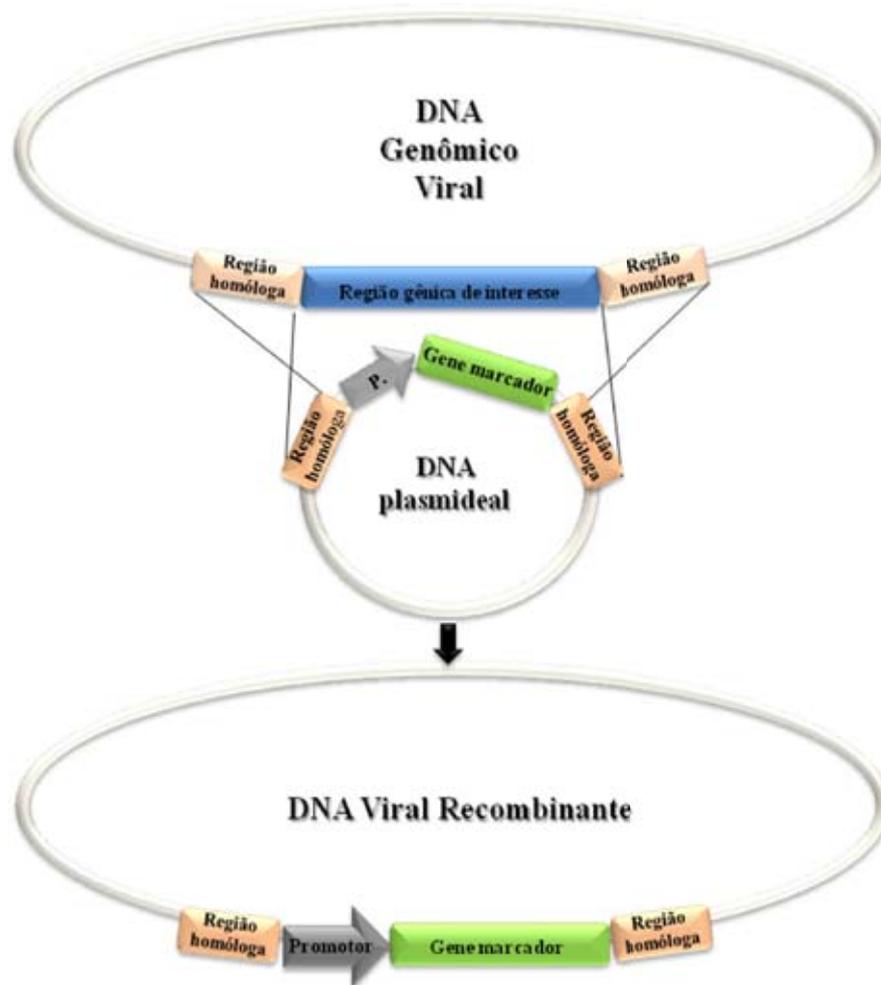


Figura 6: Ilustração do processo de deleção de um gene de interesse através do processo de recombinação homóloga. A recombinação ocorre entre o DNA viral e o plasmídeo contendo o gene marcador flanqueado pelas seqüências homólogas do gene de interesse.

Outras novas tecnologias de construção de baculovirus recombinantes têm sido desenvolvidas. Uma delas é o sistema de transposição bacteriano *in vivo* descrito pela primeira vez por Luckow *et al.* (1993). Essa técnica é comercialmente conhecida como sistema de expressão Bac-To-Bac™ (Kost *et al.*, 2005) e é baseada na transposição de um fragmento de DNA dentro do genoma. Essa transposição é promovida por enzimas

denominadas transposases e um cassete de expressão é inserido dentro de um vetor com genoma baculoviral (bacmídeo) e pode ser propagado em células bacterianas de *E. coli*. Com isso um bacmídeo recombinante pode ser selecionado, isolado e transfectado em cultura de células de insetos para produzir baculovirus recombinantes.

Em cultura de células os BV de baculovirus são capazes de infectar uma variedade de linhagens celulares, não somente as derivadas de seus insetos hospedeiros, mas linhagens de outras espécies de insetos como também de penetrar em células de mamíferos (Clem, 2005). Portanto, além de sua utilização como vetor de expressão, baculovirus podem ser usados como vetores de terapia gênica em células humanas (Kenoutis *et al.*, 2006; Kost *et al.*, 2005). Estudos têm sido realizados com o protótipo viral AcMNPV como veículo de liberação de genes exógenos em linhagens celulares do fígado, dos rins e células neurais (Hofmann *et al.*, 1995; Shoji *et al.*, 1997; Condreay *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2004). Os baculovirus apresentam vantagens como vetores de liberação gênica em células de mamíferos devido a sua inabilidade de replicação nessas células, capacidade de sustentar grandes inserções de DNA exógeno, aparente ausência de citotoxicidade e habilidade de ligação a diferentes tipos celulares (Kost *et al.*, 2005; Kenoutis *et al.*, 2006).

1.7. Uso de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) como inseticida biológico

Os baculovirus constituem importantes agentes naturais de controle de pragas agrícolas. Sua utilização segura como inseticidas biológicos e perspectivas futuras foi revisada recentemente por Souza *et al.* (2004 e 2007). O inseto-praga *Anticarsia gemmatalis* (Figura 7), conhecido como lagarta da soja, causa danos às plantações de soja na América Latina e no sudeste dos Estados Unidos. Há mais de duas décadas um

Baculovirus patogênico a este inseto, denominado *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), tem sido aplicado para controle da praga com significantes benefícios econômicos e ecológicos. Assim, esse vírus tornou-se um modelo para uso em programas de controle biológico ou mesmo para controle integrado de pragas.

Com o crescente uso do vírus AgMNPV como bioinseticida e a conseqüente necessidade do desenvolvimento de estudos sobre esse vírus, um clone viral foi purificado (AgMNPV-clone 2D) (Maruniak, 1989; Maruniak *et al.*, 1999) a partir de isolados coletados no campo, caracterizado e recentemente foi feita a determinação da seqüência nucleotídica de seu genoma com 132.239pb (Oliveira *et al.*, 2006).

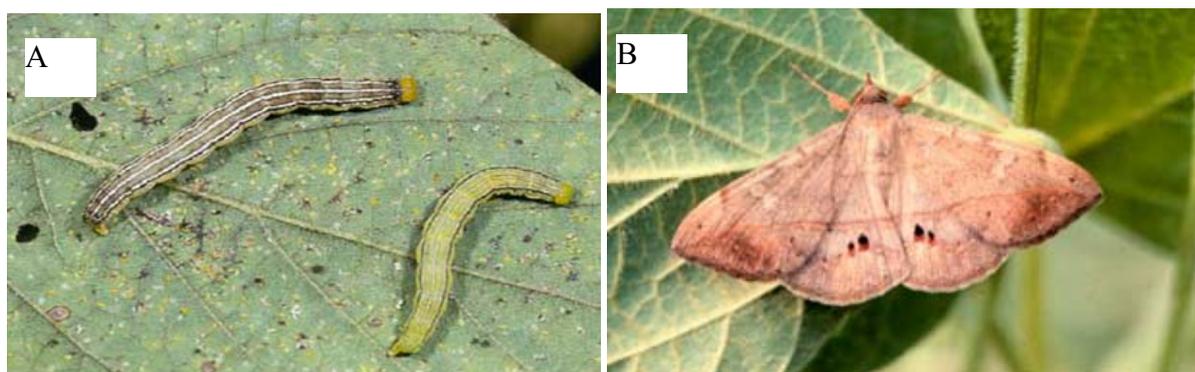


Figura 7: Inseto-praga desfolhador da soja, *Anticarsia gemmatalis*. (A) Larvas (Barbara, 2000); (B) inseto adulto. (Fonte: www.gaipm.org).

De acordo com Moscardi (1999), o uso do baculovirus como agente pesticida é vantajoso pela possibilidade de sua produção em larga escala no campo, por custos baixos em relação aos pesticidas químicos, pela grande capacidade de recuperação da soja à desfolha e pela não ocorrência simultânea de outras pragas importantes na cultura. A economia anual, com base na área de soja total tratada com vírus, é acima de

onze milhões de dólares. Além disso, desde o início do programa, dezessete milhões de litros de inseticidas químicos deixaram de ser aplicados no campo, trazendo um considerável benefício ambiental (Moscardi *et al.*, 2002).

Um programa Piloto para a aplicação de baculovirus para controle da lagarta da soja foi implementado, no início da década de 80, pela Embrapa Soja (Londrina, PR). O vírus começou a ser obtido por multiplicação em lagartas em casas de vegetação e campos de soja. As etapas de produção, implementação e a evolução do uso de AgMNPV no Brasil estão descritas em detalhes por Moscardi *et al.* (2002). Em meados da década de 90, o emprego do bioinseticida Baculovirus anticarsia atingiu, de forma notável, um milhão de hectares.

A partir de 1999, a produção no campo não foi suficiente para atender a demanda que chegou a atingir dois milhões de hectares. Entretanto, recentemente houve um decréscimo pela demanda do bioinseticida para cerca de 1,2 milhões de hectares (Moscardi, comunicação pessoal). No entanto, o uso do baculovirus anticarsia como bioinseticida continua a ser o maior programa do mundo com pesticida viral e serve de exemplo para a implementação de programas a base de vírus para o controle de outras pragas agrícolas.

2. Objetivos

Embora os genes *pif* pertençam ao núcleo dos 29 genes presentes nos *Nucleopolyhedrovirus* já seqüenciados (Herniou *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2005), somente recentemente eles tiveram sua função determinada por estarem presentes nas partículas ODV e serem essenciais para infecção *per os* do inseto (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003, Simón *et al.*, 2004; Ohkawa *et al.*, 2005).

O estudo de genes de virulência é de grande interesse para a construção de bioinseticidas com características de patogenicidade melhoradas.

Nesse contexto o maior conhecimento sobre os genes *pif* poderá ser utilizado em estratégias visando aumentar a mortalidade do inseto alvo como também ampliar o espectro de hospedeiros. Devido à grande amplitude no uso do bioinseticida Baculovirus anticarsia para controle da lagarta da soja, os genes *pif* de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* serão estudados. Recentemente foi feito o seqüenciamento completo do genoma do vírus AgMNPV (Oliveira *et al.*, 2006) sendo a presença dos genes *pif-1* e *pif-2* confirmada na seqüência do genoma.

Neste trabalho procurou-se investigar a presença de mutantes defectivos com alterações na região dos genes essenciais para infecção primária, genes *pif*, em uma população heterogênea de AgMNPV. Sob esse mesmo enfoque buscou-se construir um baculovirus recombinante com interrupção do gene *pif-1*.

2.1. Objetivos Específicos

- Purificar genótipos heterogêneos derivados do baculovirus de campo AgMNPV-79;
- Investigar a presença/ausência dos genes *pif-1* e *pif-2* na população de clones purificados;
- Analisar a virulência dos genótipos purificados;
- Identificar a ORF relativa ao gene *pif-3* e investigar sua presença na população viral
- Construir um vírus recombinante de AgMNPV com interrupção do gene *pif-1* para análise de sua função

3. Materiais e Métodos

3.1. Vírus

Os vírus utilizados foram:

- **AgMNPV-79** _ Isolado selvagem de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* cedido pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja, Londrina – PR).
- **AgMNPV-2D** _ Clone viral isolado a partir do vírus selvagem AgMNPV-79 pela técnica de *plaque assay* e fornecido pelo Dr. James Maruniak, University of Florida-USA.
- **AgMNPV-Londrina** _ Clones virais (AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37) derivados do isolado selvagem AgMNPV-79, purificados pela técnica de *plaque-assay* (Sieburth e Maruniak, 1988) e cedidos pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja, Londrina – PR).

3.2. Insetos

Foram utilizadas larvas de *Anticarsia gemmatalis* fornecidas pela Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN e mantidas com dieta artificial (Greene *et al.*, 1976 modificado por Hoffmann-Campo *et al.*, 1985) à temperatura ambiente (25°C).

3.3. Linhagens Celulares de Insetos

A linhagem celular BTI-Tn-5B1-4 – *High Five* (Granados *et al.*, 1994), derivada de *Trichoplusia ni*, foi utilizada para amplificação de BV, infecção *in vitro* e purificação de clones por diluição serial.

3.4. Multiplicação do Vírus Selvagem AgMNPV-79 *in vivo*

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* entre o 2° e 3° instares foram utilizadas para amplificação e obtenção de poliedros. Os ensaios foram feitos em copos plásticos de 50ml (esterilizados em fluxo laminar e luz UV) onde foram colocadas de duas a três lagartas por copo, com dieta artificial (~1cm³) para alimentação das larvas.

A essa dieta foram aplicados 100µl de poliedros (PIB) em H₂O milliQ a uma concentração de 1x10⁷ PIB/ml. Para controle negativo foram aplicados 100µl de H₂O milliQ sobre a dieta artificial, totalizando quatro copos controle e 20 copos para cada clone viral. As lagartas foram mantidas em estufa, modelo 347-CDG (FANEM) – B.O.D., a uma temperatura de 27°C, fotoperíodo de 14h e umidade relativa de 70%. As lagartas foram monitoradas durante um período de sete dias, sendo coletadas após a morte e armazenadas a -20°C.

3.5. Coleta de Hemolinfa de Lagartas Infectadas

Para a realização desse procedimento, os ensaios foram conduzidos conforme item 3.4, porém utilizando lagartas do 4°/5° instar. Após quatro dias da inoculação, as lagartas com sinais de infecção foram anestesiadas (em gelo por cerca de 2min) e tiveram seu último par de patas cortado com tesoura cirúrgica.

A cada 500µl de hemolinfa coletada foram adicionados 450µl de meio TNMFH (Hink, 1970) sem soro e 50µl da solução de cisteína 0,1M para impedir a oxidação do material. O material foi esterilizado por filtração utilizando filtro Millipore 0,45µm e estocado a -20°C.

3.6. Purificação de Clones de AgMNPV-79 por Diluição Serial

Para a obtenção de clones virais puros foi utilizada a técnica de diluição serial modificada de O'Reilly *et al* (1992), a partir da hemolinfa da lagarta de *A. gemmatalis* infectada com o isolado selvagem AgMNPV-79. Inicialmente, a hemolinfa contendo BV do vírus foi submetida a um série de diluições utilizando-se placas de cultura (24 poços). Em cada poço foram colocados 150µl de meio TNMFH completo e 16,6µl do vírus que foram sendo passados de um poço para o outro, obtendo diluições seriais de 10^{-1} a 10^{-8} . As células foram contadas com a ajuda de um hemacitômetro e foram diluídas (1×10^5 células/ml) em meio TNMFH complementado com soro bovino fetal estéril (GIBCO BRL) inativado a 60°C/30 min., livre de micoplasma, em uma concentração final de 10% e com adição de antibiótico e antimicótico (GIBCO BRL). Aos poços com as diluições do vírus foram acrescentados 1350µl da suspensão de células sendo homogeneizadas e transferidas para placas de cultura com 96 poços iniciando com a diluição viral mais baixa (10^{-1}). Após quatro dias de infecção os poços foram visualizados sob microscópio de luz e onde havia pelo menos uma a duas células com poliedros em seu interior o sobrenadante foi coletado. Para cada poço coletado foram feitas mais duas diluições seriais em triplicata até os clones serem purificados.

3.7. Multiplicação de Clones Virais *in vitro*

Os *budded virus* (BV) de cada clone viral foram amplificados em cultura de células Tn-5BI-4 (*High five*) de acordo com O'Reilly *et al*, 1992. As células foram crescidas em frascos T-25 (Corning) com meio TNMFH completo a uma concentração de 1×10^6 células/frasco. O sobrenadante foi retirado e 1ml de hemolinfa diluída 1:8 (hemolinfa : meio/cisteína) foi adicionado ficando em contato com as células por uma hora com agitação leve de 10 em 10 min. Após o período de adsorção, o inóculo foi retirado e foi acrescentado meio TNMFH completo e as células foram incubadas em estufa (Stabil-Therm _ Blue M) a 27°C. As células foram coletadas com 72h pós-infecção por centrifugação a 3000rpm/5 min./4°C (centrífuga IEC Centra® MP4Rpor). O precipitado celular foi armazenado a -20°C e o sobrenadante a 4°C.

3.8. Infecção de Lagartas por BV - Injeção Intrahemocélica

Para esse experimento foram utilizados os BV dos sobrenadantes das células infectadas com cada clone viral. Para os controles foi utilizada injeção de H₂O destilada. Foram utilizados copos plásticos de 50ml com dieta artificial (~3cm³) para alimentação das larvas (4^o/5^o instar). As lagartas foram infectadas com cerca de 10µl do vírus por meio de injeção direta na hemocele, utilizando-se uma micro-seringa com agulha de 8mm x 0,3mm. Após injeção, as lagartas foram mantidas em incubadora e monitoradas durante um período de cinco dias até a morte, onde foram coletadas e armazenadas a -20°C.

3.9. Purificação Parcial de Partículas Virais

A purificação parcial de poliedros foi feita seguindo o protocolo de Maruniak, 1986. Inicialmente, a partir das lagartas infectadas por BV dos clones e do isolado selvagem, foi obtido um macerado com tampão de homogeneização (Ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris-HCl 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M). Em seguida, o macerado foi filtrado em gaze e o líquido obtido foi submetido a uma centrifugação de 10000 e outra de 12000 rpm (Sorvall - rotor SS 34), onde o sobrenadante obtido em cada etapa foi descartado e o precipitado ressuspensão em 5ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Ao final, os poliedros semi-purificados foram ressuspensos em H₂O milliQ e armazenados a -20°C.

3.10. Extração de DNA de Vírus Não Ocluídos (BV)

Para extração de DNA a partir dos BV estocados das multiplicações virais em cultura de células, foram utilizados 30ml dos sobrenadantes de cada clone viral e do isolado selvagem de acordo com os protocolos descritos por O'Reilly *et al*, 1992. Os sobrenadantes foram colocados em tubos de centrífuga de 30ml e no fundo de cada tubo foram aplicados 3 ml de sacarose 25% (Sacarose 25g; NaCl 5mM; EDTA 10mM). Os tubos foram submetidos à ultracentrifugação (SORVAL rotor SW28) a 24000rpm/4°C/75min. Ao sedimento foram acrescentados 200µl de tampão de disrupção (Tris HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0; SDS 0,25%) e 25µl de proteinase K (20mg/ml), deixando as amostras a 37°C/14h. Para extração do DNA, as amostras foram submetidas a ciclos de extração com fenol, fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Para precipitação foi usado etanol absoluto (2,5x do volume da amostra) e 10% de NaAc (3M; pH 5,2), ficando a -20°C/14h. As amostras foram submetidas à centrifugação por 12000rpm/30

min., lavadas com etanol 70% e o DNA resuspenso em 20µl de tampão TE e armazenado a 4°C.

3.11. PCR dos Genes *pif-1* e *pif-2* a partir de DNA Viral

Os oligonucleotídeos (*primers*) foram desenhados com base na seqüência genômica do vírus AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006) disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov (DQ813662 – GenBank) e foram sintetizados pela Invitrogen (Tabela 1).

Tabela 11: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *pif-1* e *pif-2*, e a localização desses e dos respectivos genes no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006).

AgMNPV-2D	Gene (tamanho)	Nome e posição* (nt)	Seqüência (5'>3')
ORF ag117 (99.551>101.146 nt)	<i>pif-1</i> (1596pb)	AgMNPV-pif1-3'F (99.345)	TCA.AGA.ATG.TAC.CCT.GAA.G
		AgMNPV-pif1-5'R (101.433)	CTC.CAC.TAC.TTG.AGC.CAC
ORF ag12 (8.381<9.529 nt)	<i>pif-2</i> (1148pb)	AgMNPV-Fwdpif2 (8.585)	CGT.GTT.TAC.GCA.TTC.AAC
		AgMNPV-Revpif2 (9.449)	CAT.CAA.GCT.TAT.CAG.CAC

* Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

Foram desenhados *primers* externos à região do gene *pif-1*. Já para os genes *pif-2* os *primers* foram desenhados internamente aos genes. Para multiplicar a região codificadora dos genes utilizou-se a técnica “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Os sistemas foram feitos com H₂O milliQ estéril, contendo as concentrações finais de: 20 ng de DNA molde dos clones virais, 0,4µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 0,02mM de MgCl₂, 5U da enzima *Taq* Polimerase (PHT) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50µl. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA foram realizados de acordo com Tabela 2.

Tabela 12: Programas de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA dos genes *pif* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 1min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
PIF-1	94°	55°	72°/1min.	30	2116
PIF-2		51°			896

* Todos os programas de PCR iniciaram com uma temperatura de 94°C/3min e terminaram a 72°C/10min.

3.12. Eletroforese em Gel de Agarose

Os géis foram preparados em uma concentração de 0,8% de agarose em tampão de corrida TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M e EDTA 0,01M) contendo brometo de etídeo 0,3 µg/ml de acordo com Sambrook *et al.*, 1989. As amostras com tampão de amostra para DNA (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficoll 15%) em uma concentração final de 1X foram colocadas nos poços e submetidas à eletroforese com voltagem constante de 80V. Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados.

3.13. Ensaio de Virulência com Larvas de *Anticarsia gemmatalis*

Para realização dos ensaios de virulência, poliedros derivados de larvas infectadas com os clones virais foram purificados de acordo com o item 3.9. Os bioensaios foram feitos com o vírus selvagem AgMNPV-79, o clone viral AgMNPV-2D, os clones purificados por *plaque assay* (AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37) e com quatro clones selecionados por diluição serial. Para facilitar a realização dos bioensaios esses clones foram divididos em 2 grupos, Grupo A e Grupo B, respectivamente.

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* entre o 2° e 3° instares foram utilizadas para a realização do ensaio de virulência. Foram utilizados seis tratamentos, com duas repetições para cada clone viral, nas seguintes concentrações, com fator de diluição 3X:

4,8x10⁴; 1,6x10⁴; 5,4x10³; 1,8x10³; 6,0x10² e 2,0x10²OB/ml. Cada tratamento consistiu de 60 larvas, sendo distribuídas três larvas por copo de 50ml contendo 5ml de dieta artificial preparada sem conservantes e com adição da diluição viral. Nos controles não houve incorporação de vírus na dieta. As larvas foram mantidas em incubadora B.O.D., com temperatura entre 27°C a 28°C e fotoperíodo de 14h. Para avaliação da mortalidade, foram feitas observações diárias das larvas, a partir do quarto dia após a inoculação até o estágio de pupa. Ao final dos bioensaios os dados foram analisados pelo programa MicroProbit 3.0 (análise de Probit – Finney, 1978) para determinação da CL₅₀ – concentração letal média (concentração de vírus capaz de matar 50% dos insetos testados em bioensaio) e da TL₅₀ – tempo letal médio (tempo que leva para o vírus matar 50 % dos insetos testados em bioensaio). Outro parâmetro determinado foi o TM – tempo médio de morte (média do tempo necessário para que os insetos testados em um bioensaio morram) pela fórmula descrita por Morales *et al.* (2001), onde D é o dia de avaliação e N é o número de larvas mortas pelo vírus nesse dia:

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

3.14. Análise de Restrição dos Clones Virais

Amostras de DNA dos clones virais e do isolado selvagem foram clivadas com as enzimas de restrição *PstI* (Jena Bioscience) e *HindIII* (Pharmacia). O sistema de digestão consistiu de um volume final de 30µl contendo: 1µg de DNA, 3µl do tampão correspondente (10x) e 1µl de enzima (10U). O sistema foi incubado por ~3h/37°C.

3.15. Identificação da ORF do gene *pif-3* de AgMNPV

Para identificação da possível ORF de AgMNPV correspondente ao gene *pif-3*, a seqüência elucidada recentemente (Ohkawa *et al.*, 2005) do gene *pif-3* (ORF 115) do vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (Ohkawa *et al.*, 2005) foi obtida no banco de dados do GenBank disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov e alinhada com o genoma do vírus AgMNPV-2D utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Foram desenhados *primers* internos, específicos à região relativa ao gene *pif-3* com base na seqüência obtida no BLASTx (Tabela 3).

Tabela 13: Seqüência dos primers utilizados para amplificação do gene *pif-3* e a localização desses no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006).

Gene (tamanho)	Nome e posição* (nt)	Seqüência (5'>3')
<i>pif-3</i> (611pb)	AgMNPV-Fwdpif3 (98.057)	AAC.AGC.ATC.TTG.TCG.TA
	AgMNPV-Revpi3 (98.528)	TTG.ATC.GTG.TAC.GTT.TC

* Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

Para amplificar a região de *pif-3* foi utilizada a técnica de PCR e reações como descrito no item 3.11. O programa para amplificação do fragmento de DNA foi realizado de acordo com Tabela 4.

Tabela 14: Programas de PCR para a amplificação do fragmento de DNA do gene *pif-3* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 1min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
Pif-3	94°	48°	72°/1min.	30	488

* Todos os programas de PCR iniciaram com uma temperatura de 94°C/3min e terminaram a 72°C/10min.

3.16. Construção do Baculovirus Recombinante com Deleção do Gene *pif-1*

3.16.1. Bactérias

A linhagem mutante de *E. coli* DH5 α foi utilizada para transformação e amplificação de plasmídeos.

3.16.2. Plasmídeos

O plasmídeo pGEM[®]-TEasy Vector Systems (Promega) foi utilizado para clonagem dos fragmentos a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) ao gene *pif-1*. Foi utilizado também o plasmídeo pUC10GFP de onde foi liberado o gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*) com o promotor constitutivo *hsp70* de *D. melanogaster*, para inserção no pGEM durante o ensaio de deleção (*knock-out*) (Tabela 5).

Tabela 15: Relação dos plasmídeos construídos e utilizados para o ensaio de deleção do gene *pif-1*.

Plasmídeos	Plasmídeos (abreviaturas)	Tamanho (pb)	Construção plasmidial
pGEM-T Easy	pGEM	3015	Plasmídeo da Promega [®] .
pUC10GFP	pUCGFP	6040	Plasmídeo cedido pelo Dr. Bergmann Ribeiro com a sequência do gene <i>gfp</i> e com o promotor constitutivo <i>hsp70</i> de <i>D. melanogaster</i> .
pGEMU $ppif-1$	pGEMUp	4570	pGEM + região a montante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV-2D.
pGEMU $ppif-1GFP$	pGEMUpGFP	6370	pGEM + região a montante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV-2D + promotor <i>hsp70</i> e gene <i>gfp</i> .
pGEMD $wpif-1$	pGEMDw	4646	pGEM + região a jusante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV-2D.
pGEMUpGFPD $wpif-1$	pGEMUpGFPDw	8001	pGEM + região a montante ao gene <i>pif-1</i> de AgMNPV-2D + promotor <i>hsp70</i> e gene <i>gfp</i> + região a jusante ao gene <i>pif-1</i> .

3.16.3. PCR da região a montante ao gene *pif-1*

Os *primers* para a região a montante ao gene *pif-1* (Figura 8) foram desenhados com base na seqüência genômica do vírus AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006) disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov (DQ813662 – GenBank) e foram sintetizados pela Invitrogen. A região amplificada pelo par de *primer* compreende a região promotora ao gene com ~1,5Kb.



Figura 8: Seqüência da região a montante ao gene *pif-1*. Ilustração da localização dos *primers* e dos sítios de restrição inseridos e presentes na seqüência.

Para amplificação da região a montante ao gene *pif-1* foi desenhado um par de *primers* que abrangiam a região a montante (*upstream*) ao gene de acordo com a Tabela 6. Os *primers* direto e reverso para a região a montante do gene anelam-se a 1136pb antes do códon de iniciação da transcrição (ATG) e 419pb após o códon, respectivamente.

Tabela 16: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região a montante ao gene *pif-1* e a localização no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (Oliveira *et al*, 2006).

AgMNPV-2D	Gene	Nome e Posição* (nt)	Seqüência (5'>3')	Sítios de Restrição
ORF 117 (99.551>101.14 6nt)	Região a montante (<i>upstream</i>) ao gene <i>pif-1</i>	Uppif-Fw (98.418)	ACG.CAC.AAT.CCA.CAC.CT -1136nt**	—
		Uppif-R (99.954)	<u>GGA.TCC.GTT.TTG.GCA.AGC.A4</u> 419nt**	<i>Bam</i> HI

*Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

**Posição do *primer* relativa ao códon (ATG) de iniciação da transcrição do gene.

O produto esperado da amplificação por PCR é de 1555pb com um sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI (1547pb) como mostra a Figura 9.

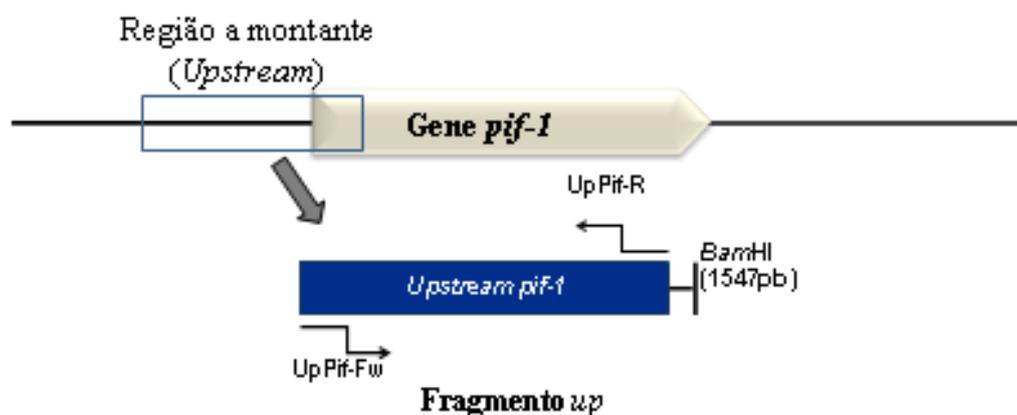


Figura 5: Esquema de amplificação por PCR da região a montante ao gene *pif-1*. Indicação da região de amplificação do fragmento *up*, localização do sítio de clivagem inserido para a enzima *Bam*HI e nome dos *primers* direto e reverso (UpPif-Fw e UpPif-R).

Os sistemas foram feitos com H₂O milliQ estéril, contendo as concentrações finais de: 20ng de DNA molde dos clones virais, 0,4μM de cada *primer*; 0,1mM de cada dNTP; 4mM de MgCl₂; 5U da enzima Taq polimerase (PHT); e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50μl. A amplificação dos genes foi realizada de acordo com a Tabela 7.

Tabela 17: Programa de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA da região a montante ao gene *pif-1* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 40 s. (°C)	Anelamento 40 s. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
Knockout - Up	94°	56°	72°/1min.	30	1555

* O programa de PCR iniciou com uma temperatura de 94°/3min e terminou a 72°/10min.

3.16.4. Clonagem do fragmento da região a montante (*upstream*) ao gene *pif-1*

Para a realização da clonagem, a região a montante (*up*) do gene *pif-1* foi amplificada por PCR usando *primers* específicos à região. O fragmento *up* foi isolado em gel de baixo ponto de fusão 0,8% (*Low Melting Point* - Seakem), purificado pelo kit GFX™ (GE Healthcare) de acordo com o protocolo e reagentes especificados pelo fabricante. O plasmídeo pGEM T-Easy® (Promega) foi utilizado como vetor para a reação de ligação onde foi utilizada uma proporção de 3:1 do fragmento *up* para o plasmídeo, a uma concentração de DNA do inserto por volta de 300ng em um volume final de ligação de 15µl. A incubação foi feita com 150U/µl da enzima T4 DNA Ligase (Jena Bioscience) a 16°C por 12h.

Para a transformação em células competentes de *E. coli* DH5α foram utilizados 5µl do sistema final de ligação. O plaqueamento foi feito em meio LB-ágar seletivo (ampicilina–100µg/ml; x-gal–25µg/ml e IPTG–20µg/ml) onde foram obtidas várias colônias brancas que foram crescidas em meio LB líquido com ampicilina. Para extração de DNA plasmideal foi utilizado o método por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1982) onde o sedimento de 1,5ml de células transformadas foi tratado com 100µl de Solução I (Glicose 50mM; Tris-HCl 25mM, pH 8,0; EDTA 10mM), 200µl de Solução II (NaOH 0,2M; SDS 1%) e 150µl de Solução III (Acetato de potássio 5M; Ácido

acético glacial 11,5ml). O sobrenadante foi submetido a ciclos de extração com fenol e precipitação com etanol conforme descrito no item 3.10. Os DNA das colônias foram ressuspendidos em 30µl de tampão TE.

Para confirmação da ligação e orientação do plasmídeo obtido (pGEM*Up*), o DNA plasmídeo foi submetido à clivagem com as enzimas de restrição *Sac*II (Amersham Biosciences), *Eco*RI (GIBCO) e *Bam*HI (Invitrogen). O sítio de restrição de *Sac*II está localizado dentro do pGEM (sítio na base 49) e o sítio para *Bam*HI está localizado na região interna ao fragmento *up* (sítio na base 1547 em relação ao fragmento). A digestão foi feita primeiramente com 15U da enzima *Sac*II, 450ng do DNA plasmídeo com inserto *up*, 1x do tampão *one-phor-all* (Pharmacia) em um volume final de 15µl, incubada a 37°C/2h. Uma alíquota de 6µl dessa digestão foi coletada uma hora após a clivagem para visualização em gel de agarose 0,8% e ao restante foram acrescentadas 10U da enzima *Bam*HI permanecendo a 37°C/2h e visualizado em gel de agarose 0,8%.

3.16.5. Defosforilação do plasmídeo pGEM*Up*

A reação de defosforilação foi feita com 1µg do DNA de pGEM*Up* digerido com 10U da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 5µl da enzima CIP (Alkaline Phosphatase, 0,01U/µl - Promega) e 1x do tampão CIP *reaction buffer* (Promega) em um volume final de 50µl. A reação foi colocada a 37°C e após 30min foram adicionados mais 5µl da enzima e mantida a incubação por mais 30min. O material foi submetido a ciclos de extração com fenol: clorofórmio, precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e 0,5 volume de NH₄Ac (7,5M), seguindo instruções do fabricante. O DNA foi estocado em tampão TE a 4°C.

3.16.6. Liberação e clonagem do gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*) no plasmídeo pGEMUp.

Para clonagem do *gfp* ao plasmídeo contendo o fragmento *up*, foi feita a digestão do plasmídeo pUC10GFP para liberação do promotor *hsp70* e o gene *gfp* (total de 1800pb) com 10U da enzima *Bam*HI. A digestão consistiu de 2,5µg do DNA plasmideal, tampão da enzima React3 10X (Invitrogen) para um volume final de 70µl, e incubação a 37°C/3h. Todo o sistema foi aplicado em gel de baixo ponto de fusão e fragmento correspondente ao *hsp70+gfp* foi cortado. A purificação do fragmento e a reação de ligação do plasmídeo pGEMUp defosforilado e o fragmento correspondente ao promotor *hsp70* e o gene *gfp* foram feitos como descrito no item 3.17.4.

A transformação com cloreto de cálcio/choque térmico em células competentes DH5α foi feita como já descrito (item 3.17.4). O meio utilizado foi o LB-ágar seletivo (ampicilina–100µg/ml) onde as colônias brancas tiveram seus DNA extraídos por mini-preparações plasmidiais e visualizados em gel de agarose 0,8%.

3.16.7. PCR da região a jusante ao gene *pif-1*

Os *primers* (Figura 10) foram desenhados com base na seqüência genômica do vírus AgMNPV-2D (Oliveira *et al*, 2006) disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov (DQ813662 – GenBank) e foram sintetizados pela Invitrogen.



Figura 10: Seqüência da região a jusante ao gene *pif-1*. Ilustração da localização dos *primers* e dos sítios de restrição inseridos e presentes na seqüência.

Para amplificação da região a jusante ao gene *pif-1* foi desenhado um par de *primers* que abrangiam a região a jusante (*downstream*) ao gene de acordo com a Tabela 8. Para a região a jusante ao gene, os *primers* direto e reverso alinham-se 527pb antes do códon de terminação da transcrição e 1104pb após o códon, respectivamente.

Tabela 18: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região a jusante ao gene *pif-1* e a localização no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (Oliveira *et al*, 2006).

AgMNPV-2D	Gene	Nome e Posição* (nt)	Seqüência (5'>3')	Sítios de Restrição
ORF ag117 (99.551>101.146nt)	Região <i>downstream</i> do gene <i>pif-1</i>	Dwpif-Fw (100.673)	CTG.CAG.ACG.TGA.CGG.AAA.T -527nt**	<i>PstI</i>
		Dwpif-Rv (102.229)	CTG.CAG.GTT.CAT.TGT.CGC.GT 1104nt**	<i>PstI</i>

*Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

**Posição do *primer* relativa ao códon (AGT) de terminação da transcrição do gene.

O produto esperado da amplificação é de ~1631pb com dois sítios de clivagem inseridos para a enzima *PstI* (5pb e 1577pb) como mostra a Figura 11.

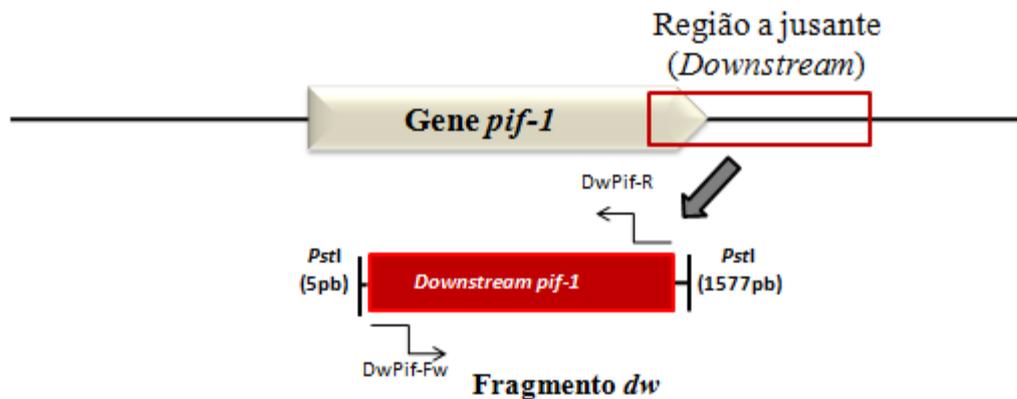


Figura 11: Esquema de amplificação por PCR da região a jusante ao gene *pif-1*. Indicação da região de amplificação do fragmento *dw*, localização do sítio de clivagem inserido para a enzima *PstI* e nome dos *primers* direto e reverso (DwPif-Fw e DwPif-R).

O fragmento foi amplificado pela técnica de PCR conforme descrito no item 3.17.3. A amplificação dos genes foi realizada de acordo com a Tabela 9.

Tabela 19: Programa de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA da região a jusante ao gene *pif-1* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 40 s. (°C)	Anelamento 40 s. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
Knockout – Dw	94°	58°	72°/1min.	30	1631

*O programa de PCR iniciou com uma temperatura de 94°/3min e terminou a 72°/10min.

3.16.8. Clonagem do fragmento da região a jusante (*downstream*) ao gene *pif-1*

Para a realização da clonagem, a região a jusante (*dw*) do gene *pif-1* foi amplificada por PCR usando *primers* específicos à região. O fragmento *dw* foi isolado,

purificado, ligado ao vetor plasmidial pGEM TEasy[®] (Promega) e transformado em células competentes DH5 α como já descrito no item 3.17.4.

O DNA plasmidial obtido por lise alcalina teve sua ligação confirmada por digestão com 10U da enzima *Pst*I (Promega), que está presente nas duas extremidades do inserto. A reação de digestão foi feita com 1 μ g de DNA do plasmídeo pGEMD w , 1x do tampão da enzima, 1x de BSA (Promega) em um volume final de 20 μ l, incubada a 37°C/3 h. Foram também realizadas clivagens com as enzimas *Sac*II e *Eco*RI. O fragmento dw foi isolado e purificado com o kit GFX[™] (GE Healthcare) de acordo com o protocolo e reagentes especificados pelo fabricante.

3.16.9. Clonagem do fragmento a jusante (dw) no plasmídeo pGEMUpGFP

O fragmento dw , clivado com a enzima *Pst*I e eluído, foi ligado ao plasmídeo pGEMUpGFP defosforilado. A transformação foi feita pelo método cloreto de cálcio/choque térmico em células competentes DH5 α como já descrito. O meio utilizado foi o LB-ágar seletivo (ampicilina–100 μ g/ml) onde as colônias brancas tiveram seus DNA extraídos por mini-preparações plasmidiais e visualizados em gel de agarose 0,8%. O plasmídeo originado, pGEMUpGFPD w , foi clivado com as enzimas *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI e *Sac*II para verificar a ligação e orientação do fragmento dw .

3.16.10. Co-transfecção de células de inseto: produção de AgMNPV recombinante

Para produção do vírus AgMNPV com deleção na região do gene *pif-1*, foi utilizado o plasmídeo construído pGEMUpGFPD_w contendo o gene repórter *gfp* sob comando do promotor *hsp70* flanqueados pelas regiões homólogas ao gene *pif-1*. A recombinação ocorre entre o DNA viral e o DNA plasmidial havendo a substituição do gene *pif-1* do vírus pelo gene *gfp* com o promotor *hsp70* do plasmídeo. Células Tn-5B1-4 foram sedimentadas em placa de 60mm em uma concentração final de 2x10⁵ células/poço, completando para um volume final de 2ml de meio TNMFH completo e incubadas a 27°C/4h. As soluções com DNA foram preparadas com meio TNMFH sem soro, 1µg de DNA viral de AgMNPV-2D e 2µg de DNA do plasmídeo pGEMUpGFPD_w. Foram acrescentados a essas soluções 10µl de *Cellfectin* diluída e 90µl de meio TNMFH sem soro, e incubados a temperatura ambiente por 30min. Em seguida, essas soluções com 800µl de meio sem soro foram adicionadas às células. Após 5h de incubação, as células foram lavadas com meio sem soro e TNMFH completo foi acrescentado e novamente as células foram incubadas a 27°C. A partir do terceiro dia de transfecção, as células foram observadas quanto à fluorescência em microscópio óptico Axiovert 135M (Zeiss), utilizando a luz UV como fonte e filtro 1 (FT 395).

3.16.11. Seleção e purificação do vírus recombinante

O vírus recombinante foi selecionado com base na expressão da proteína GFP e na formação de corpos de oclusão. Com este propósito, diluições seriadas (item 3.6)

foram realizadas para purificar o vírus recombinante. Este procedimento foi repetido três vezes para melhor purificação e isolamento do clone viral.

4. Resultados

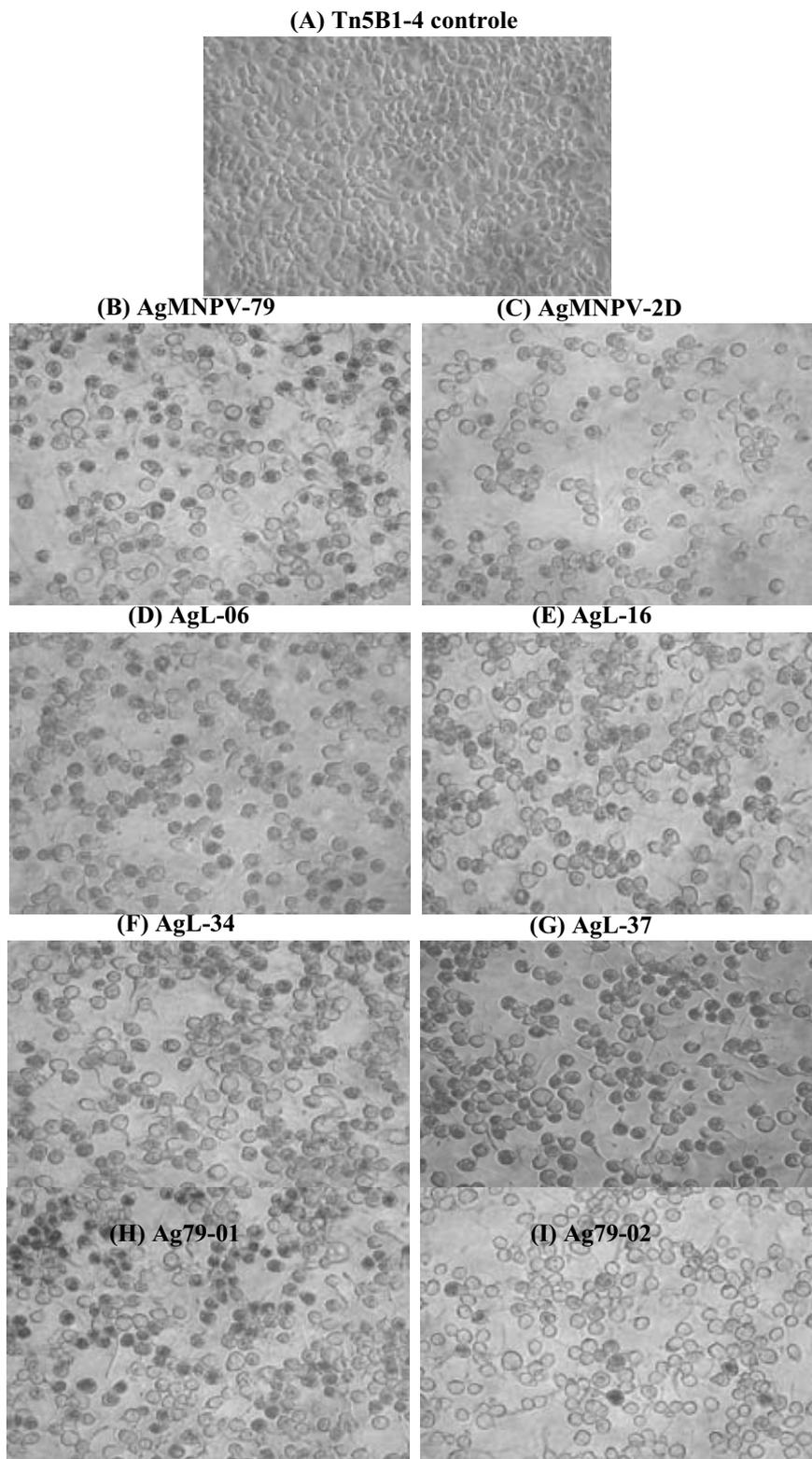
4.1. Seleção de genótipos virais de AgMNPV

Para averiguação da presença de genótipos defectivos de AgMNPV, surgidos espontaneamente, uma população de clones virais foi selecionada a partir do isolado selvagem AgMNPV-79. Esse isolado foi obtido em uma população natural do vírus em Londrina, PR no ano de 1979 e serviu de inóculo viral para aplicação do vírus naquela área. O primeiro grupo de genótipos formado foi com os clones purificados por *plaque assay*, já mencionados em material e métodos – item 3.1. Para aumentar a amostragem da população, o sobrenadante de células infectadas com o isolado AgMNPV-79, contendo as partículas BV, foi submetido a diluições seriadas para isolamento de novos genótipos. A partir de uma série de três purificações consecutivas, 12 genótipos virais foram obtidos. Cada genótipo foi selecionado com base na capacidade de formação de poliedros durante a infecção de células Tn-5B1-4. Partículas BV desses clones virais permitiram sua amplificação em cultura de células sendo, em seguida, injetadas em lagartas *Anticarsia gemmatalis* para produção de poliedros.

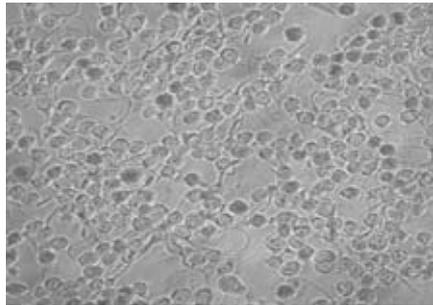
Os genótipos virais, obtidos por diluição serial, foram nomeados: AgMNPV79-01, AgMNPV79-02, AgMNPV79-03, AgMNPV79-04, AgMNPV79-05, AgMNPV79-06, AgMNPV79-07, AgMNPV79-08, AgMNPV79-09, AgMNPV79-10, AgMNPV79-

11 e AgMNPV79-12. O DNA de cada clone viral foi extraído a partir de suas partículas BV.

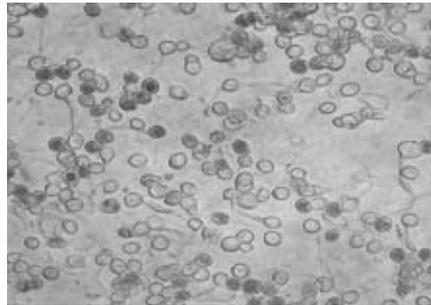
Considerando os genótipos obtidos por *plaque assay*, a população viral em estudo totaliza 18 genótipos (Figura 12) derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. O vírus selvagem AgMNPV-79 e o clone AgMNPV 2D, protótipo do vírus AgMNPV, foram usados como referência neste trabalho.



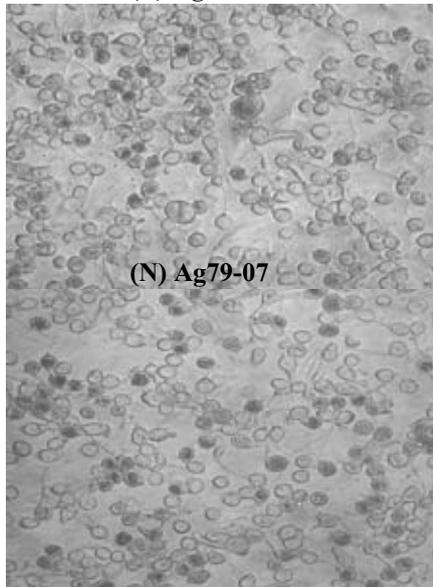
(J) Ag79-03



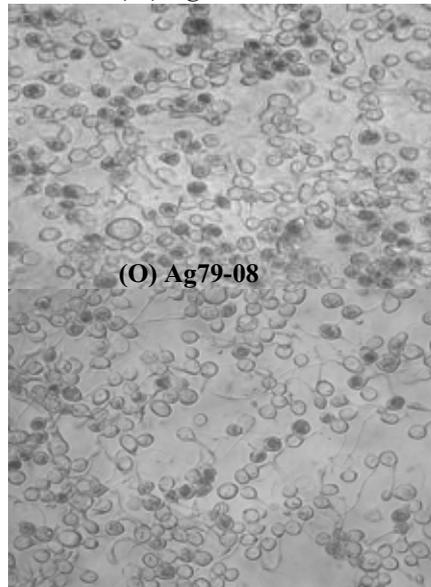
(K) Ag79-04



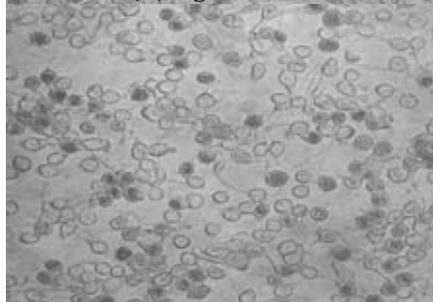
(L) Ag79-05



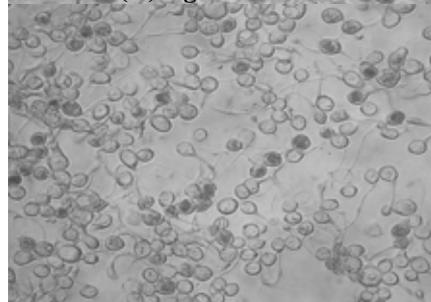
(M) Ag79-06



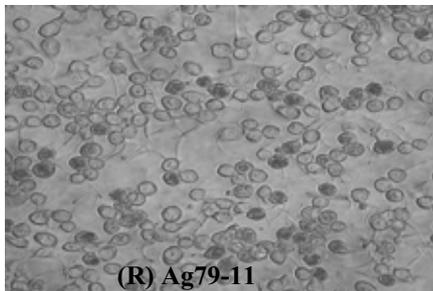
(N) Ag79-07



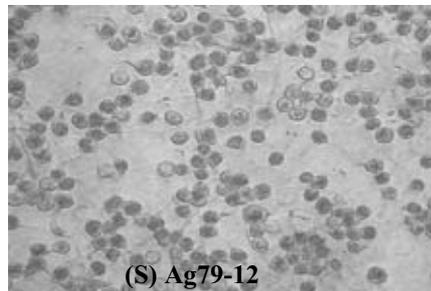
(O) Ag79-08



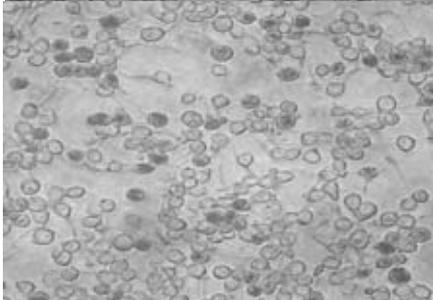
(P) Ag79-09



(Q) Ag79-10



(R) Ag79-11



(S) Ag79-12

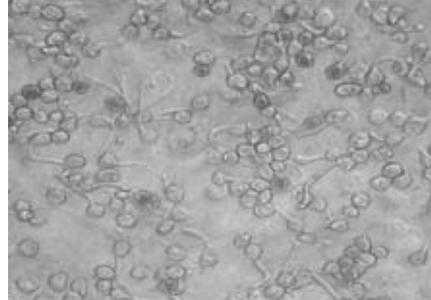


Figura 12: Células Tn5B1-4 infectadas com 18 clones virais derivados do isolado selvagem AgMNPV-79, 48h p.i. As letras indicam o nome de cada clone viral. Microscopia de contraste de fase – aumento 200X, com base nas lentes objetiva e ocular.

4.2. Verificação da heterogeneidade entre os genótipos da população de AgMNPV

Para verificação da heterogeneidade entre os genótipos da população em estudo, foram escolhidos, ao acaso, os seguintes clones para análise do perfil de restrição do DNA: AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37, selecionados por *plaque assay*; Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04, selecionados por diluição serial e o protótipo AgMNPV-2D

Nos perfis obtidos com as enzimas *PstI* (Figura 13) e *HindIII* (Figura 14) verificou-se um polimorfismo no tamanho dos fragmentos presentes em cada genótipo, podendo ser diferenciados entre si por seus perfis de restrição.

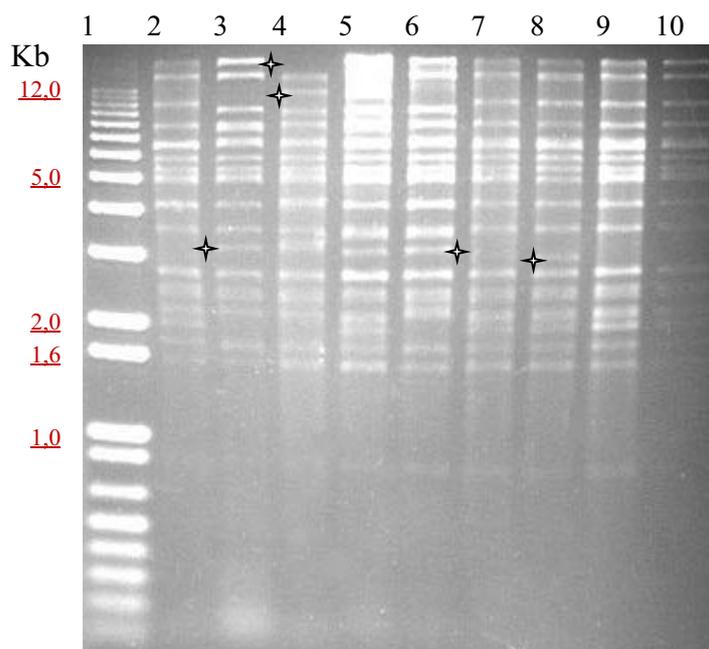


Figura 13: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima *PstI*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. As estrelas indicam a presença de diferentes tamanhos de fragmentos entre os genótipos virais. Amostras: (1) marcador DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen); (2) AgMNPV-2D; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03 e (10) Ag79-04.

A análise do perfil de restrição dos clones virais com enzima *PstI* revelou dois grupos distintos de genótipos, aqueles selecionados por *plaque assay* (Grupo A: AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37) e aqueles selecionados por diluição serial (Grupo B: Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04). Observa-se uma heterogeneidade entre os isolados, sendo que um fragmento de ~3,5Kb está presente apenas nos clones do grupo A diferenciando-os dos clones do grupo B. O clone AgL-16 (Figura 13, poço 4) foi o mais distinto em relação ao primeiro grupo, com ausência do fragmento de mais alto peso molecular e presença de um fragmento de ~12Kb. Os clones do segundo grupo assemelharam-se ao protótipo AgMNPV-2D. No entanto, o clone Ag79-02 (Figura 13, poço 8) apresentou um fragmento extra de ~3Kb, diferenciando-o dos demais.

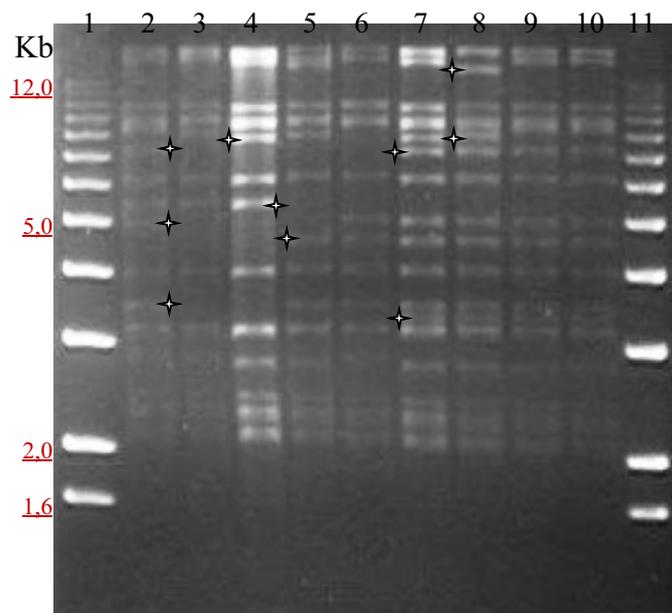


Figura 14: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima *HindIII*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. As estrelas indicam a presença de fragmentos de tamanhos diferentes ao longo do perfil de clivagem dos genótipos virais. Amostras: (2)

AgMNPV-2D; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03, (10) Ag79-04; (1) e (11) marcador DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen).

A análise dos genótipos virais por digestão com a enzima *HindIII* (Figura 14) mostrou novamente heterogeneidade na população. O grupo A apresentou uma maior diversidade de perfil de fragmentação. No grupo B os genótipos foram semelhantes, entretanto os genótipos Ag79-01 (Figura 14, poço 7) e Ag79-02 (Figura 14, poço 8) se distinguiram pela presença de um fragmento extra de ~8Kb. Além disso, o segundo fragmento do genótipo Ag79-02 (*HindIII*-B) apresentou um fragmento de peso molecular mais baixo que os demais. Da mesma forma, um fragmento de ~3,5Kb caracteriza os genótipos do grupo B. O protótipo AgMNPV-2D apresentou perfil de restrição diferente dos demais clones.

4.4. Detecção dos genes *pif-1* e *pif-2* em genótipos de AgMNPV

A verificação de que a maioria dos genótipos da população em estudo é heterogênea e sabendo-se que mutantes defectivos em relação à capacidade de infecção *per os* do inseto podem ser encontrados constituíram uma justificativa para se investigar, a partir de uma população de campo, a presença dos genes *pif-1* e *pif-2* nestes clones. Para isso o DNA extraído dos clones foi submetido a reações de PCR com *primers* específicos para as regiões dos genes *pif-1* e *pif-2*. Para a região de *pif-1* todas as amostras apresentaram amplificação de um fragmento de ~2,1Kb (Figura 15) conforme o esperado.

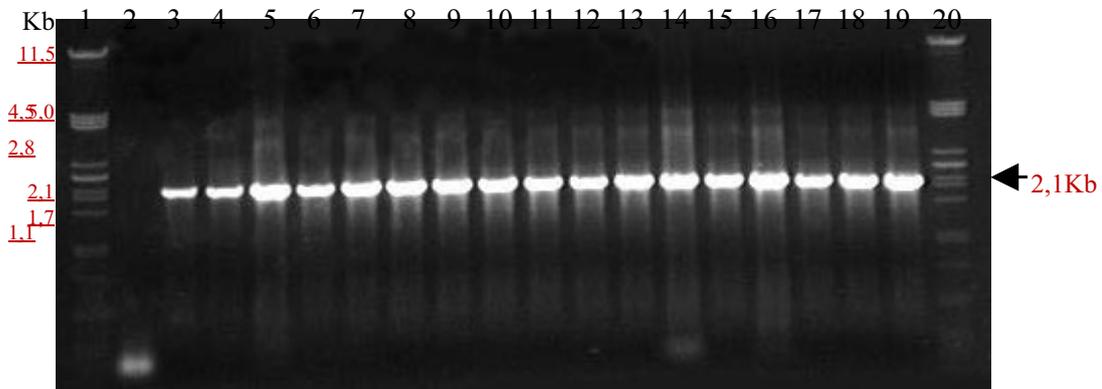


Figura 15: Amplificação do gene *pif-1* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (2) controle negativo (sem DNA molde); (3) AgMNPV-79; (4) AgL-06; (5) AgL-16; (6) AgL-34; (7) AgL-37; (8) Ag79-01; (9) Ag79-02; (10) Ag79-03; (11) Ag79-04; (12) Ag79-05; (13) Ag79-06; (14) Ag79-07; (15) Ag79-08; (16) Ag79-09; (17) Ag-10; (18) Ag79-11; (19) Ag79-12; (1) e (20) marcador DNA fago $\lambda/PstI$.

Da mesma forma, para a região do gene *pif-2* todos os clones também apresentaram amplificação do fragmento esperado de ~800pb (Figura 16).

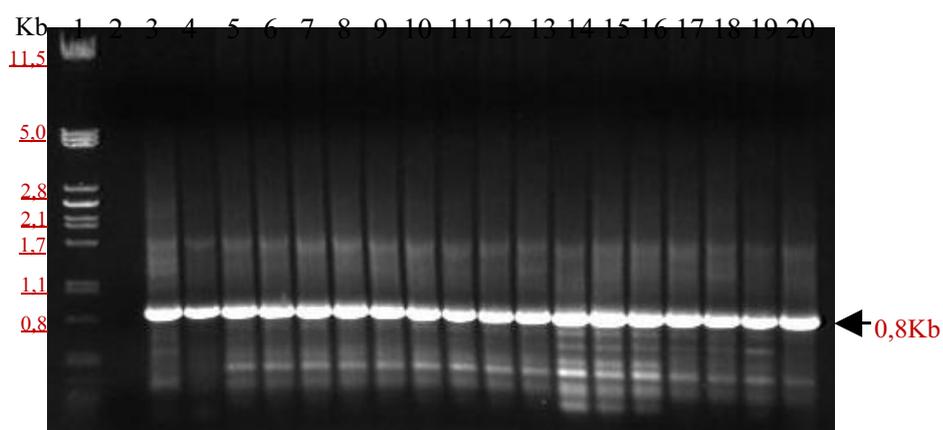


Figura 16: Identificação do gene *pif-2* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador DNA fago $\lambda/PstI$; (2) controle negativo (sem DNA molde); (3) AgMNPV-79; (4) AgMNPV-2D; (5) AgL-06; (6) AgL-16; (7) AgL-34; (8) AgL-37; (9) Ag79-01; (10) Ag79-02; (11) Ag79-03; (12) Ag79-04; (13) Ag79-05; (14) Ag79-06; (15) Ag79-07; (16) Ag79-08; (17) Ag79-09; (18) Ag79-10; (19) Ag79-11; (20) Ag-12.

4.5. Avaliação da virulência dos genótipos de AgMNPV em larvas de *Anticarsia gemmatalis*

Bioensaios foram realizados para avaliar a patogenicidade dos clones virais AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37 (grupo A) e AgMNPV-79-01, 02, 03 e 04 (grupo B) comparada aos vírus selvagem AgMNPV-79 e o clone viral AgMNPV-2D, em larvas de *Anticarsia gemmatalis* com base na determinação da concentração letal média (CL_{50}), tempo letal médio (TL_{50}), tempo de morte (TM) e da taxa de mortalidade (%).

4.5.1. Concentração letal média (CL_{50})

As tabelas 10 e 11 mostram os resultados da concentração letal média e os respectivos intervalos de confiança (95%) calculados usando o programa de análise de Probit. Observa-se que larvas tratadas com diferentes concentrações dos clones AgL do grupo A não houve grandes variações na CL_{50} , ficando a menor com clone AgL-06 com 894 PIB/ml e a maior a do clone AgL-16 com 1301 PIB/ml (Tabela 10). Enquanto que os clones do grupo B apresentaram concentrações letais (CL_{50}) bastante diferentes, variando de 75 PIB/ml (clone AgMNPV79-01) a 463 PIB/ml (clone AgMNPV79-02), o que corresponde afirmar que o primeiro é capaz de matar 50% da população com uma concentração viral cerca de 6x menor do que o segundo clone. Portanto, o clone AgMNPV79-01 constitui-se como o mais virulento dentre os avaliados (Tabela 11). Os vírus AgMNPV-79 e AgMNPV-2D tiveram suas CL_{50} muito próximas, não havendo diferença significativa entre eles.

Tabela 20: Concentração letal média (CL₅₀) dos clones virais (grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus*	CL ₅₀ (PIB/ml)**	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ^2
AgMNPV-79	414	323 – 522	1.62	8.39
AgMNPV-2D	616	468 – 826	1.30	5.16
AgL-06	894	689 – 1185	1.40	2.31
AgL-16	1301	1003 – 1740	1.61	9.24
AgL-34	1061	772 – 1516	1.10	5.09
AgL-37	995	576 – 2011	1.70	12.46

*Concentrações utilizadas para cada clone viral: 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 PIB/ml e H₂O

**CL₅₀: Concentração de poliedros necessária para matar 50% da população de larvas em teste.

Tabela 11: Concentração letal média (CL₅₀) dos clones virais (grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus*	CL ₅₀ (PIB/ml)**	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	X ²
AgMNPV-79	551	232 – 1093	1.61	18.18
AgMNPV-2D	432	262 – 854	2.16	14.15
AgMNPV79-01	75	38 – 124	1.63	9.77
AgMNPV79-02	463	352 – 614	1.27	8.83
AgMNPV79-03	151	69 – 277	1.71	16.07
AgMNPV79-04	277	147 – 503	1.59	13.19

*Concentrações utilizadas para cada clone viral: 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 PIB/ml e H₂O

**CL₅₀: Concentração de poliedros necessária para matar 50% da população de larvas em teste.

4.5.2. Tempo Letal Médio (TL₅₀)

As TL₅₀ dos clones do grupo A, determinadas em relação à concentração de 540PIB/ml, variaram de 10,28 a 11,55 dias, enquanto que na mais alta concentração (4860 PIB/ml) foi de 8,04 a 8,29 dias, o que representa uma redução de cerca de 2 dias no tempo necessário para que 50% da população de insetos testados morram (Tabela 12). Já no grupo B (Tabela 13) há uma notável diferença em relação à concentração de 540PIB/ml do clone Ag79-01 que precisou de ~7 dias para matar 50% da população. Essa média foi a menor em relação aos clones desse grupo e também em relação ao selvagem que precisou de ~10 dias para matar as larvas testadas nessa concentração.

Na maior concentração usada (4860 PIB/ml), essa redução torna-se ainda mais notável, quando se compara as TL₅₀ dos clones dos grupos A e B com as TL₅₀ do vírus selvagem Ag79 (6,15 e 6,81 dias), que juntamente com a do clone Ag79-01 de 6,31 dias, se apresentam como os mais eficazes por matar mais rapidamente as larvas testadas sendo portanto, considerados, com base no tempo letal (TL₅₀), os mais patogênicos dos testados nos bioensaios (tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Tempo letal médio (TL₅₀) dos clones virais (Grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	TL ₅₀ * (dias)	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ ²
AgMNPV-79	540	10,32	9,44 – 11,72	9,01	17,83
	4860	6,81	6,38 – 7,4	36,2	29,2
AgMNPV-2D	540	10,28	9,5 – 11,6	12,12	23,61
	4860	8,29	7,71 – 9,10	13,00	28,07
AgL-06	540	11,5	10,82 – 12,5	8,04	9,8
	4860	8,04	7,58 – 8,61	12,79	10,00
AgL-16	540	11,38	10,32 – 13,53	10,33	18,93
	4860	8,22	7,56 – 9,24	13,14	38,71
AgL-34	540	11,55	10,5 – 13,67	10,2	15,93
	4860	8,19	7,52 – 9,22	13,24	40,17
AgL-37	540	11,44	10,88 – 12,25	10,54	11,6
	4860	8,14	7,59 – 8,91	13,57	28,05

*TL₅₀: Média de tempo em dias necessários para matar 50% da população de larvas em teste.

Tabela 13: Tempo letal médio (TL₅₀) dos clones virais (Grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	TL ₅₀ * (dias)	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ ²
AgMNPV-79	540	10,09	9,26 – 11,39	9,2	18,70
	4860	6,14	5,83 – 6,52	15,53	13,61
AgMNPV-2D	540	9,91	9,54 – 10,35	10,0	9,55
	4860	7,28	6,83 – 7,92	17,28	26,39
Ag79-01	540	7,57	7,13 – 8,16	15,7	22,08
	4860	6,31	6,14 – 6,49	16,20	5,27
Ag79-02	540	10,81	10,28 – 11,51	8,6	10,6
	4860	7,50	7,08 – 8,08	16,09	21,39
Ag79-03	540	8,95	8,29 – 9,87	11,0	23,86
	4860	**	**	**	**
Ag79-04	540	8,89	8,61 – 9,21	11,4	12,03
	4860	**	**	**	**

*TL₅₀: Média de tempo em dias necessários para matar 50% da população de larvas em teste.

**Valores não obtidos.

4.5.3. Tempo Médio de Morte (TM)

Em relação ao Tempo Médio de Morte (TM), o vírus Ag79 (Tabela 14), levou cerca de 8 dias para matar metade das larvas do ensaio em uma concentração de 540 PIB/ml, e cerca de 7 dias para matar todas as lagartas em teste na concentração de 4860 PIB/ml, e cerca de 7 dias para matar todas as lagartas em teste na concentração de 4860 PIB/ml. Com exceção do genótipo AgL-37 que apresentou TM de ~9 e 8 dias, os genótipos na concentração mais baixa avaliada apresentaram ~8 dias com uma mortalidade de ~35% e TM de ~7 a 8 dias com mortalidade com cerca de 80% para a concentração mais alta avaliada.

Tabela 14: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	Número de larvas mortas	Mortalidade (%)	Tempo médio de morte (dias)
AgMNPV-79	540	30	50	8,43
	4860	60	100	7,72
AgMNPV-2D	540	33	55	8,91
	4860	51	85	8,22
AgL-06	540	21	35	8,52
	4860	53	88,3	8,09
AgL-16	540	21	35	8,67
	4860	47	78,3	7,87
AgL-34	540	21	35	8,90
	4860	49	81,6	7,98
AgL-37	540	22	36,6	9,14
	4860	50	83,3	8,00

Já no grupo B (Tabela 15) o clone que apresentou um TM mais baixo (6,8 dias) foi o genótipo Ag79-01 em ambas as concentrações. A mortalidade apresentada na

concentração de 540PIB/ml foi de 93,3% com um TM de 7,8 dias. Na concentração de 4860PIB/ml foi de 100% se igualando ao selvagem Ag-79 que obteve TM e taxa de mortalidade semelhantes para a concentração mais alta (6,7 dias e 100%, respectivamente). O genótipo Ag79-02 foi o que obteve um TM mais alto na concentração mais alta testada (~8 dias) e taxa de mortalidade mais baixa (91,6%). O genótipo Ag79-01 foi o vírus que obteve melhores resultados em relação aos parâmetros testados, apresentado maior virulência.

Tabela 15: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	Número de larvas mortas	Mortalidade (%)	Tempo médio de morte (dias)
AgMNPV-79	540	29	48,3	8,14
	4860	60	100	6,72
AgMNPV-2D	540	37	61,6	8,97
	4860	58	96,6	7,59
AgMNPV79-01	540	56	93,3	7,84
	4860	60	100	6,87
AgMNPV79-02	540	25	41,6	8,48
	4860	55	91,6	7,76
AgMNPV79-03	540	44	73,3	8,32
	4860	60	100	7,58
AgMNPV79-04	540	46	76,6	8,57
	4860	60	100	7,75

4.7. Identificação da ORF do gene *pif-3* de AgMNPV

Em trabalho publicado (Oliveira *et al.*, 2006) sobre o seqüenciamento completo do genoma de vírus AgMNPV-2D, o gene *pif-3* não é relatado. Portanto, para identificação da ORF correspondente ao gene *pif-3* do vírus AgMNPV, a seqüência nucleotídica do gene *pif-3* (ORF 115) do vírus AcMNPV foi obtida no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e em seguida realizada uma análise de BLASTx com o genoma do vírus AgMNPV.

Na análise do alinhamento (Figura 17), a ORF 114 de AgMNPV apresentou similaridade com a seqüência protéica de PIF-3 já relatada para outros baculovirus. A seqüência apresenta regiões de domínios conservados (Figura 17, regiões em vermelho) que estão presentes na seqüência protéica de outros vírus.

⇒	αi 2493249	49	FQR	ARAVDCALNRLPCVTSQQCRDNCVI	[5]	.DLICDNGFCSATNI	[8]	.S	[2]	.ECDPALGLLRVYAAG	121
	AgMNPV	47	FQR	DRGVDCALNRLPCVTDQQCRDNCVI	[5]	.QLNCEAGFCNATNA	[7]	.D	[3]	.DCDPALGLLRIYAAG	119
	gi 81968776	33	FER	[1].NNVIDCDKNRTPCITDAQCRDNCED	[2]	.LMTCEQQGFCGIRVQ	[1]	.E	[2]	.FCDIERGMITVLEAL	96
	gi 81975652	38	FER	DNIVNCEAVPLPCVTDQQCVDNCLS	[2]	.FVRCQQGFCRKYIQ	[7]	.D		.DCDISRGMVMVLTAL	104
	gi 81967726	45	FDR	PPLVNCDETRLPCVSDEQCYENCNS	[5]	.VMHCNQGFCSIRPA	[7]	.D	[2]	.VCDQKLGLIHVFAAS	116
	gi 81981569	46	FER	NGIVNCARTRLPCVRDDQQCRDNCAR	[5]	.EFECEEGFCAIRES	[6]	.D	[2]	.ECDQTRGLLVFAAS	116
	gi 82015432	57	FDR	NGVDCNSTRPCVSDRQCVDNCLI	[5]	.AVVCDNGFCGNRDS	[7]	.D	[2]	.DCDPALGLFKAFVAS	128
	αi 81969465	45	YHQ	NGLVNCSTHRLPCIVTQQCLDNCAS	[5]	.NMECDQGFCTIREA	[7]	.N	[2]	.ECDATKGLIKVFTAS	116
	AcMNPV	49	FQR	NRGVDCSLNRLPCVTDQQCRDNCVI	[5]	.ELTCQDGFCSNASDA	[7]	.D	[2]	.ECDPALGLVHVFSAG	120
	gi 81967074	51	FAG	SQHVDCHNTKLPICIDNADCQRNCAL	[5]	.VSSCIGGFCSSTDHK	[3]	.E	[2]	.NCVEEHGILRVFTAD	118
⇒	αi 2493249	122		[1].DFVVSQTCVSTYRDLVDDTGAARPYLCDAGALRLELDTTFFSADACTCAAGYDKLMFRQTALARTVPVCIPTHAA							197
	AgMNPV	120		[1].DFVVAQTCVSTYRDLVDDTGATRPYLCDDGALQLNLDTTQFSADACTCAVGYDKLMFRQTALARTVPVCIPEHMS							195
	gi 81968776	97		[1].SFVVKETCISTYRDVIDDDSNLRPYVCEGGEMNINLEDGPFAVEDCQCRQGFTRFAYSQGAFSRTIPVCIIPNRLA							172
	gi 81975652	105		[1].TFLIQRMCISLYRDVIDDSDVRPYICDQGEMLVDLENRPFSIADCTCRSGFTKFAYHQGAFARTTTPVCIIPNNLA							180
	gi 81967726	117		EFVVSQLCISTYRDIVDDDNRPYICDGGRLDVDVVERQFTSADCECSVGYTKYTFVQGAFAFARAVPVCIIPNSLA							191
	gi 81981569	117		EFVVTQTCVSVYRDLIDDLGEPYPYLCGEGELDIDLVGRQFSANDRCRCAAGFRKMVFDQTALARSIPVCIIPNSLA							191
	gi 82015432	129		EFVVDQLCISTYRDIVDDDFGEPYPYLCINGALDIDLANRQFTAADCTCSSGYTKMLFNQTALARSIPVCIIPNSK							203
	αi 81969465	117		EFVINQLCISTYRDVDFDDGELRPYICENGTVIDIVLNRPFVTDCECAPGYKRMIFQQTALARTVPVCIIPNTAV							191
	AcMNPV	121		[1].DFVVSQTCVSTYRDLVDDTGTTPRYLCNDGRLNMLNTVQFSPDACDCSSGYEKMLFRQTALARTIPVCIIPNRMA							196
	gi 81967074	119		EFVINQSLSTYRDIPTDDNKLQPYVCTGGQLEINLLEQAFTPDACVCGTGITKYIYRPGYPNRPVCLTKQQA							193
⇒	αi 2493249	198	SLYRRVY	204							
	AgMNPV	196	GLYRRVY	202							
	gi 81968776	173	TIYDRVY	179							
	gi 81975652	181	NLYSRIY	187							
	gi 81967726	192	RIYSRIY	198							
	gi 81981569	192	DVYSRFY	198							
	gi 82015432	204	TIFSKIY	210							
	αi 81969465	192	ALYSKIY	198							
	AcMNPV	197	NLYRRVY	203							
	gi 81967074	194	ALLGRVY	200							

Figura 17: Alinhamento da seqüência protéica da ORF 114 de AgMNPV com seqüências de PIF-3 já conhecidas. As setas apontam a seqüência relativa à ORF 114 de AgMNPV. Figura retirada do site: www.ncbi.nlm.nih.gov

A ORF 114 apresenta 83% de similaridade e 67% de identidade com relação à PIF-3 de AcMNPV (Figura 18). Na análise de BLAST da ORF relativa ao gene *pif-3* de AgMNPV é observada uma maior similaridade de aminoácidos (94%) com a ORF do vírus CfDefNPV. Similaridades nas regiões da ORF 114 de AgMNPV com a ORF 115 (*pif-3*) de AcMNPV sugerem que essa região pode estar envolvida nos processos de estabelecimento da infecção oral.

A ORF 114 foi então identificada como o gene *pif-3* de AgMNPV. Esse gene possui 612 nucleotídeos. Uma ORF de função não conhecida (*ag113*) está a jusante ao gene e a ORF correspondente ao gene *bro-g* (ORF 115) está situada a montante do gene *pif-3*.

```
> [ref|YP_803508.1] [G] hypothetical protein AGNV_gp114 [Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus]
[gb|ABI13897.1] [G] unknown [Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus]
Length=203

GENE ID: 5141122 AGNV_gp114 | hypothetical protein
[Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 275 bits (704), Expect = 9e-73, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 138/204 (67%), Positives = 170/204 (83%), Gaps = 3/204 (1%)

AgMNPV      1  MLNFWQILILLV IILIVMYTFK FVQKFILODAYMHINELEAPPLNFT FQRNRGVDCSLN 60
AcMNPV      1  M  WQ+LILL I+LIVY+ F+FVQ+F+ D M APP++ FQR+RGVDC+LN 58

AgMNPV      61  RLPCVTDQQCRDNCVISSAANELTCQDGF CNA SDALVNAQAPD-LIECDPALGLVHVFS A 119
AcMNPV      59  RLPCVTDQQCRDNCVI+SAA+L C+ GFCNA++AL++AQ PD +I+CDPALGL+ +++A 118

AgMNPV      120 GGDFVVSQTCVSTYRDLVDDTGTPRPYLCNDGRLNMLNTVQFSPDACDCSSGYEKMLFR 179
AcMNPV      119 GGDFVVAQTCVSTYRDLVDDTG RPYLC+DG L +NL+T QFS DAC C+ GY+KMLFR 178

AgMNPV      180 QTALARTIPVCIPNRMANLYRRVY 203
AcMNPV      179 QTALART+PVCIP M+ LYRRVY
QTALARTVPVCIP EHM SGLYRRVY 202
```

Figura 18: Regiões de similaridade e identidade da ORF 114 de AgMNPV e a ORF 115 (*pif-3*) de AcMNPV. Os quadros apontam algumas regiões de similaridade entre as seqüências. Figura retirada do site: www.ncbi.nlm.nih.gov

A partir da identificação da ORF relativa ao gene *pif-3* de AgMNPV, *primers* internos foram desenhados para amplificação desta região pela técnica de PCR. Todos

os clones selecionados neste trabalho tiveram a região amplificada (fragmento de ~488pb) como apresentado na Figura 19.

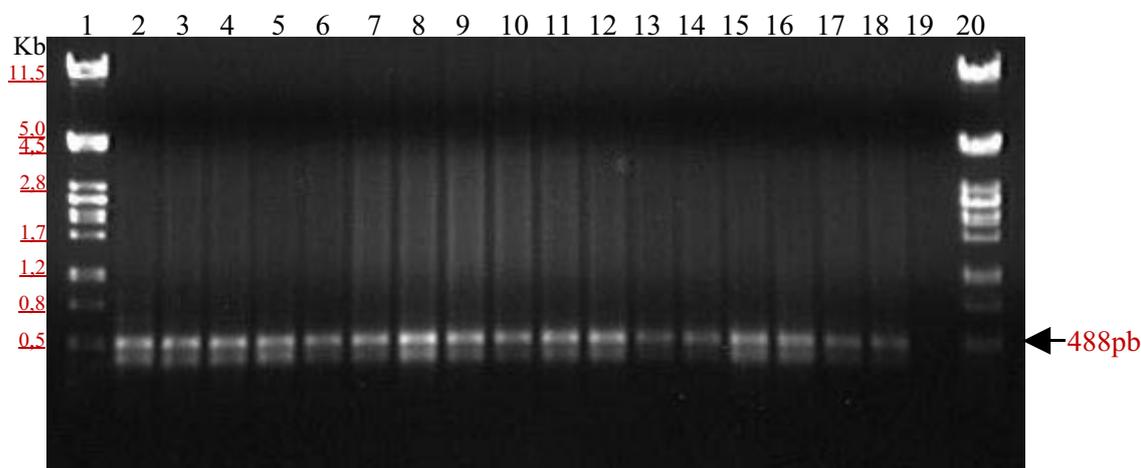


Figura 19: Identificação do gene *pif-3* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (2) AgMNPV-79; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03; (10) Ag79-04; (11) Ag79-05; (12) Ag79-06; (13) Ag79-07; (14) Ag79-08; (15) Ag79-09; (16) Ag79-10; (17) Ag79-11, (18) Ag79-12, (19) controle negativo (sem DNA molde); (1) e (20) marcador DNA fago $\lambda/PstI$

4.6. Construção do baculovirus recombinante vAgGFP Δ pif-1

4.6.1. Construção de plasmídeos contendo as regiões homólogas ao gene *pif-1*

Na população de clones, analisada pela técnica de PCR, todos amplificaram um fragmento com o tamanho esperado, relativo às regiões de *pif-1* e *pif-2*. Diante disso, para dar continuidade ao estudo de análise de função do gene *pif-1* no baculovirus AgMNPV, foram desenhadas estratégias para construção de um vírus recombinante com interrupção desse gene e sua substituição pelo gene repórter *gfp*, através de recombinação homóloga.

Para isso, foram realizadas construções plasmidiais para realização de troca gênica. Um par de *primers* foi sintetizado para amplificação da região a montante ao gene *pif-1*. Na extremidade 5' do fragmento *up* foi inserido um sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI. O fragmento *up* de 1,5Kb (Figura 20) foi então purificado e clonado no vetor pGEM-T-Easy dando origem ao plasmídeo pGEM*Up* (Figura 21). Para confirmação da orientação, digestão dupla foi realizada com as enzimas: *Bam*HI e *Sac*II (Figura 22A – poço 2) as quais liberaram o fragmento *up* (1,5Kb) confirmando a ligação ao vetor na orientação correta. A inserção também foi confirmada por clivagens individuais com as enzimas: *Bam*HI (Figura 22B – poço 2) e *Sac*II (Figura 22B – poço 3), que linearizaram o plasmídeo originando um fragmento de 4,5Kb e *Eco*RI, que liberou o inserto equivalente ao fragmento *up* de 1,5Kb (Figura 22B – poço 4).

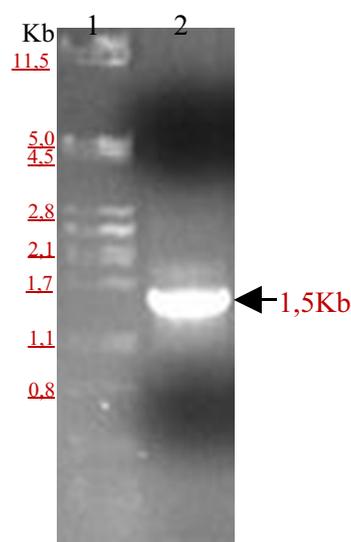


Figura 20: Amplificação por PCR da região a montante ao gene *pif-1*. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador λ /*Pst*I e (2) fragmento *up*

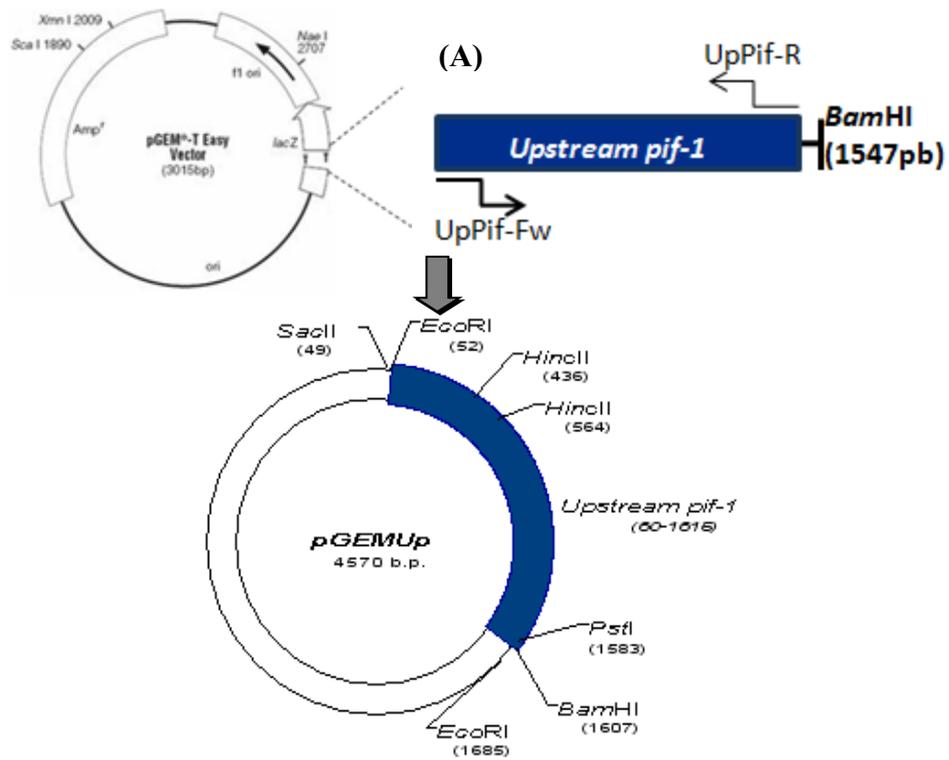


Figura 21: Esquema da clonagem do fragmento *up* no vetor pGEM-T-Easy. (A) Clonagem do fragmento de PCR com a adição do sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI na extremidade 3'; (B) plasmídeo pGEMUp com a região a montante (fragmento *up*) ao gene *pif-1* inserida com os sítios de clivagem do inserto e do vetor.

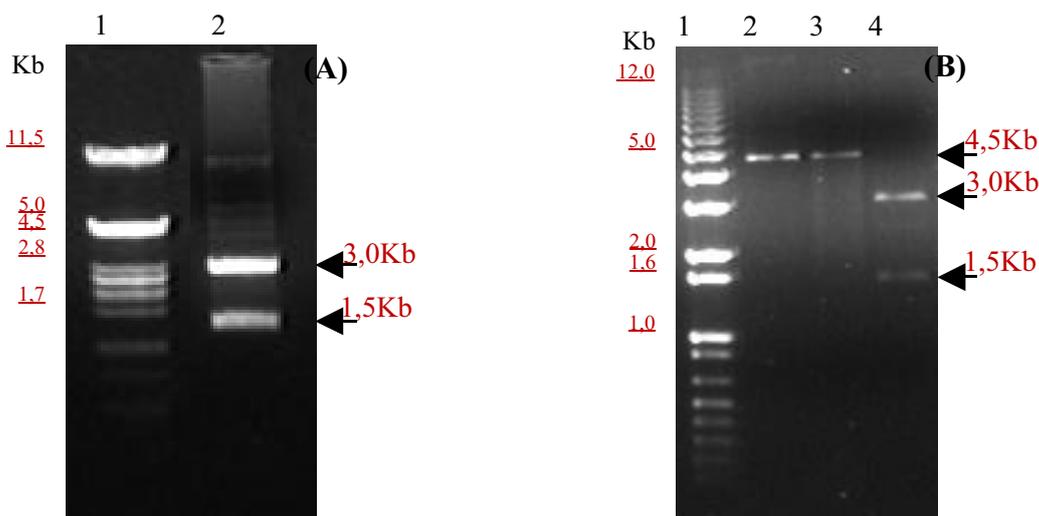


Figura 22: Confirmação da orientação e inserção do fragmento *up* clonado no vetor pGEM-T-Easy. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. (A) Clivagem por dupla digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sac*II para confirmação da orientação do fragmento, o sítio de *Bam*HI do fragmento está do lado oposto ao sítio de *Sac*II do vetor. Amostras: (1) marcador DNA fago λ *Pst*I, (2) DNA plasmidial de pGEM*Up* clivado em reação dupla com as enzimas *Bam*HI e *Sac*II; (B) Confirmação da inserção do fragmento *up* no plasmídeo pGEM por clivagem com enzimas de restrição. Amostras: (1) marcador 1Kb DNA Plus Ladder, (2) DNA de pGEM*Up* clivado com a enzima *Bam*HI, (3) DNA de pGEM*Up* clivado com a enzima *Sac*II, (4) DNA de pGEM*Up* clivado com a enzima *Eco*RI.

Para liberação do cassete contendo o gene repórter *gfp* sob controle do promotor constitutivo *hsp70*, o plasmídeo pUC10GFP foi clivado com a enzima *Bam*HI. Esse cassete foi purificado e clonado no plasmídeo pGEM*Up* defosforilado e clivado também com a mesma enzima. O plasmídeo originado foi o pGEM*Up*GFP (Figura 23). Para verificação da inserção do cassete gênico, esse plasmídeo foi clivado com as enzimas: *Bam*HI (Figura 24 – poço 2), que liberou um fragmento de 1,8Kb referente ao cassete; *Eco*RI (Figura 24 – poço 4), que liberou um fragmento de 3,3Kb referente ao cassete gênico/fragmento *up*; e *Pst*I (Figura 24 – poço 3) que somente linearizou o plasmídeo gerando um fragmento de 6,3Kb.

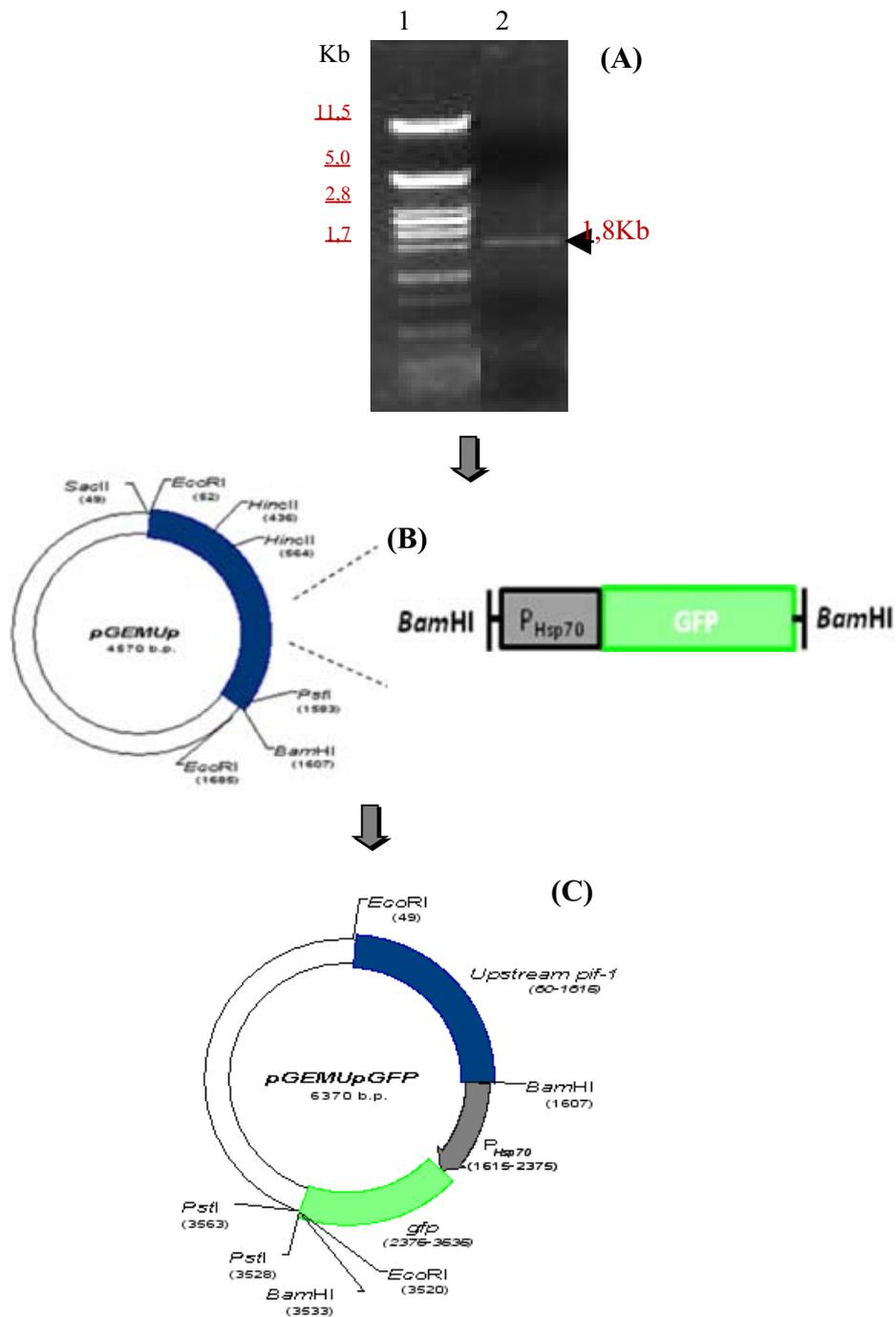


Figura 23: Esquema da construção do plasmídeo pGEMUpGFP. Clonagem do cassete gênico com o gene *gfp* no plasmídeo pGEMUp. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador DNA fago λ /*Pst*I; (2) fragmento relativo ao cassete gênico purificado contendo o promotor *hsp70* e o gene *gfp*; (B) Clonagem do cassete gênico no plasmídeo pGEMUp, ambos clivados com a enzima de restrição *Bam*HI; (C) Plasmídeo pGEMUpGFP e os sítios de clivagem dos insertos e do vetor.

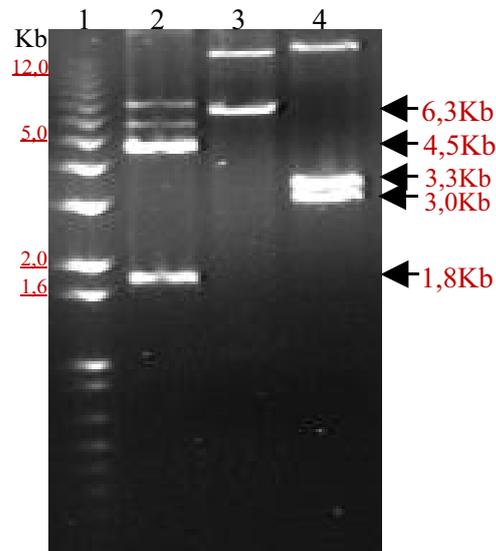


Figura 24: Confirmação da clonagem do cassete gênico *hsp70/gfp* no plasmídeo pGEMUp. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador 1Kb DNA Plus Ladder; (2) DNA de pGEMUpGFP clivado com a enzima *Bam*HI; (3) DNA de pGEMUpGFP clivado com a enzima *Pst*I; (4) DNA de pGEMUpGFP clivado com a enzima *Eco*RI.

Para a região a jusante ao gene *pif-1* um par de *primers* foi sintetizado de forma que em ambas as extremidades do fragmento foram inseridos sítios de clivagem para a enzima *Pst*I. O fragmento obtido de 1,6Kb (Figura 25) foi purificado e clonado no vetor pGEM-T-Easy originando o plasmídeo pGEMD_w (Figura 26). A confirmação da inserção do fragmento foi feita através de clivagens com as enzimas: *Pst*I (Figura 27A – poço 2) que liberou o fragmento de 1,6Kb, também utilizada para liberação do inserto; *Eco*RI (Figura 27B – poço 4) que liberou um fragmento de 1,6Kb correspondente ao *dw*, *Sac*II (Figura 27B – poço 3) a qual possui sítio de clivagem no interior do fragmento e no plasmídeo liberando um fragmento de 400pb e gerou um fragmento visível de 4,2Kb.

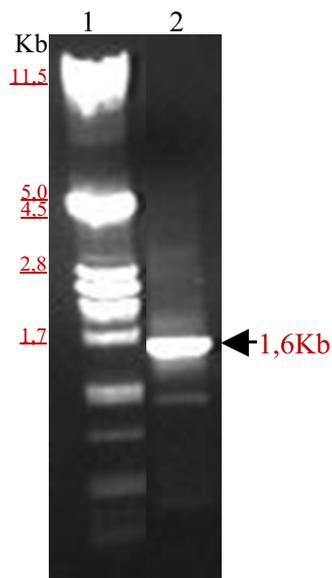


Figura 25: Amplificação por PCR da região a jusante ao gene *pif-1*. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador λ PstI; (2) fragmento *dw*.

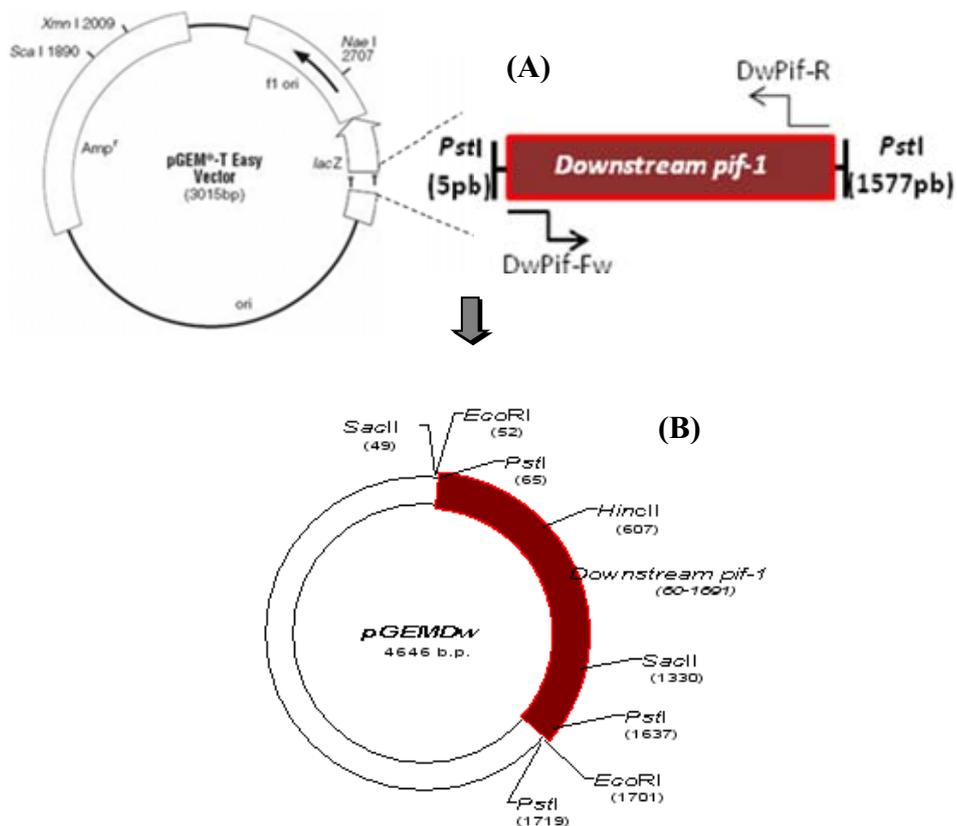


Figura 26: Esquema da clonagem do fragmento *dw* no vetor pGEM-T-Easy. (A) Clonagem do fragmento de PCR com a adição de sítios de clivagem para a enzima *Pst*I nas duas extremidades; (B) Plasmídeo pGEMDw com a inserção da região a montante (fragmento *dw*) ao gene *pif-1* e os sítios de clivagem do inserto e do vetor.

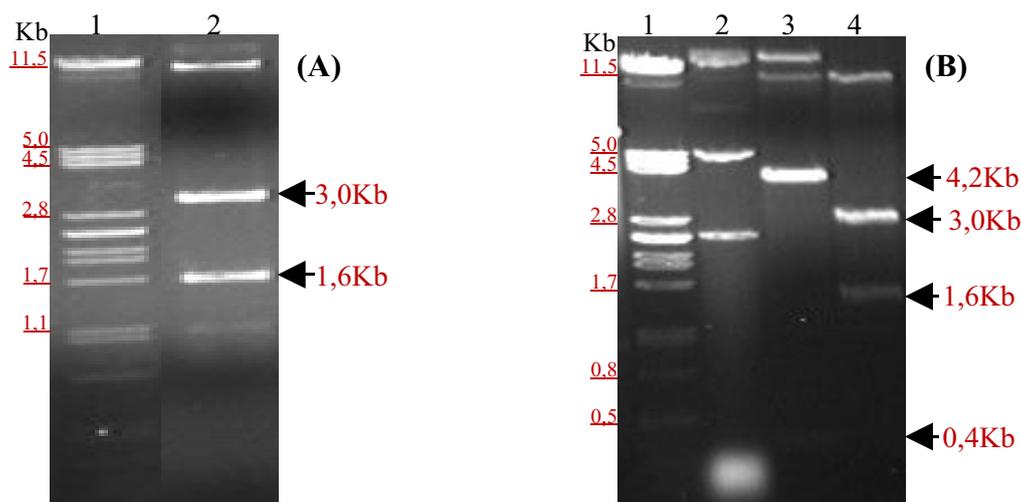
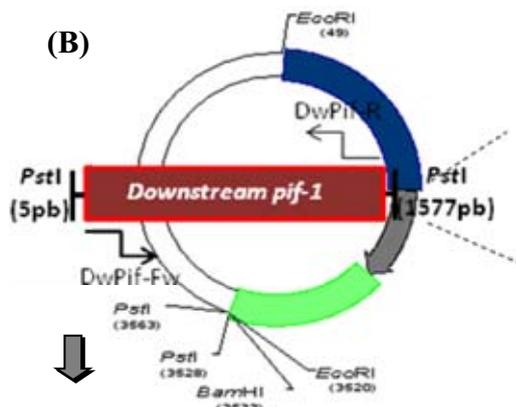
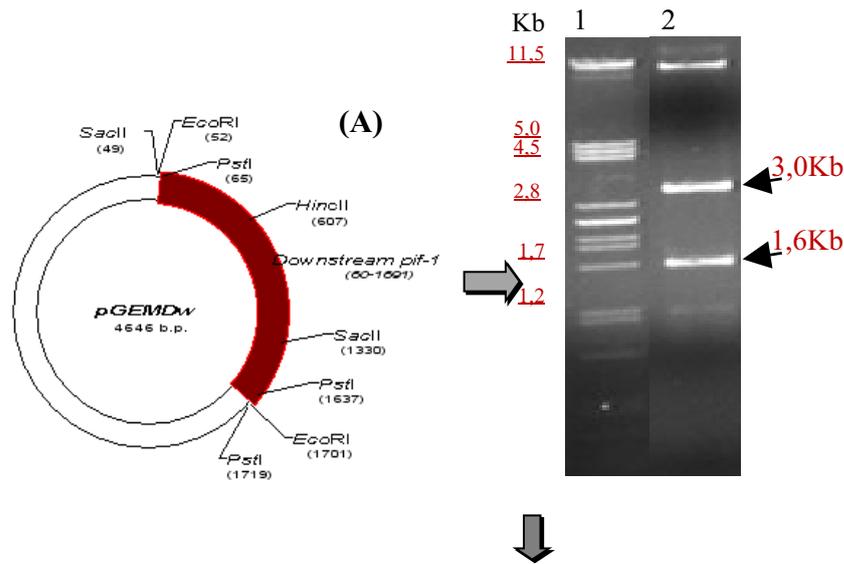


Figura 27: Confirmação da clonagem do fragmento *dw* clonado no vetor pGEM-T-Easy. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. (A) Clivagem com a enzima *Pst*I. Amostras: (1) marcador DNA fago λ /*Pst*I, (2) DNA plasmidial de pGEM*Dw* clivado; (B) Amostras: (1) marcador DNA fago λ /*Pst*I, (2) DNA de pGEM*Dw* intacto, (3) DNA de pGEM*Dw* clivado com a enzima *Sac*II, (4) DNA de pGEM*Dw* clivado com a enzima *Eco*RI.

O fragmento *dw* foi purificado e clonado no plasmídeo pGEM*Up*GFP defosforilado e linearizado com a enzima *Pst*I. Essa última clonagem deu origem ao plasmídeo pGEM*Up*GFP*Dw* (Figura 28). Esse plasmídeo foi clivado com as seguintes enzimas: *Sac*II (Figura 29A – poço 2) que confirmou a orientação correta do fragmento *dw* gerando fragmentos de 4,5Kb e 3,5Kb; *Pst*I (Figura 29B – poço 2) a qual liberou um fragmento correspondente ao *dw* (1,6Kb); e *Eco*RI (Figura 29B – poço 3) a qual somente linearizou o plasmídeo devido à perda do segundo sítio de restrição após a linearização do pGEM*Up*GFP com a enzima *Pst*I.



(C)

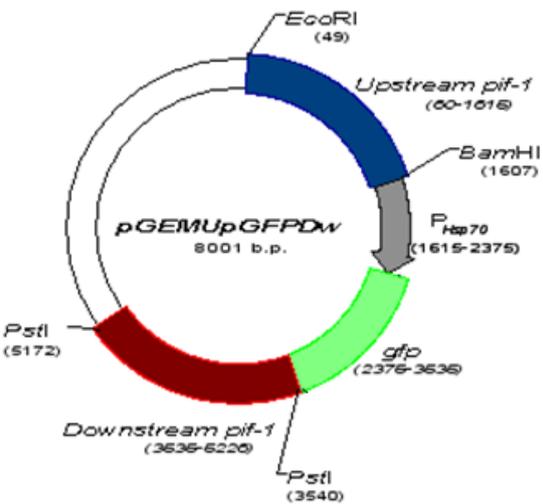


Figura 28: Esquema da construção do plasmídeo pGEMUpGFPDw. Clonagem do fragmento *dw* no plasmídeo pGEMUpGFP. (A) Plasmídeo pGEMDw e o fragmento *dw* liberado através de clivagem com a enzima *PstI*. Amostras: (1) marcador DNA fago $\lambda/PstI$, (2) DNA plasmidial clivado com *PstI*; (B) Clonagem do fragmento *dw* no plasmídeo pGEMUpGFP, ambos clivados com a enzima de restrição *PstI*; (C) Plasmídeo pGEMUpGFPDw e os sítios de clivagem dos insertos e do vetor.

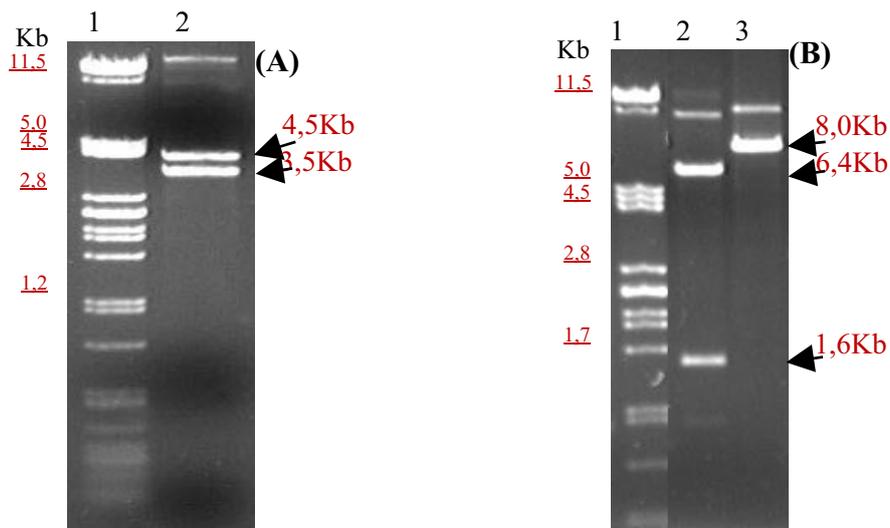


Figura 29: Confirmação da construção do plasmídeo pGEMUpGFPD_w. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. (A) Clivagem com a enzima *SacII* para confirmação da orientação do fragmento *dw*. Amostras: (1) marcador DNA fago $\lambda/PstI$, (2) DNA plasmidial de pGEMUpGFPD_w digerido; (B) Clivagem com as enzimas *PstI* e *EcoRI*. Amostras: (1) marcador DNA fago $\lambda/PstI$, (2) DNA de pGEMUpGFPD_w clivado com a enzima *PstI*, (3) DNA de pGEMD_w clivado com a enzima *EcoRI*.

4.6.2. Transfecção e co-transfecção do plasmídeo pGEMUpGFPD_w em células de inseto – Ensaio de interrupção do gene *pif-1* por recombinação homóloga

O plasmídeo pGEMUpGFPD_w construído para interrupção do gene *pif-1* foi co-transfectado, mediante presença de lipossomos, com DNA do clone viral AgMNPV em células de inseto Tn-5B1-4. Após três dias de co-transfecção os efeitos citopáticos das células infectadas tornaram-se visíveis. Foram observados hipertrofia do núcleo celular, arredondamento das células e formação de corpos poliédricos. Nas células transfectadas somente com o plasmídeo pGEMUpGFPD_w (Figura 30) e nas células co-transfectadas com plasmídeo juntamente com o DNA viral (Figura 31), portanto sujeitas à

recombinação, foi visualizada a expressão da proteína GFP mediante fluorescência em microscópio de contraste de fase com luz UV.

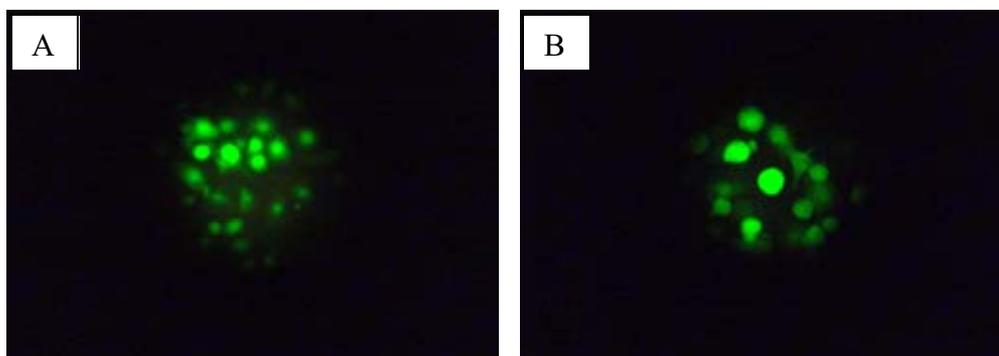


Figura 30: Células Tn5B1-4 transfetadas com o plasmídeo pGEMUpGFPDw. Expressão do gene *gfp* em células transfetadas 72h p.t.; (A) aumento 100X; (B) aumento 320X. Microscopia de fluorescência com luz UV (Filtro para comprimento de onda 395nm). Aumentos com base nas lentes objetiva e ocular.

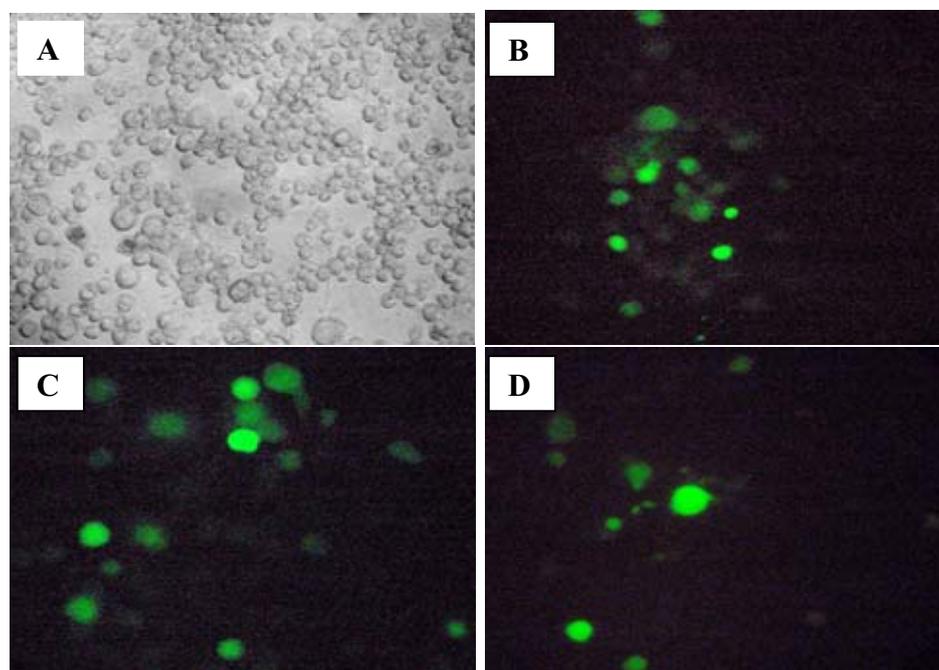


Figura 31: Células Tn5B1-4 co-transfetadas com o plasmídeo pGEMUpGFPDw e DNA do clone viral AgMNPV-2D. Expressão do gene *gfp*; (A) células infectadas a partir do DNA do vírus AgMNPV-2D 72h p.i., microscopia de contraste de fase – aumento 100X; (B), (C) e (D) células co-transfetadas, – aumentos 100X, 200X e 320X respectivamente. As fotos (A) e (B) mostram o mesmo campo. Microscopia de fluorescência com luz UV (Filtro de 395nm).

4.6.3. Purificação do vírus recombinante vAgGFP Δ pif-1

O sobrenadante derivado da co-transfecção foi coletado e utilizado para infecção de células Tn-5B1-4. Após três dias de infecção, foi possível visualizar a formação de poliedros no interior das células, sendo que algumas destas apresentavam expressão da proteína GFP (Figura 32). Esse sobrenadante foi então submetido à purificação através da técnica de diluição serial em triplicata.

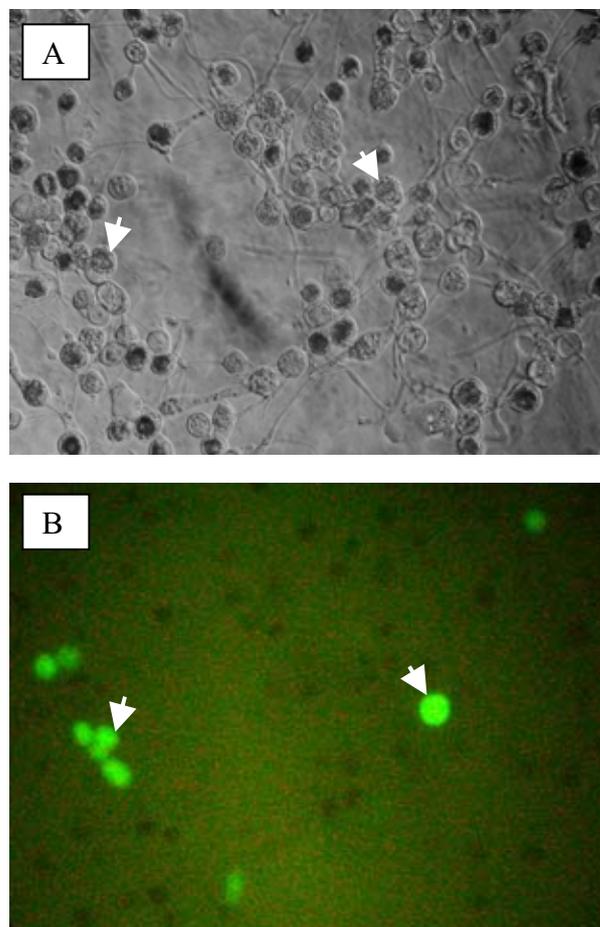


Figura 32: Células Tn5B1-4 infectadas com o vírus recombinante vAgGFP Δ pif-1 e com o vírus AgMNPV-2D. Confirmação da obtenção do vírus recombinante com base na inserção do cassete gênico *hsp70/gfp* no genoma de AgMNPV-2D no locus do gene *pif-1*; (A) e (B) células infectadas com vírus AgMNPV-2D e recombinante vAgGFP Δ pif-1 3d p.i. (A) Microscopia de contraste de fase – aumento 200X. (B) Microscopia de fluorescência com luz UV (Filtro para comprimento de onda 395nm).

5. Discussão

Populações de baculovirus são geneticamente heterogêneas (Simón *et al*, 2006), conferindo uma alta variabilidade genética aos isolados derivados do campo. Sabe-se que dentro dessas populações há presença de genótipos mutantes, surgidos espontaneamente, os quais apresentam deleções em regiões essenciais para a persistência do vírus na natureza e para sua capacidade de transmissão via oral (López-Ferber *et al.*, 2003; Simón *et al*, 2004; Simón *et al.*, 2005b). Genótipos mutantes podem apresentar ausência de infectividade por falta de proteínas e enzimas estruturais, ou por falta de fatores de regulação da replicação viral.

O potencial de seleção em baculovirus está relacionado a seus níveis de variação genética. Perfis de DNA viral após análise com endonucleases de restrição (REN) têm revelado que baculovirus são bastante variáveis. Isolados virais de uma mesma espécie de hospedeiro em diferentes regiões geográficas, freqüentemente mostram diferenças nos padrões de REN, entretanto pouco se conhece sobre o papel ou a manutenção desta variação (Cory e Myers, 2003).

O alto nível de variabilidade genética em baculovirus combinado com o aumento de oportunidades de recombinação de fenótipos múltiplo ocluídos deve predispor os MNPV a uma faixa maior de hospedeiros. Os vírus com maior espectro de hospedeiros tendem a ser MNPV isolados de Lepidoptera (Cory e Myers, 2003). O vírus *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* possui alta especificidade à lagarta da soja (*A. gemmatalis*).

Os variantes genótipos podem ser separados por técnicas de clonagem *in vitro* (Maruniak, *et al*, 1984, Stiles e Himmerick, 1998) ou *in vivo* (Munõz *et al*, 1998, Smith e Crook, 1988). Sabe-se que, embora muito relacionados, os variantes genotípicos

podem ser distinguidos uns dos outros através do polimorfismo dos fragmentos obtidos através da clivagem com enzimas de restrição. Os variantes genotípicos analisados neste trabalho foram selecionados por clonagem *in vitro*, utilizando-se técnicas de *plaque assay* ou por diluição serial. A população de genótipos virais do vírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* mostrou ser genotipicamente heterogênea.

Os dez genótipos da população analisada apresentaram variações em relação aos fragmentos obtidos através de clivagem com as enzimas *PstI* e *HindIII*. Dois grupos distintos de genótipos foram identificados, aqueles selecionados por *plaque assay* (AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37) e aqueles selecionados por diluição serial (Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04). Os clones do segundo grupo assemelharam-se ao protótipo AgMNPV-2D. Os genótipos do B, em seu perfil, puderam ser agrupados pela ausência de um fragmento de ~3,5Kb , após digestão com *PstI* e pela presença de um fragmento de ~3,5Kb após clivagem com *HindIII*. Os clones AgL-16 e Ag79-02, foram os mais distintos da população. Os resultados obtidos confirmam a pureza dos clones selecionados, uma vez que nenhuma banda submolar foi detectada nos perfis de restrição do DNA dos genótipos analisados, e revelam a heterogeneidade da população.

A recombinação como possível causa de heterogeneidade genética havia sido relatada para o vírus AgMNPV, em populações selvagens por Croizier e Ribeiro (1992). Um estudo de isolados virais sazonais, coletados no campo em safras subseqüentes de aplicação do vírus AgMNPV em uma mesma área, durante o período de 1984 a 1997, foi feita por Souza e colaboradores (2001). O perfil de restrição do DNA de onze isolados virais de AgMNPV foi comparado ao inóculo original aplicado em 1979 (AgMNPV-79). Bandas submolares indicaram a presença de diferentes genótipos em cada amostra e alterações no perfil de DNA desses isolados foram observadas ao longo do tempo. Essas

diferenças poderiam estar relacionadas à pressão de seleção e/ou evento de recombinação.

Interações mutualísticas permitem a efetivação da infecção em população natural de baculovirus contendo mutantes defectivos incapazes de infectar o inseto hospedeiro por via oral. Características desse tipo estariam ligadas a deleções nos genes de infectividade *per os*, ou genes *pif* (Simón *et al.* 2004; 2005b; 2006). Análise de restrição de uma população do baculovirus SfMNPV (López-Ferber *et al.*, 2003) detectou a presença de genótipos com deleções na região do gene *pif-1* e que foram incapazes de infectar o inseto por ingestão (López-Ferber *et al.*, 2003).

Para análise da população de genótipos de AgMNPV, *primers* para os genes *pif-1* e *pif-2* foram desenhados com base na seqüência do vírus AgMNPV-2D. O DNA dos clones foi obtido e reações de PCR foram feitas para investigação da presença dos genes de virulência. Todos os variantes genotípicos da população apresentaram amplificação do fragmento esperado para as determinadas regiões, não havendo nenhum tipo de alteração em relação ao tamanho do fragmento ou à ausência de amplificação.

Nos ensaios de virulência evidenciaram-se diferenças na patogenicidade de cada clone viral. No entanto, o genótipo que mais se destacou, devido a sua alta virulência, foi o clone Ag79-01 que revelou uma CL50 de 75PIB/ml, sendo os parâmetros de TL50, TM e taxa de mortalidade mais baixos em relação a todos os clones testados.

Todos os clones virais tiveram capacidade de estabelecer infecção primária quando inoculados na dieta dos insetos testados. Portanto, embora a seqüência nucleotídica dos genes *pif* identificados não tenha sido determinada neste trabalho, esses resultados demonstram que não houve modificações genéticas que interferissem na atuação das proteínas PIF nessa população-teste. De acordo com a literatura, alteração em qualquer um dos genes *pif* deveria acarretar o bloqueio da infecção por via oral.

Estudos realizados com populações de vírus defectivos têm sido relatados com o vírus SfMNPV, um NPV do grupo II (López-Ferber *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2004). O vírus AgMNPV é um NPV do grupo I e, neste estudo, não foi detectada nenhuma alteração nos genótipos purificados em relação à capacidade de infecção *per os*, ou algum padrão de amplificação dos fragmentos diferente dos esperados com os *primers* desenhados para os genes *pif-1* e *pif-2*. A população do vírus AgMNPV em estudo, apesar da variabilidade encontrada e alteração dos fragmentos obtidos nos perfis de restrição dos variantes, pode não obedecer ao padrão encontrado para a população de SfMNPV, a qual possui genótipos defectivos com deleções nas regiões dos genes *pif*, resultando na ausência de infectividade oral.

Outro gene de virulência que teve sua função recentemente estudada (Ohkawa *et al.*, 2005) foi o gene *pif-3*. Esse gene está incluso na família de genes *pif* e sua deleção no genoma viral ou interrupção da cauda hidrofóbica N-terminal de sua proteína, acarreta ausência de infecção por via oral (Li *et al.*, 2007). No entanto, no artigo científico que descreve o seqüenciamento nucleotídico completo do genoma de AgMNPV-2D, o gene *pif-3* não se encontra relatado (Oliveira *et al.*, 2006). Diante disso, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para busca e análise do gene *pif-3* do vírus AgMNPV, com base na seqüência da ORF 115 do vírus AcMNPV. No resultado da análise de BLAST pôde-se verificar que a ORF 114 de AgMNPV mostrou homologia e um alto valor de similaridade e identidade em relação à seqüência de aminoácidos, o que pode ser sugerido que essa ORF corresponde ao gene *pif-3*. *Primers* então foram desenhados com base na seqüência da ORF Ag114 e utilizados em reação de PCR com DNA dos genótipos selecionados. Da mesma forma que os resultados obtidos para a detecção dos genes *pif-1* e *pif-2*, todos os clones apresentaram

amplificação de um fragmento do tamanho esperado para a região de *pif-3* e não houve nenhuma alteração no tamanho dos fragmentos ou ausência de amplificação.

Uma vez que não foi possível encontrar na população natural de AgMNPV vírus defectivos nos genes *pif*, foi elaborada uma estratégia para construção de um baculovírus recombinante com deleção do gene *pif-1*. Clonagens em série no vetor pGEM-T-Easy das regiões a montante e a jusante ao gene *pif-1*, originaram um plasmídeo contendo as regiões homólogas ao gene flanqueando o gene repórter *gfp* sob regulação do promotor *hsp70*. A deleção ocorreu através de recombinação homóloga em células co-transfectadas com o plasmídeo pGEMUpGFPD_w e o DNA do vírus AgMNPV-2D. A expressão do gene *gfp* foi observada utilizando-se microscopia de fluorescência sob luz UV.

Células co-transfectadas apresentaram efeitos citopáticos após três dias pós-transfecção. Foram observadas alterações como hipertrofia nuclear, arredondamento celular, presença de corpos poliédricos no interior do núcleo e emissão de fluorescência nas células visualizadas sob luz UV, confirmando que houve a inserção correta do *cassete* contendo o gene *gfp*. Em seguida, o sobrenadante dessas células contendo uma mistura de vírus do tipo selvagem AgMNPV-2D e do vírus recombinante foi usado para infecção de novas células. A detecção de fluorescência nessas células confirmou que houve produção de vírus recombinantes uma vez que somente esses vírus, diferentemente do vírus selvagem, possuem a capacidade de expressar o gene *gfp* em substituição ao gene *pif-1*. Nesse momento, o vírus recombinante vAgGFPΔ*pif-1* está em processo de purificação através da técnica de diluição seriada.

Esse vírus recombinante é de relevante importância para a continuidade do estudo dos genes *pif*, principalmente o estudo da função do gene *pif-1*. Deleções dos genes de virulência têm sido alvo de estudos (Gutiérrez *et al.*, 2005) como forma de

confinamento de baculovirus recombinantes capazes de expressar proteínas heterólogas. Essa medida tem garantido a ineficiência de infectividade do vírus recombinante, embora não afete a expressão do gene heterólogo, prevenindo possíveis recombinações com outros genótipos virais e excluindo a possibilidade do gene heterólogo se dispersar na natureza. O plasmídeo construído neste trabalho (pGEMUpGFPD_w) demonstra ser um importante veículo para bloqueio da expressão do gene *pif-1*, podendo contribuir, em termos de biosegurança, para interrupção deste gene durante a construção de novos baculovirus recombinantes.

6. Conclusões e Perspectivas

Na população do baculovirus AgMNPV, estudada neste trabalho, pôde-se verificar que há variações entre os genótipos. Em contraste com a literatura, não foram encontrados mutantes defectivos com alterações nos genes *pif*, e a virulência apresentada pelos genótipos estudados auxilia na conclusão de que os fragmentos identificados durante o trabalho são relativos aos genes *pif* e que esses estão presentes em todos os variantes genotípicos. O clone Ag79-01 poderá ser útil como referência devido à alta virulência apresentada nos ensaios. A população de variantes genotípicos servirá também como base para estudos futuros de variabilidade em outras regiões gênicas.

A ORF 114 de AgMNPV foi identificada como relativa ao gene *pif-3* e seu estudo é de extrema importância e sua função ainda não foi bem elucidada. Análises de expressão temporal dos genes *pif* (RT-PCR) e utilização da técnica de RNA interferente para bloqueio da tradução protéica, bem como o estudo da função e localização das proteínas PIF devem ser realizados para auxiliar o entendimento a respeito dos genes *pif*, sobre seus produtos e o seu papel durante a infecção do inseto.

O baculovirus vAgGFP Δ pif-1 constitui um modelo importante no estudo inicial da função do gene *pif-1* de AgMNPV, uma vez que não há relatos de estudos com genes *pif* desse baculovirus. Uma vez que esse gene encontra-se interrompido, poderá ser realizado estudos de resgate da função de *pif-1* e estudos de co-infecção do baculovirus recombinante defectivo com genótipos infectivos. Com esse recombinante poderão ser realizadas análises de micrografia eletrônica, como também analisar seu comportamento durante a infecção através de inserções de genes *pif* de outras espécies de baculovirus para em estudo aprofundado de função

Os genes *pif* são de essenciais para o estabelecimento da infecção oral e o estudo desses genes pode trazer relevantes descobertas a respeito da biologia do vírus, bem como a respeito do processo de fusão que ocorre entre as partículas ODV e as células do intestino médio do inseto. Esse trabalho constituiu um passo inicial e importante no estudo de genes *pif* do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*.

7. Referências Bibliográficas

Afonso, C. L.; Tulman, E. R.; Lu, Z.; Balinsky, C. A.; Moser, B. A.; Becnel, J. J.; Rock, D. L.; Kutish, G. F. (2001) Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology*. 75: 11157–11165.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.

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

Barbara, K. A. (2000) Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner). *University of Florida - Ifas Extension*, 151: 1-5.

Barret, J. W.; Brownwright, A. J.; Primavera, M. J.; Palli, S. R. (1998). Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insect using the green fluorescence protein as a reporter. *Journal of Virology*. 72: 3377-3382.

Barreto, M. R.; Guimarães, C. T.; Teixeira, F. F.; Paiva, E.; Valicente, F. H. (2005) Effect of baculovirus spodoptera isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Their Characterization By RAPD. *Neotropical Entomology*, 34: 067-075.

Billimoria, S.L. (1991). The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: *Viruses of Invertebrates* (Kurstak, E. Ed.), Marcel Dekker, New York: 1-72.

Blissard, G.W.; Rohrmann, G.F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*. 35: 127-155.

Boyce, F. M.; Bucher, N. L. R. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2348-2352.

Braunagel, S. C.; Russel, W. K.; Rosas-Acosta, G.; Russel, D. H.; Summers M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 9797–9802.

Bulach, D. M., Kumar, C. A.; Zaia, A.; Liang, B. F.; Tribe, D. E. (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 59–73.

Castro, M. E. B.; Souza, M. L. (2006). Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: *Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas* (Oliveira-Filho, E. C.; Monnerat, R. G.), 1: 175-194.

- Cha, H. J.; Bentley, W. E. (2007). Monitoring and visualization of baculovirus infection using green fluorescent protein strategy. *Methods in Molecular Biology* 388:407-418
- Clem, R. J. (2005) The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *CTMI*, 289:113-130.
- Cody, C. W.; Prasher, D. C.; Westler, W. W.; Prendergast, F. G.; Ward, W. W. (1993). Chemical structure of hexapeptide chromophore of the *Acquorea victoria* green fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218.
- Condreay, J. P.; Witherspoon, S. M.; Clay, W. C.; Kost, T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with recombinant baculovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 127-132.
- Cory, J. S.; Hails, R. S.; Sait, S. M. (1997) Baculovirus ecology. In: *The Baculoviridae*, ed. L K Miller, 301-309.
- Cory, J.S.; Myers, J. H. (2003). The Ecology and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 239-272.
- Croizier G.; Ribeiro, H. C. T.; (1992) Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. *Virus Research*, 26: 183-196.
- Daimon, T.; Katsuma, S.; Kang, W. K.; Shimada, T. (2007) Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Archives of Virology* 152: 1655-1664.
- Dalmolin, C. C.; Silva, F. R. da; Mello, L. V.; Rigden, D. J.; Castro, M. E. B.(2005) Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* 110: 99-109.
- Fang, M.; Nie, Y.; Wang, Q.; Deng, F.; Wang, R.; Wang, H.; Wang, H.; Vlak, J. M. (2006). Open reading frame 132 of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus encodes a functional per os infectivity factor (PIF-2). *Journal of General Virology* 87: 2563-2569.
- Faulkner, P.; Kuzio, J.; Williams, G. V.; Wilson, J. A. (1997). Analyses of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus required for occlusion body infectivity in vivo. *Journal of General Virology* 78: 3091-3100.
- Federici, B. A. (1997) Baculovirus pathogenesis. In: *The baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.). New York: Plenum, 33-59.
- Finney, D. J. (1971) Probit Analysis. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England
- Friesen, P.D. (1997) Regulation of baculovirus early gene expression. In: *The Baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed), 141-170.
- Friesen, P.D.; Miller, L.K. (1986) The regulation of baculovirus gene expression. In: *The molecular biology of baculoviruses* (Derfler, W.; Boehm, P. Eds.), Berlin, Springer-Verlag, 31-50.

- Funk, C. J.; Braunagel, S. C.; Rohrmann, G. F. (1997) Baculovirus structure. In: *The baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed.). New York: Plenum, 7-32.
- Garcia-Maruniak, A.; Maruniak, J. E.; Zanotto, P. M.; Doumbouya, A. E.; Liu, J. C.; Merritt, T. M.; Lanoie, J. S. (2004) Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus*. *Journal of Virology*, 78: 7036-7051.
- Granados R. R.; Guoxun L.; Dersksen A. C. G.; McKenna K. A. (1994) A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 260– 266.
- Granados, R. R.; Williams, K. A. (1986) *In vivo* infection and replication of baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses*. (Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed.), 1: 89-108.
- Grasela, J. J.; McIntosh, A. H.; Goodman, C. L.; Wilson, L. E.; King, L. A. (2000) Expression of the green fluorescent protein carried by *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* in: Insect cell lines *in vitro* cell. *Developmental Biology* 36: 205–210.
- Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. (1976) Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal. of Economic Entomology*, 69: 487–488.
- Guarino, L. A.; Xu, B.; Jin, J.; Dong, W. (1998). A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of Virology*, 72: 7985–7991.
- Gutiérrez, S., I. Kikhno, and M. Lopez Ferber. (2004) Transcription and promoter analysis of *pif*, an essential but low-expressed baculovirus gene. *Journal of General Virology*, 85:331-341.
- Gutiérrez, S.; Mutuel, D.; Grard, N.; Cerutti, M.; López-Ferber, M. (2005) The deletion of the *pif* gene improves the biosafety of the baculovirus-based technologies. *Journal of Biotechnology*, 116: 135–143.
- Haas-Stapleton, E. J.; Washburn, J. O.; Volkman, L. E. (2004). P74 mediates specific binding of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology*, 78: 6786-6791.
- Hawtin, R. E.; Zarkowska, T.; Arnold, K.; Thomas, C. J.; Gooday, G. W.; King, L. A.; Kuzio, J. A.; Possee, R.D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 238: 243-53.
- Hefferon, K. L.; Oomens, A. G.; Monsma, S. A.; Finnerty, C. M.; Blissard, G. W. (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*, 258: 455–468
- Herniou, E. A.; Olszewski, J. A.; O'Reilly, D. R.; Cory, J. S.(2004) Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts. *Journal of Virology*, 78: 3244-3251.

- Hink, W.F. (1970) Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*, 226: 466-467.
- Hoffmann-Campo, C. B.; Oliveira, E. B.; Moscardi, F. (1985) Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, Embrapa-CNPSo, Doc. 10: 20.
- Hofmann, C.; Sandig, V.; Jennings, G.; Rudolph, M.; Schlag, P.; Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:10099–10103.
- Hong, T.; Summers, M. D.; Braunagel, S. C. (1997) N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 4050–4055.
- 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. *Journal of Virology*, 67: 1860-1868.
- Hu, Z. H.; Luijckx, T.; van Dinten, L. C.; van Oers, M. M.; Hajos, J. P.; Bianchi, F. J. J. A.; van Lent, J. W. M.; Zuidema, D.; Vlak, J. M. (1999). Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. *Journal of General Virology* 80: 1045–1053.
- Jarvis, D. L. (1997). Baculovirus expression vectors. In: *The Baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed.). Plenum Press, New York, 389-419.
- Jehle J. A.; Lange M.; Wang H.; Hu Z.; Wang Y.; Hauschild R. (2006a) Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*, 346: 180-193.
- Jehle, J. A.; Blissard, G. W.; Bonning, B. C.; Cory, J. S.; Herniou, E. A.; Rohrmann, G. F.; Theilmann, D. A.; Thiem, S. M.; Vlak, J. M. (2006b) On classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151: 1257-1266.
- Kamita, S. G.; Maeda, S.; Hammock, B. D. (2003) High-frequency homologous recombination between baculoviruses involves DNA Replication. *Journal of Virology*, 77:13053–13061.
- Kenoutis, C.; Efrose, 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. *Journal of Virology* 80: 4135-4146.
- Kikhno, I.; Gutierrez, S.; Croizier, L.; Croizier, G.; López-Ferber, M. (2002) Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 83: 3013–3022.
- Kost, T. A.; Condreay, J. P.; Jarvis, D. L. (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23: 567-575.

- Kuzio, J.; Jacques, R.; Faulkner, P. (1989) Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 173: 759-763.
- Lauzon, M. A. H.; Jamieson B. P.; Krell, J. P.; Aril M. B. (2005) Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 86: 945-961.
- Lee, H. H.; Miller, L. K. (1978). Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 27:754-767.
- Levy, S. M.; Falleiros, A. M. F.; Gregório, E. A.; Arrebola, N. R.; Toledo, L. A.(2004) The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology* 64:633-638.
- Levy, S. M.; Falleiros, A. M. F.; Moscardi, F.; Gregório, E. A. (2007) Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 183–186.
- Li, X.; Song, J.; Jiang, T.; Liang, C.; Chen, X. (2007) The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Archives of Virology*, 152: 1851–1858.
- Liang, C. Y.; Wang, H. Z.; Li, T. X.; Hu, Z. H.; Chen, X. W. (2004) High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Archives of Virology*, 149: 51-60.
- Lin, G.; Blissard, G. W. (2002) Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6*-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription. *Journal of Virology*, 76: 5503–5514.
- Long, G.; Pan, X.; Kormelink, R.; Vlak, J. M. (2006). Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 80:8830-8833.
- López-Ferber, M.; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P. (2003) Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 2249–2255.
- Lu, A.; Carstens, E.B. (1993). Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 195: 710–718.
- Lu, A.; Miller, L. K. (1997). Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: *The Baculoviruses* (Miller, L. K. Ed.), 193–216.
- Luckow, V. A.; Lee, S. C.; Barry, G. F.; Olins, P. O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 67: 4566–4579.

- Maruniak, J. E. (1986) Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: The biology of baculoviruses (Granados, R. R.; Federici, B. A. Eds.). Boca Raton: CRC, 1: 129-146.
- Maruniak, J. E. (1989) Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84: 107–111.
- Maruniak, J. E.; Brown, S. E.; Knudson, D. L. (1984) Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology*. 136: 221-234.
- Maruniak, J. E.; Garcia-Maruniak, A.; Souza, M. L.; Zanotto, P. M. A.; Moscardi, F. (1999). Physical maps and virulence of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* genomic variants. *Archives of Virology*, 144: 1991–2006.
- McLachlin, J. R.; Miller, L. K. (1994). Identification and characterization of *vlf-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *Journal of Virology* 68: 7746-7756.
- Merzendorfer, H.; Zimoch, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases - Review. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-412.
- Miller, L. K. (1997) Introduction to the baculoviruses. In: *The Baculoviruses* (Miller, L. K. Ed.), 1-6.
- Montor, W. R.; Sogayar, M. C. (2003). Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Biotecnologia*, 33: 16-23.
- Moraes, R. R.; Maruniak, J. E.; Funderburk J. E (1999). Methods for Detection of *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus DNA in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2307–2311.
- Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D. R.; Paro, F. E.; L. Soldorio, I. (2001) Fluorescent Brighteners Improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) *Nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) Activity on AgMNPV Susceptible and Resistant Strains of the Insect. *Biological Control*, 20: 247–253.
- Moscardi, F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44: 257-289.
- Moscardi, F.; Morales, L.; Santos, B. (2002) The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. In: *35th Annual Meeting of the SIP*, 86–91.
- Muñoz, D.; Castillejo, J.; Caballero, P. (1998) Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4372-4377.
- O'Reilly, D. R.; Miller, L. K.; Luckow, V. A. (1992) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. (Freeman W. H. Ed), 347.

- Ohkawa, T.; Washburn, J. O.; Sitapara, R.; Sid, E.; Volkman, L. E. (2005). Specific binding of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *Journal of Virology*, 79: 15258-15264.
- 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. *Journal of General Virology*, 87: 3233–3250.
- Payne, C.C. (1986) Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie*, 32: 183-200.
- Pearson, M. N.; Rohrmann, G. F. (2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *Journal of Virology*, 304: 81– 88.
- Perera, O.; Green, T. B.; Stevens Jr., S. M.; White, S.; Becnel, J.J. (2007). Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions. *Journal of Virology*, 81: 4585-4590.
- Philipps, B.; Forstner, M.; Mayr L. M. (2004) Baculovirus expression system for magnetic sorting of infected cells and enhanced titer determination. *Bio Techniques* 36: 80-83.
- Pijlman, G. P., Pruijssers, A. J. P.; Vlak, J. M. (2003) Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. *Journal General Virology*, 84: 2041–2049.
- 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.
- Ramachandran, A.; Bashyam, M. D.; Viswanathan, P.; Ghosh, S.; Senthil Kumar, M.; Hasnain, S. E. (2001) The bountiful and baffling baculovirus: The story of polyhedrin transcription. *Current Science* 81: 998.
- Ribeiro, B. M.; Huchthinson, K.; Miller, L. K. (1994). A mutant baculovirus with a temperature sensitive IE-1 transregulatory protein. *Journal of Virology*, 68: 1075-84.
- Rodas, V. M.; Marques, F. H.; Honda, M. T.; Soares, D. M.; Jorge, S. A. C.; Antoniazzi, M. M.; Medugno, Castro, C. M. E. B.; Ribeiro, B. M.; Souza, M. L.; Tonso, A.; Pereira, C. A. (2005) Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology*, 48: 27–39.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniats, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed.
- Shoji, I.; Aizaki, H.; Tani, H.; Ishii, K.; Chiba, T.; Saito, I.; Miyamura, T.; Matsuura, Y. (1997). Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *Journal of General Virology* 78:2657–2664.

- Sieburth, P. J.; Maruniak, J. E. (1988) Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Development of Biology*, 24: 195–198.
- Simón, O.; Gutiérrez, S.; Williams, T.; Caballero, P.; López-Ferber, M. (2005b) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *pif* gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). *Virus Research*, 108: 213–220.
- Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P.; López-Ferber, M. (2006) Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proceeding of. Royal. Society*, 273: 783–790.
- Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P. (2004) Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Applied and. Environmental. Microbiology*, 70: 5579–5588.
- Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P. (2005a) Functional importance of deletion mutants genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4254–4262.
- Smith, I. R. L.; Crook, N. E. (1988) *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. *Virology*, 166: 240-244.
- Souza, M. L.; Castro, M. B.; Sihler, W.; Krol, E.; Szewczyk, B. (2007) Baculoviruses: A Safe Alternative in Pest Control? *Pest Technology* 1: 53-60.
- Souza, M. L.; Castro, M. E. B.; Moscardi, F. (2004) Virus for the biological control of insects. In: *Encyclopedia of Pest Management* (Pimentel, D.; Schmid, O. Eds.). New York: Marcel Dekker.
- Souza, M. L.; Castro, M. E. B.; Barros, A. M.; Sihler, W.; Moscardi, F. (2001) Análise de DNA de isolados temporais do Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* utilizados no controle da lagarta da soja no Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 14 . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16 p.
- Stiles, S.; Himmerich, B. (1998) *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 174-177.
- Szewczyk, B.; Hoyos-Carvajal, L.; Paluszek, M.; Skrzecz, I.; Souza, M. L. (2006). Baculoviruses re-emerging biopesticides *Biotechnology Advances* 24: 143-160.
- Theilmann, D.A.; Blissard, G.W.; Bonning, B.; Jehle, J.; O'Reilly, D.R.; Rohrmann, G.F.; Thiem, S. & Vlak, J.M. (2005) Family Baculoviridae. In: *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L. A. Ed). 177-185.
- Volkman, L. E. (1983) Occluded and budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: immunological relatedness of structural proteins. *Journal of Virology*, 46: 221-229

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

Wang, P.; Hammer, D. A.; Granados, R. R. (1994). Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*, 75: 1961-1967.

Yao L.; Zhou W.; Xu H.; Zheng, Y.; Qi, Y. (2004) The *Heliothis armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus* envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Research*, 104: 111-121.

Zanotto, P. M. A.; Kessing, B. D.; Maruniak, J. E. (1993) Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 147-1643.

Zhou, W.; Yao, L.; Xu, H.; Yan, F.; Qi, Y. (2005). The function of envelope protein p74 from *Autographa californica M nucleopolyhedrovirus* in primary infection to host.

Virus Genes, 30:139–150.

A
