



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

SUZANE SULIANE VITORINO S. F. GOMES

**Análise funcional de proteínas de fusão de envelope de
Alphabaculovirus e *Betabaculovirus* em células de inseto**

BRASÍLIA

2021

SUZANE SULIANE VITORINO S. F. GOMES

**Análise funcional de proteínas de fusão de envelope de
Alphabaculovirus e *Betabaculovirus* em células de inseto**

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

Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Coorientador: Dr. Fabricio da Silva Morgado

BRASÍLIA

2021

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos

Gomes, Suzane

GG633a

Análise funcional de proteínas de fusão de envelope de *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* em células de inseto / Suzane Suliane Vitorino S. F. Gomes; orientador Bergmann Morais Ribeiro; co-orientador Fabricio da Silva Morgado. -- Brasília, 2021.

98 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2021.

1. Baculovirus. 2. EFP. 3. GP64. 4. Proteína F. 5. CoveNPV. 6 DisaGV. I. Ribeiro, Bergmann Morais, orient. II. Morgado, Fabricio da Silva, coorient. III. Título.

SUZANE SULIANE VITORINO S. F. GOMES

**Análise funcional de proteínas de fusão de envelope de
Alphabaculovirus e *Betabaculovirus* em células de inseto**

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

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (CEL - UnB)

Membro interno: Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz (FAR - UnB)

Membro externo: Dra. Maria Elita Batista de Castro (Embrapa - CENARGEN)

Suplente: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart (CEL - UnB)

DEDICATÓRIA

À minha família Gomes Ferreira de Sousa, em nome do meu avô João Ferreira de Sousa (*in memoriam*) que, desde o limitado horizonte de oportunidades do interior do Maranhão, cultivou em meu pai, tios e primos a melhoria de nossas vidas através dos estudos e sempre se esforçou em criar meios para nos incentivar até seu último dia de vida. Que Deus o tenha!

AGRADECIMENTOS

Imensa gratidão a Deus por permitir a conclusão de mais essa etapa na minha vida e principalmente por conceder saúde a mim e aos meus nesse período tão crítico que vivemos. Agradeço ao meu pai Adonias, que é fonte de inspiração e determinação, e minha mãe Luzenir, que é sinônimo de amor e cuidado, por todos inúmeros esforços em me proporcionar um lar afável e acolhedor. Um imenso obrigada à minha irmã Susie pelo exemplo de superação e pela amizade de sempre. Ao meu futuro esposo William, que há mais de seis anos é meu terno companheiro, que me incentivou e apoiou nos momentos mais difíceis dessa jornada acadêmica, mas que também comemorou e se alegrou comigo nas vitórias.

Às minhas amigas de longas datas Bárbara e Júlia, pela amizade sincera desde o ensino fundamental. Vocês são um grande exemplo de mulheres profissionais, esposas e mães. Às minhas queridas amigas da Capela Nossa Senhora das Dores, pela amizade segundo o Coração de Nosso Senhor, por todo apoio e orações por mim nesse período de finalização do mestrado. Só Deus para recompensá-las! A todos meus familiares e amigos, que seria impossível nominar a todos, mas carrego todos em meu coração com muita gratidão.

Agradeço também a toda equipe de pesquisadores do Laboratório de Baculovírus da Univesidade de Brasília, desde os estudantes de iniciação científica até aos pós-doutores, pois todos contribuíram para o meu crescimento durante este tempo. Especialmente ao meu co-orientador Dr. Fabricio Morgado pela incalculável paciência e ricos ensinamentos que se dispôs a mim e também pelas longas noites de experimentos no laboratório ao lado de sua esposa Dra. Daniela Carrilho. Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Ardisson de Araújo da Universidade Federal de Santa Maria pelas poucas mas valiosas oportunidades que tive de trocar conhecimentos. Por fim, não menos importante, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Bergmann Ribeiro por abrir as portas do Laboratório de Baculovírus para mim, por todo suporte, paciência e orientações que possibilitaram essa pesquisa acontecer.

Às empresas de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro.

“Ora et labora, Deus adest sine mora”.

São Bento, séc. VI

RESUMO

Os baculovírus são vírus que infectam insetos de diferentes ordens, incluindo insetos-praga de cultivares economicamente relevantes para o Brasil. Eles são amplamente utilizados como agentes de controle biológico ao redor do mundo e seu uso é caracterizado pela especificidade ao hospedeiro, não acarretando danos a outras espécies e ao meio ambiente. A eficiência da infecção pelos baculovírus nas células de inseto se dá, em grande parte, pela atuação de proteínas de fusão de envelope (EFP, do inglês, *Envelope Fusion Protein*) que possibilitam o acesso e espalhamento do vírus por diferentes tecidos do animal. Estas proteínas se encontram no fenótipo viral chamado vírus brotado (BV, do inglês, *Budded Virus*), responsável pela infecção sistêmica. São reportados dois tipos diferentes de EFPs em baculovírus: a proteína GP64 e a proteína F. Estudos prévios com diferentes EFPs demonstraram que a GP64 foi uma aquisição recente na história evolutiva dos baculovírus, enquanto que a proteína F seria mais ancestral a desempenhar a função de entrada do vírus nas células. Dada a sua relevância no ciclo infectivo, o objetivo desse estudo foi realizar uma análise funcional de proteínas de fusão de envelope de dois baculovírus distintos: a GP64 do *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus (CoveNPV) – um *Alphabaculovirus* – e a proteína F do *Diatraea saccharalis* granulovírus (DisaGV) – um *Betabaculovirus*. Para isso, baculovírus recombinantes foram construídos inserindo o gene destas proteínas no genoma de um baculovírus modelo (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) sem o gene da sua EFP endógena (aqui denominado de *gp64*-null AcMNPV). Ensaios em cultura de células de inseto foram realizados para analisar a capacidade dessas EFPs em recuperar a infectividade viral do *gp64*-null AcMNPV, bem como análises qualitativas e quantitativas. Os resultados obtidos indicam que a GP64 do CoveNPV é capaz de recuperar a infectividade eficientemente, o que pode ser relacionada à proximidade evolutiva observada para com a GP64 do AcMNPV. Por outro lado, a proteína F do DisaGV não foi capaz de recuperar a infectividade viral, possivelmente por esta proteína pertencer a um vírus com relação filogenética distante do AcMNPV. Além disso, o DisaGV é o único vírus conhecido do gênero *Betabaculovirus* que possui, além da proteína F, o gene da proteína GP64 funcional. Esses resultados demonstram a intercambialidade que a proteína GP64 possui entre os alphabaculovírus do grupo I e também reforça a distância evolutiva existente para com a proteína F que, por sua vez, possui maior variabilidade de sequência de aminoácidos podendo ser incompatível com a estrutura que um AcMNPV necessita para gerar uma progênie viral.

Palavras-chave: Baculovírus. EFP. GP64. Proteína F. CoveNPV. DisaGV.

ABSTRACT

Functional analysis of envelope fusion proteins from *Alphabaculovirus* and *Betabaculovirus* in insect cells

Baculoviruses infect insects of many orders, including pests of economically important crops in Brazil. They are widely used as biological control agents worldwide and their use is characterized by host specificity, not infecting other beneficial insect species in the environment. The efficiency of baculovirus infection in insect cells is largely due to the action of envelope fusion proteins (EFP), which enables the access and spread of the virus through different animal tissues. These proteins are in the virus phenotype called budded virus (BV), responsible for systemic infections. Two kind of EFPs are functional in baculoviruses: the GP64 protein and the F protein. Previous studies with different EFPs showed that the GP64 was a recent acquisition in the baculovirus evolutionary history, while the F protein was the more ancestral protein to play the role of virus entry into cells. Given its relevance on the infective cycle, the aim of this study was to perform a functional analysis of envelope fusion proteins from two distinct baculoviruses: the GP64 from *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus (CoveNPV) – an *Alphabaculovirus* – and the F protein from *Diatraea saccharalis* granulovirus (DisaGV) – a *Betabaculovirus*. For that, recombinant baculoviruses were constructed inserting the genes into a model baculovirus genome (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) without its endogenous EFP (here called *gp64*-null AcMNPV). Assays in insect cell cultures were performed to analyze the EFPs ability in rescuing the viral infectivity of the *gp64*-null AcMNPV, as well as qualitative and quantitative analyzes. The results indicate that CoveNPV GP64 is able to rescue the infectivity efficiently, which may be related to the evolutionary proximity observed for the GP64 of AcMNPV. On the other hand, the F protein from DisaGV was not able to rescue the viral infectivity, possibly for this protein belongs to a virus with a distant phylogenetic relationship to AcMNPV. Furthermore, the DisaGV is unique in the *Betabaculovirus* genus because it has, besides the F protein, a functional GP64 protein gene. These results demonstrate the interchangeability that GP64 protein has between alphabaculoviruses from group I and also reinforces the existing evolutionary distance to the F protein which, in turn, has more amino acid sequence variability and may be incompatible with the structure that an AcMNPV needs to generate virus progeny.

Keywords: Baculovirus. EFP. GP64. F protein. CoveNPV. DisaGV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características gerais da família <i>Baculoviridae</i> em relação à organização taxonômica, inseto hospedeiro, proteína de fusão de envelope (EFP) do vírus brotado (BV) e morfologia do corpo de oclusão (OB).....	14
Figura 2: Ciclo de infecção descrito para um nucleopoliedrovírus.	15
Figura 3: Modelo esquemático de prováveis eventos de aquisição, substituição e transferência de genes de proteínas de fusão de envelope entre diferentes famílias de vírus.	20
Figura 4: Mapa vetor do plasmídeo doador pFB-pAcgp64-pA-PG	32
Figura 5: Esquema representativo do sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado em baculovírus Bac-to-Bac® (Invitrogen)	35
Figura 6: Esquema representativo dos bacmídeos recombinantes utilizados neste trabalho	36
Figura 7: Confirmação da amplificação dos genes das proteínas de fusão de envelope dos vírus CoveNPV e DisaGV	45
Figura 8: Confirmação da clonagem da proteína GP64 do CoveNPV no vetor de transferência.....	46
Figura 9: Confirmação da clonagem da proteína F do DisaGV no vetor de transferência.....	47
Figura 10: Confirmação da clonagem do fragmento de DNA contendo o gene <i>gp64</i> do CoveNPV pela digestão do clone C1 com a enzima de restrição <i>Bgl</i> II (Promega)	48
Figura 11: Confirmação da clonagem do fragmento de DNA contendo o gene F do DisaGV pela digestão dos clones recombinantes com a enzima de restrição <i>Hind</i> III (Promega)	49
Figura 12: Confirmação da inserção do gene <i>gp64</i> do CoveNPV no genoma do baculovírus	50
Figura 13: Confirmação da inserção do gene da proteína F do DisaGV no genoma do baculovírus	51
Figura 14: Ensaios de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcRepGP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcRepGP64.....	52
Figura 15: Ensaios de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcΔGP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcΔGP64	53

Figura 16: Ensaio de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcCoveGP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcCoveGP64.	55
Figura 17: Ensaio de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcDisaF e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcDisaF.....	56
Figura 18: Análise da quantidade de células Tn5B fluorescentes nas diferentes transfecções e infecções dos bacmídeos e vírus recombinantes.....	57
Figura 19: Curva padrão da qPCR usando oligonucleotídeos para o gene ie-1 do AcMNPV e o plasmídeo pCR2.1-TOPO-TA_AcIE1 como molde	59
Figura 20: Análise da curva de desnaturação (“ <i>melt</i> ”) dos produtos da qPCR utilizando o plasmídeo TOPO-AcMNPV-qPCR-V2-IE1.	59
Figura 21: Análise da amplificação de DNA por qPCR dos diferentes vírus recombinantes nas passagens por células	60
Figura 22: Análise da curva de desnaturação (“ <i>melt</i> ”) dos produtos da qPCR utilizando DNA de vírus brotado (BV) dos vírus vAcRepGP64 (azul), vAcΔGP64 (vermelho), vAcCoveGP64 (verde) e vAcDisaF (amarelo)	61
Figura 23: Quantificação da amplificação dos vírus recombinantes nas diferentes passagens por qPCR	62
Figura 24: Análise do perfil proteico de células e sobrenadantes de células infectadas por diferentes vírus recombinantes	63
Figura 25: Imunodeteção das proteínas GP64 e F dos vírus vAcCoveGP64 e vAcDisaF, respectivamente.....	65
Figura 26: Imunodeteção da proteína GP64 em sobrenadante de células infectadas por baculovírus recombinantes	66
Figura 27: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas GP64 de baculovírus.....	68
Figura 28: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas F de baculovírus.....	68
Figura 29: Alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas GP64	70
Figura 30: Alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas F	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	30
Tabela 2: Programas de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados neste trabalho.....	31
Tabela 3: Programa de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizado neste trabalho.	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcGP64	proteína GP64 do AcMNPV
AcMNPV	Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus
BV	<i>“Budded Virus”</i> – vírus brotado
BLAST	<i>“Basic Local Alignment Search Tool”</i> – ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
BSA	<i>“Bovine Serum Albumin”</i> – albumina sérica bovina
CoveGP64	proteína GP64 do CoveNPV
CoveNPV	Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus
C-terminal	carboxi-terminal
cm ²	centímetro quadrado
cm ³	centímetro cúbico
DisaF	proteína F do DisaGV
DisaGV	Diatraea saccharalis granulovírus
DNA	<i>“Deoxyribonucleic Acid”</i> – ácido desoxirribonucleico
d.p.i	dias pós infecção
d.p.t.	dias pós transfecção
EFP	<i>“Envelope Fusion Protein”</i> – proteína de fusão de envelope
et al.	e outros
FWR	<i>“Forward”</i> – anterior; iniciador senso
<i>g</i>	velocidade de sedimentação gravitacional
GC	guanina citosina
GFP	<i>“Green Fluorescent Protein”</i> – proteína verde fluorescente
GV	granulovírus
H	horas
HA-tag	hemaglutinina-tag
h.p.i.	horas pós infecção
h.p.t.	horas pós transfecção
HPV	<i>“Human papillomavirus”</i> – papilomavírus humano
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase
kDa	quilodaltons

LB	Luria Bertani
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
MNPV	multiple nucleopolyhedrovirus
MOI	<i>“Multiplicity of Infection”</i> – multiplicidade de infecção
mRNA	<i>“messenger Ribonucleic Acid”</i> - ácido ribonucleico mensageiro
MUSCLE	<i>“Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation”</i> – comparação de múltiplas sequências a partir da expectativa do Log
ng	nanograma
NPV	nucleopolyhedrovirus
NTC	<i>“No Template Control”</i> – controle de ausência de amostra
N-terminal	amino-terminal
OB	<i>“Occlusion Body”</i> – corpo de oclusão
ODV	<i>“Occlusion Derived Virus”</i> – vírus derivado de oclusão
ORF	<i>“Open Reading Frame”</i> – fase de leitura aberta
P0	Passagem 0
P1	Passagem 1
P2	Passagem 2
pA	poliadenilação
pb	pares de bases
PCR	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i> – reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PS	peptídeo sinal
qPCR	<i>“quantitative Polymerase Chain Reaction”</i> - reação em cadeia da polimerase quantitativa
R ²	coeficiente de determinação
REV	<i>“Reverse”</i> – reverso; iniciador antisenso
s	segundos
SDS-PAGE	<i>“Sodium Docecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”</i> – dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
SNPV	single nucleopolyhedrovirus
SOB ou SOC	<i>“Super Optimal Broth”</i> – caldo super ideal

TBE	Tris/Borato/EDTA
TM	transmembrana
UPGMA	“ <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> ” – método de grupo de pares não ponderados com média aritmética
v	volume
x	vezes
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo”
μ g	micrograma
μ L	microlitro
\geq	maior ou igual
=	igual
<	menor
%	por cento
$^{\circ}$ C	grau Celsius

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Introdução geral aos baculovírus</i>	12
1.2 <i>Ciclo de infecção</i>	14
1.3 <i>Aplicações no uso dos baculovírus</i>	16
1.4 <i>Proteínas de Fusão de Envelope (EFPs)</i>	17
1.5 <i>EFPs e a evolução dos baculovírus</i>	19
1.6 <i>Condylorrhiza vestigialis NPV (CoveNPV)</i>	21
1.7 <i>Diatraea saccharalis GV (DisaGV)</i>	22
2 OBJETIVO	25
2.1 <i>Objetivo geral</i>	25
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	25
3 JUSTIFICATIVA.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 <i>Vírus e células</i>	29
4.2 <i>Amplificação dos genes e clonagem no vetor de transferência</i>	29
4.3 <i>Obtenção dos baculovírus recombinantes</i>	34
4.4 <i>Ensaio de transfecção e infecção in vitro</i>	38
4.5 <i>Contagem de células GFP positivas</i>	39
4.6 <i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)</i>	39
4.6.1 <i>Elaboração de qPCR para curva padrão</i>	39

4.6.2	Elaboração de qPCR para DNA viral	40
4.7	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	41
4.8	<i>Imunodeteccção por Western Blot</i>	41
4.9	<i>Alinhamento de sequências de aminoácidos</i>	43
5	RESULTADOS	45
5.1	<i>Confirmação da clonagem no vetor de transferência</i>	45
5.2	<i>Confirmação da obtenção dos baculovírus recombinantes</i>	49
5.3	<i>Análise da recuperação da infectividade pelas EFPs</i>	51
5.4	<i>Quantificação de células GFP positivas</i>	56
5.5	<i>Quantificação de partículas virais</i>	58
5.5.1	Parâmetros da corrida de qPCR	58
5.5.2	Amplificação do DNA viral	61
5.6	<i>Análise da expressão proteica</i>	62
5.7	<i>Análises filogenéticas</i>	66
5.8	<i>Análise de regiões e domínios proteicos</i>	69
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	86

1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral aos baculovírus

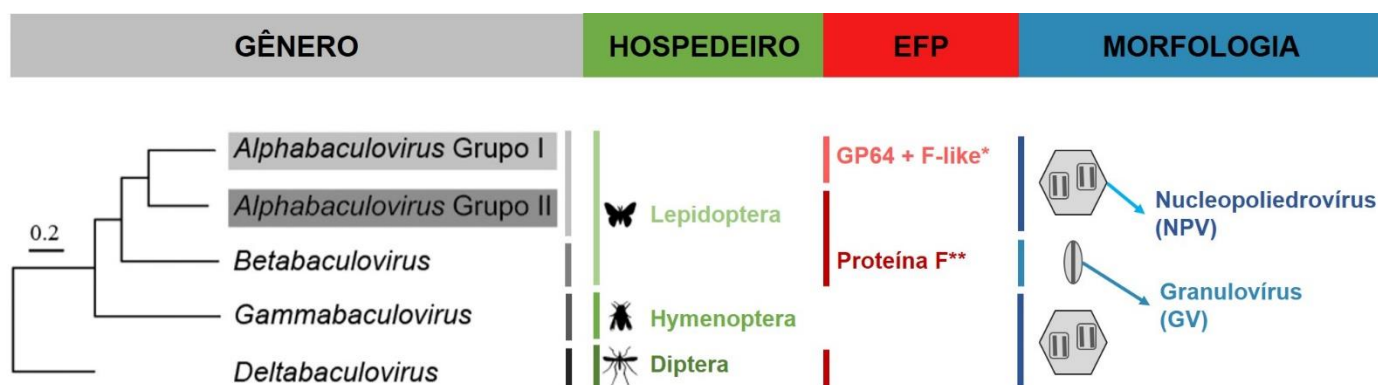
Os baculovírus são um diverso grupo de vírus que infectam insetos de diversas ordens. Eles são caracterizados pela constituição de um DNA de fita dupla, circular, superenrolado, variando entre 80 e 180 kb, codificando em torno de 90 a 180 genes, dos quais 38 são encontrados em todos os genomas de baculovírus. O nucleocapsídeo, que reveste o material genético do vírus, remete ao formato de uma haste, dando origem ao significado do nome baculovírus, derivado de “*baculum*” do latim (ROHRMANN, 2019a).

A família *Baculoviridae* está organizada em quatro gêneros, sendo eles: *Alphabaculovirus* - subdividido em grupo I e II -, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (JEHLE et al., 2006; ZANOTTO; KESSING; MARUNIAK, 1993) (Figura 1). O grupo I dos *Alphabaculovirus* possui 11 genes distintos dos demais baculovírus, dentre eles o gene da proteína GP64 que é a principal proteína de fusão de envelope deste grupo e também um marcador para sua caracterização (MIELE et al., 2011; PEARSON; ROHRMANN, 2002). Os baculovírus do grupo II, assim como os *Betabaculovirus* e os *Deltabaculovirus*, utilizam a proteína F como proteína de fusão de envelope, sendo reportada apenas uma exceção no *Betabaculovirus* *Diatraea saccharalis* granulovírus (DisaGV) que possui tanto a proteína F como também uma proteína homóloga à GP64 (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016a; JIANG et al., 2009). Os baculovírus do grupo I também codificam uma proteína homóloga à F (Ac23) chamada “F-like”, por não possuir atividade fusogênica (PEARSON; RUSSELL; ROHRMANN, 2001). Já os baculovírus do gênero *Gammabaculovirus* não possuem genes homólogos a *gp64* ou *F* e nenhuma outra proteína de fusão de envelope descrita. Os baculovírus do gênero *Alphabaculovirus* são os mais bem caracterizados até o momento, com 55 das 84 espécies reconhecidas atualmente pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), tendo como espécie tipo o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV).

Os fenótipos virais possuem duas formas distintas, sendo o vírus derivado de oclusão, do inglês “*Occlusion Derived Virus*” (ODV), no qual seu envelope deriva da membrana nuclear da célula do hospedeiro; e o vírus brotado, do inglês “*Budded Virus*” (BV), no qual seu envelope deriva da membrana citoplasmática. O ODV é

protegido por um cristal proteico que pode ter o formato de poliedro, chamado nucleopoliedrovírus (NPV) ou o formato de um grânulo, chamado granulovírus (GV). Este cristal é responsável por proteger os vírions em diversas condições ambientais e ele também é chamado de corpos de oclusão, do inglês “*Occlusion Bodies*” (OB). Os poliedros podem conter ODVs organizados de forma simples, com um único nucleocapsídeo dentro do seu envelope (single nucleopolyhedrovirus ou SNPV), como também podem ter vários nucleocapsídeos (multiple nucleopolyhedrovirus ou MNPV), diferenciando dos grânulos que possuem um único vírion ocluído no cristal proteico (ACKERMANN; SMIRNOFF, 1983; FEDERICI, 1986; ROHRMANN, 2019a). A diversidade na quantidade de vírions contidos dentro do ODV demonstra uma vantagem no rápido início da infecção sistêmica observado para MNPV quando comparado com SNPV (WASHBURN et al., 1999).

Seus hospedeiros estão distribuídos em três diferentes ordens de insetos: Lepidóptera, Himenóptera e Díptera. Tanto os baculovírus do gênero *Alphabaculovirus* como do gênero *Betabaculovirus* infectam insetos lepidópteros. Já os *Gammabaculovirus* infectam insetos himenópteros especificamente da subordem Symphyta. Os *Deltabaculovirus* infectam insetos dípteros. O gênero *Betabaculovirus* possui a particularidade de ser composto por baculovírus de morfologia granular, os granulovírus (GVs), que por sua vez só foram reportados infectando insetos lepidópteros. Os demais gêneros da família *Baculoviridae* são compostos por NPVs que foram identificados infectando diferentes ordens de invertebrados (MARTIGNONI; IWAI, 1986).



*CoveNPV só possui GP64

**DisaGV possui F + GP64

Figura 1: Características gerais da família *Baculoviridae* em relação à organização taxonômica, inseto hospedeiro, proteína de fusão de envelope (EFP) do vírus brotado (BV) e morfologia do corpo de oclusão (OB). CoveNPV representa uma exceção nos *Alphabaculovirus* do grupo I contendo apenas a proteína GP64 e DisaGV é uma exceção nos *Betabaculovirus* contendo as proteínas F e GP64. Figura retirada e modificada de RIBEIRO et al. (2015).

1.2 Ciclo de infecção

O ciclo infectivo descrito para um nucleopoliedrovírus começa quando o inseto hospedeiro se alimenta de folhagens contaminadas com corpos de oclusão de baculovírus (OBs) (Figura 2). Ao atingirem o intestino médio do inseto, no qual possui pH alcalino (9,5 a 11,5), os corpos de oclusão são dissolvidos liberando os ODVs que são responsáveis pela infecção primária. Os ODVs atravessam a membrana peritrófica, seu envelope funde com a membrana das microvilosidades das células colunares e os nucleocapsídeos são liberados no citoplasma celular. Os nucleocapsídeos são encaminhados para os poros nucleares, onde eles atravessam e têm acesso à maquinaria de transcrição da célula. Além disso, alguns vírions podem atravessar o citoplasma e alcançar a parte basolateral da célula colunar utilizando a proteína de fusão viral sintetizada de forma precoce e tardia. Este fato explica a presença de vírus infectivo nos hemócitos após 30 minutos da infecção oral por poliedro (GRANADOS; LAWLER, 1981). Etapas na transcrição gênica são caracterizadas tendo como base eventos que precedem a replicação do DNA viral, chamada fase precoce (até 6 h.p.i.), e outra que ocorre depois da replicação, chamada fase tardia (até 18 h.p.i.). Ao longo da transcrição dos genes e da replicação do DNA virais, novos nucleocapsídeos são formados no estroma virogênico e liberados para o citoplasma. Lá, eles se fundem com a membrana celular, levando consigo várias proteínas virais previamente processadas. Dentre elas, a de maior abundância são as proteínas de fusão de envelope (EFPs), que possuem a capacidade de espalhar a infecção de forma sistêmica. Esta nova partícula viral, o BV, inicia a infecção secundária via lâmina basal na qual outras células e tecidos são infectados. Numa fase mais tardia do ciclo de infecção (após 18 h.p.i.), alguns nucleocapsídeos são envelopados dentro do núcleo na forma de ODV e posteriormente são ocluídos na matriz proteica do poliedro. Ao final do ciclo, várias células do inseto estão repletas de corpos de oclusão, afetando a capacidade motora e de alimentação do animal, levando-o a morte. O tegumento do inseto, no qual possui uma grande quantidade de

novos OBs, libera novos vírions no ambiente até que um novo ciclo se inicie em outro animal. Os baculovírus menos caracterizados possuem algumas particularidades não contidas neste modelo de infecção previamente descrito. Alguns deles, por exemplo, podem limitar a infecção às células do intestino somente, não gerando uma infecção sistêmica (RIBEIRO et al., 2015; ROHRMANN, 2019b).

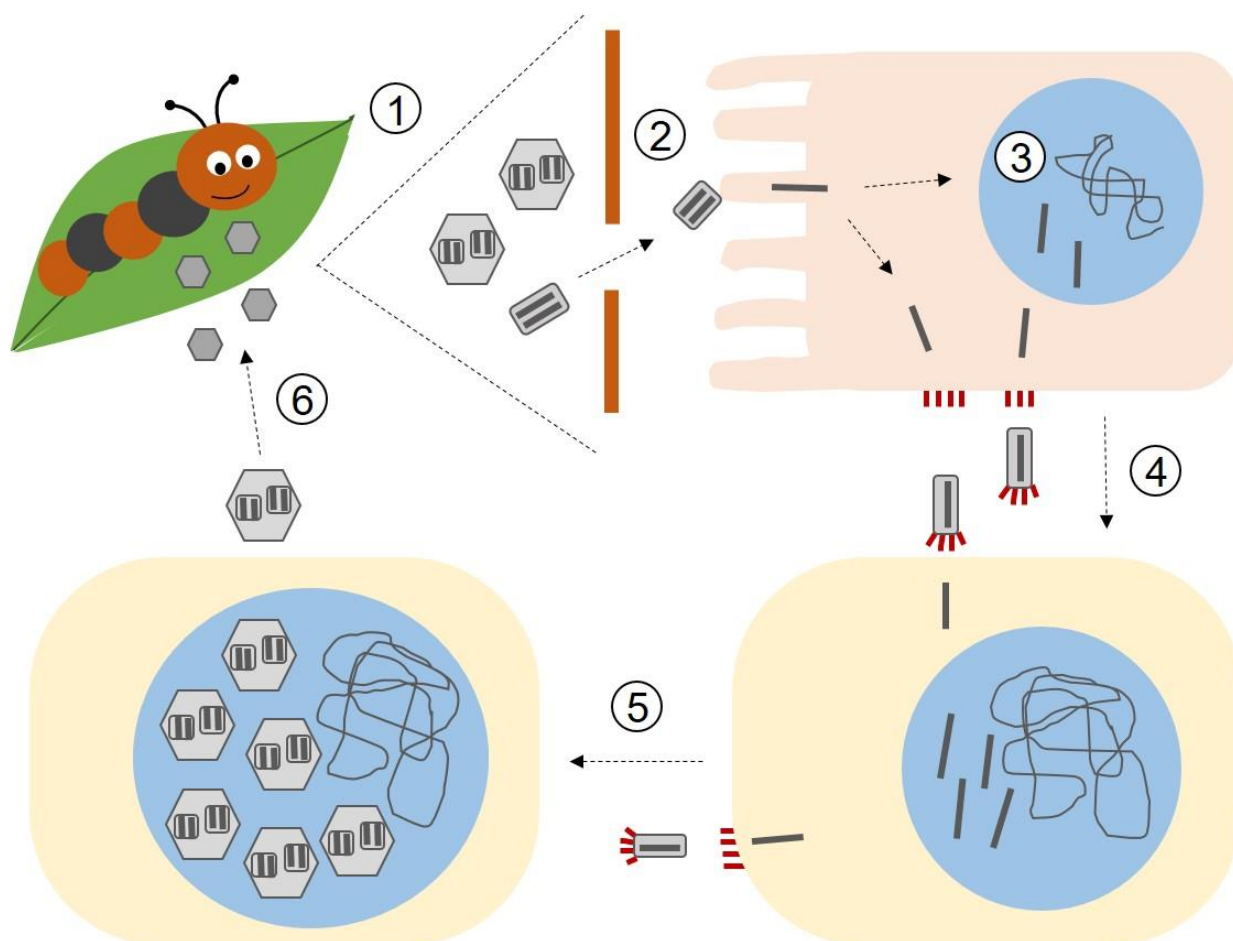


Figura 2: Ciclo de infecção descrito para um nucleopoliedrovírus. **1.** O ciclo se inicia quando o inseto se alimenta de folhas contaminadas com poliedros. Ao atingirem o intestino médio, os poliedros se dissolvem devido o pH alto do ambiente. **2.** Os ODVs são liberados e atravessam a membrana peritrófica, dando acesso às células colunares. O envelope do ODV funde com a membrana das microvilosidades, permitindo a entrada dos nucleocapsídeos dentro da célula. **3.** Os nucleocapsídeos podem ir direto para a membrana plasmática para formar os primeiros vírus brotados ou podem ir até o núcleo onde se inicia a transcrição gênica e a replicação do DNA viral. Novos nucleocapsídeos são produzidos e encaminhados para a membrana citoplasmática. **4.** As partículas virais brotam para fora levando consigo proteínas de fusão de envelope, formando assim o BV. O BV inicia a infecção sistêmica acessando novos tipos de células do animal. **5.** Ao fim da infecção, os nucleocapsídeos são envelopados na forma de ODV e oclusos dentro de novos poliedros. **6.** Após a morte do inseto, os

novos poliedros são liberados na natureza, permitindo que outros animais sejam infectados para um novo ciclo começar.

Apesar do ciclo de infecção dos baculovírus ser semelhante ao de outros vírus de DNA grande, ele apresenta características distintas dentre os demais. Antes da replicação do DNA ocorrer, a transcrição de alguns genes específicos se inicia utilizando a RNA polimerase da célula hospedeira. Nas horas iniciais da fase precoce (chamada de fase imediata) ocorre a transcrição de genes relacionados com a produção de elementos necessários para a replicação acontecer. Na fase tardia, já com o início da replicação de DNA, uma RNA polimerase viral é sintetizada sendo esta responsável pela intensa transcrição de genes virais pós-replicação. Nesta fase, há uma grande produção de proteínas que participam da montagem de novas partículas virais. A fase mais tardia é marcada pela alta síntese de poliedrina, proteína que constitui mais de 95% do OB. Apesar do conteúdo genético dos dois fenótipos virais (ODV e BV) serem idênticos, a constituição proteica de cada um difere, levando a considerar que todo o processo de transcrição e replicação dos baculovírus acontece de forma ordenada e em cascata. Além disso, o fato de os baculovírus utilizarem a RNA polimerase do hospedeiro mesmo sintetizando uma própria o torna único entre outros vírus de eucariontes que replica no núcleo. Este mecanismo, mesmo não totalmente compreendido, possivelmente seja vantajoso para o curso da infecção (RIBEIRO et al., 2015; ROHRMANN, 2019g).

Os baculovírus possuem genes chamados bifásicos que são expressos com intensidade diferente de acordo com o momento do ciclo de infecção. Em AcMNPV são reportados 21 genes bifásicos com múltiplas regiões de regulação da transcrição (CHEN et al., 2013). Dentre eles está o gene *gp64* que é expresso de forma fraca na fase precoce e de forma mais intensa na fase tardia (MORGADO, 2017).

1.3 Aplicações no uso dos baculovírus

Os baculovírus são amplamente utilizados como ferramentas biotecnológicas. A forma mais expressiva do seu uso se dá no campo como um bioinsumo no controle biológico de pragas, dando lugar à uma alternativa mais sustentável no manejo de insetos em culturas de alto valor econômico no Brasil e no mundo. O maior programa de controle de insetos utilizando baculovírus foi desenvolvido no Brasil no início da

década de 80, no combate à lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) com o baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). Na América do Norte e na Europa, se destaca o uso do granulovírus *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) no combate à praga *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) em culturas de pera e maçã. Na China, o uso do *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) tem sido essencial para controlar a lagarta do algodão *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) que apresenta alta resistência aos inseticidas químicos usados para seu controle (ROHRMANN, 2019c).

Outra aplicação muito utilizada é na expressão de proteínas recombinantes de interesse médico ou de pesquisa básica em sistemas baseados em baculovírus e células de insetos, no qual possibilita a inserção de sequências gênicas consideradas grandes, superexpressão de genes com o uso dos promotores fortes como o da proteína principal do OB, poliedrina (Polh), e do polipeptídeo fibroso de 10 KDa (P10), processamento proteico em célula eucariótica em número consideravelmente elevado e segurança na sua manipulação por ser um vírus específico de insetos. Também são usados como vetores de entrega de genes em terapia gênica e na produção de vacinas como por exemplo, contra os vírus influenza e do papiloma vírus humano (HPV) (RIBEIRO et al., 2015; ROHRMANN, 2019d).

1.4 Proteínas de Fusão de Envelope (EFPs)

Os vírus envelopados entram nas células dos hospedeiros através de fusão direta com a membrana citoplasmática ou por meio de endocitose mediada por receptores. Proteínas presentes no envelope viral são responsáveis pela fusão das membranas, possibilitando a entrada do vírus na célula e consequente replicação do seu material genético para produção de novas partículas virais. Essas proteínas são chamadas de proteínas de fusão de envelope, do inglês, *Envelope Fusion Protein* (EFP). Elas possuem formas diferentes de serem ativadas e, por isso, são classificadas como EFP de Classe I, II ou III, sendo que as proteínas de fusão presentes nos baculovírus são de Classe I e III (HARRISON, 2015).

A proteína GP64 (Ac128) do baculovírus AcMNPV, um *Alphabaculovirus* do grupo I, é um trímero formado por subunidades de cinco domínios, onde os monômeros se unem por ligações dissulfeto. Seu peptídeo de fusão está localizado dentro de dois *loops* que se encontram ao final da estrutura pós-fusão. Ela é

classificada como uma proteína de fusão de Classe III e é ativada em pH baixo sem a necessidade de clivagem (KADLEC et al., 2008). Além da fusão direta com a membrana da superfície celular, a GP64 é capaz de proporcionar a entrada do vírus através de endocitose em células de inseto, como também em várias linhagens de células de mamíferos (DONG et al., 2010).

Estudos prévios já demonstravam que a GP64 de baculovírus sozinha era suficiente para fusionar membranas e que ela era uma proteína essencial para o espalhamento do vírus pelas células do hospedeiro durante o ciclo de infecção (BLISSARD; WENZ, 1992; MONSMA; OOMENS; BLISSARD, 1996). Dada sua relevância, foi inesperada a constatação de que muitos outros baculovírus caracterizados após o AcMNPV não possuíam um gene homólogo ao *gp64*, mas sim, uma outra EFP chamada proteína F (IJKEL et al., 1999; KUZIO et al., 1999). Além disso, foi visto que aqueles que expressavam a proteína GP64, também possuíam uma F homóloga (Ac23) - a "*F-like*" - que apesar de não ser essencial para a replicação do vírus em culturas de células, ela aumenta a mortalidade de insetos hospedeiros infectados. Essas constatações reforçam a hipótese de que um baculovírus adquiriu o gene *gp64* em um evento de recombinação, substituiu a função de fusão da proteína F, mas manteve este gene por possivelmente desempenhar um papel de fator de virulência durante a infecção (LUNG; CRUZ-ALVAREZ; BLISSARD, 2003; PEARSON; ROHRMANN, 2002).

A proteína F pertence a Classe I de proteínas de fusão de envelope. Ela é expressa como uma proteína precursora (F_0) de cadeia única trimérica que posteriormente é clivada por uma protease celular do tipo furina, gerando duas subunidades ligadas por uma ligação dissulfeto. Esta clivagem gera um fragmento com a porção C-terminal (F_1) e outro fragmento com a porção N-terminal (F_2). A partir da clivagem, o peptídeo de fusão, que está localizado próximo ao N-terminal do novo fragmento F_1 , fica exposto, gerando uma mudança conformacional em pH baixo ou a partir da ligação a receptores celulares, possibilitando a entrada do vírus na membrana alvo. Sua estrutura, organização de domínios e constituição de aminoácidos são bem distintas quando comparadas à GP64, o que explica o modo de atuação de cada uma delas (IJKEL et al., 2000; KADLEC et al., 2008; WESTENBERG et al., 2002).

Apesar das diferenças significativas, as proteínas GP64 e F de baculovírus podem ser consideradas análogas funcionais no que se refere à função de ataque e

fusão de membranas. Um estudo demonstrou que as proteínas F do *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV), *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) e *Helicoverpa armigera* NPV (HearNPV), *Alphabaculovirus* do grupo II, conseguiram substituir a GP64 do AcMNPV e recuperar sua infectividade (LONG et al., 2006; LUNG et al., 2002). Outros estudos demonstraram que as proteínas F dos granulovírus *Agrotis segetum* GV (AgseGV), *Xestia c-nigrum* GV (XecnGV), *Cydia pomonella* GV (CpGV) e *Phthorimaea operculella* GV (PhopGV) conseguiram pseudotipar um AcMNPV sem o gene *gp64*. Por outro lado, o *Choristoneura occidentalis* GV (ChocGV) não conseguiu recuperar de forma eficiente a infectividade do AcMNPV e o *Plutella xylostella* GV (PlxyGV) não apresentou nenhum sinal de infecção (YIN et al., 2008, 2013). Em um cenário oposto de substituição da proteína F de NPVs do grupo II pela GP64 do AcMNPV, o SeMNPV não obteve sua infectividade recuperada, enquanto que o HearNPV pode ser pseudotipado com baixa eficiência apresentando anomalias morfológicas, mas obteve alta eficiência de fusão quando somada a F-like do AcMNPV (WANG et al., 2010, 2014; WESTENBERG; VLAK, 2008).

1.5 EFPs e a evolução dos baculovírus

O cenário da história evolutiva dos baculovírus e suas proteínas de fusão de envelope indica possível aquisição, substituição e transferência de genes entre vírus de outras famílias (Figura 3). Os genes *gp64* ortólogos presentes nos baculovírus e nos ortomixovírus do gênero *Thogotovirus* apontam para uma ancestralidade comum de acordo com a organização estrutural de suas proteínas (PENG et al., 2017; ROHRMANN, 2019e). Já a proteína F teve origem nos baculovírus e demonstra ter sido posteriormente incorporada por um retrotransposon de inseto convertendo-o em um retrovírus de inseto do gênero *Errantivirus* (ROHRMANN, 2019f; ROHRMANN; KARPLUS, 2001). Eventos de recombinação entre esses diferentes vírus podem ter mudado suas relações com os hospedeiros e gerado novas perspectivas evolutivas (PEARSON; ROHRMANN, 2002).

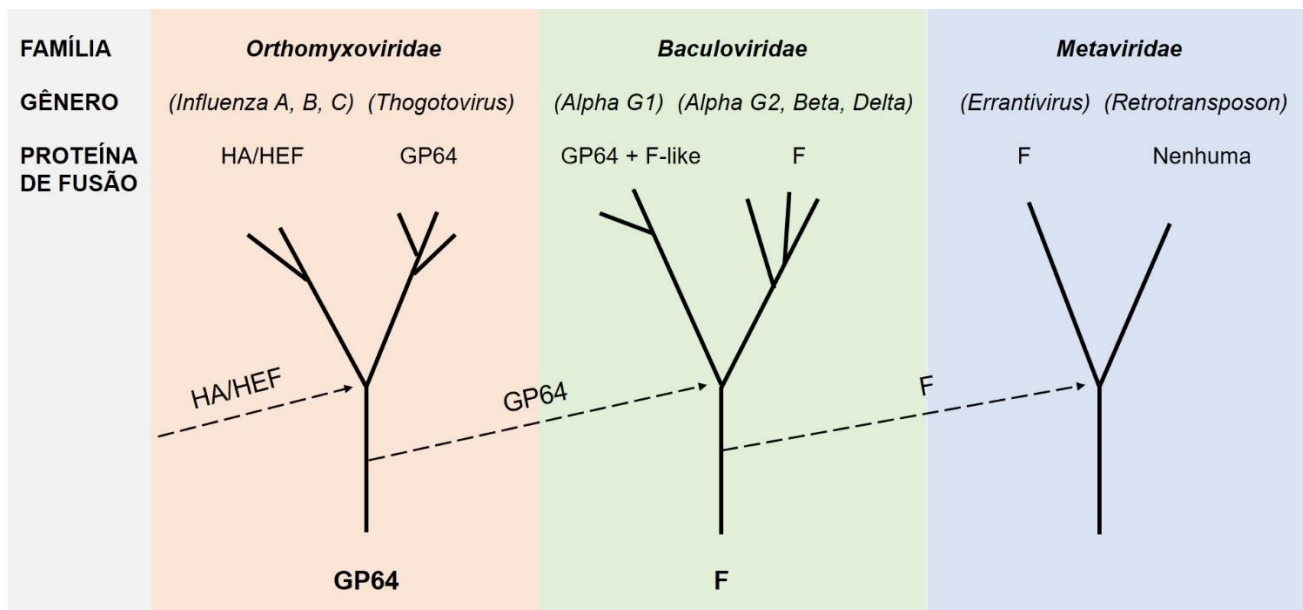


Figura 3: Modelo esquemático de prováveis eventos de aquisição, substituição e transferência de genes de proteínas de fusão de envelope entre diferentes famílias de vírus.

Há diversas evidências que sustentam a hipótese de ancestralidade da proteína F e posterior aquisição da GP64 por um baculovírus ancestral (JIANG et al., 2009). O fato de que genes da proteína F estão distribuídos na maior parte dos baculovírus caracterizados e que esses genes possuem menos de 40% de similaridade de aminoácidos, dão pistas de uma aquisição muito mais ancestral na família *Baculoviridae*. O maior tempo de adaptação da proteína F aos seus hospedeiros a torna mais dependente de fatores intrínsecos a eles, como receptores celulares específicos. Este fato também colabora para a evidência de que as proteínas F são mais hábeis em entrar nas células por endocitose do que por fusão direta. Em contraste, a proteína GP64 está contida em um grupo restrito de baculovírus, possui mais de 70% de conservação na sequência de aminoácidos e demonstra mais habilidade em proporcionar fusão direta em pH baixo, não dependendo de muitos fatores ligados ao hospedeiro. Além disso, este mesmo grupo que possui GP64 também possui uma F-like, que pode ter sofrido pressão seletiva e perdido sua função de fusão (BLISSARD; THEILMANN, 2018; PEARSON; GROTEN; ROHRMANN, 2000; WANG et al., 2014).

Os motivos pelos quais o gene da proteína F-like ainda está presente nos NPVs do grupo I ainda não são claros, mas há estudos que apontam para um aumento no

número de vírions oclusos (ODV), um possível aumento na infectividade do BV e uma alta na patogenicidade do vírus como anteriormente citada, levantando a hipótese de que esta proteína pode exercer uma outra contribuição ao vírus quando na presença de outra EFP (WANG et al., 2008; YU et al., 2009).

A relevância das proteínas de fusão de envelope no sucesso da infecção pelos baculovírus e o contexto evolutivo no qual elas estão inseridas demonstram a necessidade de melhor conhecer a grande variedade de sequências de EFPs dispostas em bancos de dados.

1.6 *Condylorrhiza vestigialis* NPV (CoveNPV)

A lagarta desfolhadora *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), popularmente chamada de mariposa do álamo, é considerada a principal praga em plantações de espécies arbóreas conhecidas como álamos (família Salicaceae, gênero *Populus*). Culturas de álamos são muito expressivas na região Sul do Brasil, também sendo matéria-prima para fabricação de produtos derivados de madeira e candidata no uso como fonte de biocombustível. O primeiro estudo notificando lagartas *C. vestigialis* naturalmente infectadas por um baculovírus foi feito em 2003 com amostras provenientes da região de São Mateus do Sul no estado do Paraná, Brasil. Se trata de um nucleopoliedrovírus contendo múltiplos nucleocapsídeos oclusos em uma matriz proteica em formato de poliedro, denominado *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus (CoveNPV) (CASTRO et al., 2003). Posteriormente, outro estudo foi publicado trazendo mais detalhes acerca da morfologia e composição molecular da partícula viral (CASTRO et al., 2009).

Seu genoma apresenta 125.767 pb, 42% de conteúdo GC e 138 possíveis ORFs, das quais 38 são encontradas nos demais baculovírus. Análises filogenéticas mostraram que o CoveNPV faz parte do grupo I dos *Alphabaculovirus* e que ele está mais intimamente relacionado com os baculovírus AgMNPV e Choristoneura fumiferana DEF multiple nucleopolyhedrovirus (CfDEFMNPV), tanto em relação aos 38 genes comuns quanto ao gene *gp64* da proteína de fusão de envelope. Um fato curioso presente no seu genoma é a ausência do gene *ac23* comum entre os *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (CASTRO et al., 2017). Este gene codifica a proteína F-like no grupo I dos NPVs e, apesar de não ser essencial para ocorrer fusão de membranas, ela demonstra desempenhar outros papéis importantes durante a infecção viral (WANG et al., 2014).

Apesar da sequência gênica do CoveNPV estar disponível em bancos de dados para análise e seu uso como controle biológico já estar disponível (Baculovírus Álamo - Bosquioli & Santos Ltda), pouco ainda se sabe sobre sua biologia molecular, sendo de grande importância mais estudos para melhor caracterizá-lo.

1.7 *Diatraea saccharalis* GV (DisaGV)

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) do mundo, sendo a principal matéria-prima na produção de etanol e açúcar. Segundo o primeiro levantamento da safra 2021/22 feito pela Companhia Nacional de Abastecimento, estima-se que a produção de cana-de-açúcar seja de 628,1 milhões de toneladas (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021). A lagarta da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), representa a maior preocupação para os produtores de cana-de-açúcar, causando prejuízos nas safras e, conseqüentemente, na economia brasileira. Em 2009, lagartas de *D. saccharalis* infectadas por um possível vírus foram coletadas no estado do Paraná, Brasil. A confirmação de que o agente causador da infecção se tratava de um novo baculovírus veio posteriormente, sendo então denominado *Diatraea saccharalis* granulovírus (DisaGV). O DisaGV apresenta morfologia granular, com um único nucleocapsídeo envolto por uma matriz proteica de granulina, sendo características de um integrante do gênero *Betabaculovirus*. Seu genoma possui 98.392 pb, com 29.7% de conteúdo de GC e 125 ORFs preditas. Análises filogenéticas baseadas em sequências de aminoácidos de 37 proteínas encontradas em todos baculovírus, demonstraram um agrupamento do DisaGV com vários granulovírus já caracterizados anteriormente (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016a).

Muito além da descoberta de um novo baculovírus em uma cultura de valor econômico relevante, o sequenciamento do DisaGV trouxe o conhecimento de uma exceção muito singular: a presença de um gene homólogo ao *gp64* em um betabaculovírus. Além disso, também foi verificada a presença do gene *F* (Ac23 homólogo) com algumas deleções ao longo dos *reads*. Sabendo que a proteína GP64 é exclusiva do grupo I dos NPVs e que a proteína F é a EFP responsável por mediar a ligação e fusão de membranas nos granulovírus, um evento de transferência horizontal de genes pode ter ocorrido entre um alphabaculovírus do grupo I e um betabaculovírus (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016a; JIANG et al., 2009). A relevância da presença do gene *gp64* no DisaGV foi analisada em outro estudo no qual

demonstrou que este gene inserido no AcMNPV sem sua EFP nativa, expressa uma proteína funcional capaz de fundir membranas e espalhar a infecção por novas células (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016b). No entanto, análises acerca da funcionalidade da proteína F ainda não foram realizadas, sendo necessários estudos para melhor compreender o cenário evolutivo ao qual este baculovírus está inserido.

2

Objetivo

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo elaborar uma análise funcional das proteínas de fusão de envelope (EFPs) de diferentes baculovírus, sendo elas a GP64 do *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* (CoveNPV), um *Alphabaculovirus* do grupo I, e a proteína F do *Diatraea saccharalis granulovirus* (DisaGV), um *Betabaculovirus*.

2.2 Objetivos específicos

- Construir baculovírus recombinantes inserindo o gene da proteína GP64 do CoveNPV e da proteína F do DisaGV em um bacmídeo baseado no genoma do AcMNPV (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) sem a sua proteína GP64 endógena (*gp64*-null AcMNPV);
- Avaliar a recuperação da infectividade viral dos baculovírus recombinantes construídos em diferentes passagens por culturas de células de inseto;
- Comparar a quantidade de DNA viral encontrado entre os sobrenadantes de células infectadas com os baculovírus recombinantes;
- Verificar a expressão das proteínas de fusão de envelope pelos baculovírus recombinantes em extratos de células infectadas;
- Analisar as relações filogenéticas existentes entre as proteínas de fusão de envelope encontradas em baculovírus em relação às EFPs dos vírus aqui estudados;
- Determinar as regiões e domínios proteicos que são relevantes para a correta função destas proteínas em comparação a outros baculovírus.

3

Justificativa

3 JUSTIFICATIVA

As proteínas de fusão de envelope desempenham um papel crucial durante o ciclo de infecção dos baculovírus, sem a qual seria inviável o acesso das partículas virais aos receptores celulares dos hospedeiros e, conseqüentemente, a geração de uma progênie viral infectiva. O grau de infectividade e especificidade dos baculovírus são características indispensáveis, sabendo que este vírus é uma ferramenta de controle biológico muito bem estabelecida há décadas ao redor do mundo, representando uma alternativa de tecnologia limpa e sustentável na agricultura. Além disso, os baculovírus tem sido amplamente utilizados como vetores de expressão de proteínas heterólogas podendo ter inúmeras aplicações em estudos e na elaboração de produtos e serviços para a saúde.

Com tamanha relevância, se faz necessário conhecer os mecanismos de ação das EFPs na relação vírus-hospedeiro, verificar a possibilidade de alcance destas proteínas a baculovírus de outros gêneros, identificar o grau de compatibilidade a nível molecular entre diferentes baculovírus, melhor compreender sua história evolutiva e, assim, elucidar novas rotas de aplicações biotecnológicas no campo ou na saúde.

Sabendo que existem duas proteínas de fusão de envelope distintas na família *Baculoviridae* e que elas se agrupam de maneira a distinguir os gêneros desta família de vírus, foram escolhidas duas proteínas presentes nos dois gêneros de baculovírus mais estudados para melhor representar esse contexto taxonômico: a proteína GP64 do *Alphabaculovirus* CoveNPV e a proteína F do *Betabaculovirus* DisaGV.

Com isso, os objetivos deste trabalho foram traçados tendo como base duas hipóteses elaboradas:

- 1) Primeiro, que a proteína GP64 do CoveNPV seria capaz de recuperar a infectividade de um *gp64*-null AcMNPV dada a relação filogenética próxima entre estes dois baculovírus;
- 2) Segundo, que a proteína F do DisaGV não seria capaz de recuperar, de forma eficiente, um *gp64*-null AcMNPV por estes baculovírus possuírem uma grande distância evolutiva.

4

Material e

Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus e células

O DNA viral do CoveNPV foi obtido a partir de larvas de *C. vestigialis* naturalmente infectadas, encontradas em plantações de álamo em São Mateus do Sul, Paraná, e cedido em colaboração com a Dra. Maria Elita Batista de Castro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF (CASTRO et al., 2003). O DNA viral do DisaGV foi extraído de larvas de *D. saccharalis* naturalmente infectadas, encontradas em plantações de cana-de-açúcar na região Sudeste do Brasil (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016a). O baculovírus recombinante *gp64*-null AcMNPV recuperado com a proteína GP64 do AcMNPV, aqui denominado vAcRepGP64 e utilizado como controle positivo para os ensaios, já havia sido construído por ARDISSON-ARAÚJO et al. (2016b).

Células eletrocompetentes DH10B™ (Max Efficiency®, Invitrogen) proveniente da espécie de bactéria *Escherichia coli*, foram utilizadas na geração de clones contendo os genes de interesse. Para geração dos baculovírus recombinantes, foram utilizadas células de *E. coli* da linhagem DH10Bac™ (Invitrogen) que contém um cromossomo artificial bacteriano (BAC, do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome*), no qual possui o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo (bMON14272), presente no sistema de expressão baseado em baculovírus Bac-to-Bac® (Invitrogen) desenvolvido por LUCKOW et al. (1993) e, posteriormente, modificado por LUNG et al. (2002). Essa modificação consiste na substituição do gene *gp64* pelo gene de resistência à cloranfenicol (*cat*) através de recombinação homóloga, dando origem ao bacmídeo aqui denominado de *gp64*-null AcMNPV.

Os vírus recombinantes foram propagados em culturas de células BTI-Tn5B1-4 (Tn5B) (GRANADOS et al., 1994) derivadas de ovário do inseto *Trichoplusia ni* (Lepidoptera - Noctuidae). As células foram mantidas em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (BSA) (Vitrocell - Embriolife) a 27 °C.

4.2 Amplificação dos genes e clonagem no vetor de transferência

Para amplificar e clonar os genes das proteínas no vetor de transferência, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para cada gene sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* - IDT (Tabela 1). Para o gene da proteína GP64 do

CoveNPV (CoveGP64), foram desenhados os oligonucleotídeos COVE_F contendo o sítio de restrição *NotI* e COVE_R HA pA contendo o sítio de restrição *PstI*, uma sequência de um peptídeo marcador (Tag) derivada da proteína hemaglutinina do vírus da influenza humana (HA-tag), situada na região C-terminal da proteína para marcação imuno específica e uma sequência de sinal de poliadenilação (poli-A). Para o gene da proteína F do DisaGV (DisaF), foram desenhados os oligonucleotídeos DISA_F com o sítio de restrição *Apal* e DISA_R HA com o sítio de restrição *NotI* e uma sequência de HA-tag também na região C-terminal da proteína.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência 5' → 3'
COVE_F	AATGCGGCCGCATGGTGAAAATTGCTCTCTTAGTCTTGATG
COVE_R HA pA	CAGCTGCAGTTTATTCGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGT ATGGGTAATGACGCGTACAAAACATAA
DISA_F	ATTGGGCCCATGTGGATTTTTTTGGCACTATTAC
DISA_R HA	CAGGCGGCCGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT AGGTAAGCAAATTTTTTATTTTA
GP64 F	CTGTTAGAATTCGTTCCAGATAGCCATCGTGAT
pUC/M13 FWR	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13 REV	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG
Acie1FWR	CCATCGCCCAGTTCTGCTTA
Acie1REV	CTGTTCAAGGGTTGCACAGC

Os genes das proteínas CoveGP64 e DisaF foram amplificados a partir das amostras de DNA total dos vírus selvagens por uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguindo protocolo da enzima *Q5™ High Fidelity DNA polymerase* (New England BioLabs), com programa descrito na Tabela 2 e tempo de extensão em a) para obtenção dos fragmentos de DNA dos genes de interesse.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, com solução tampão TBE 0,5 x, utilizando aparatos da Bio-Rad Laboratories e marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (KASVI). As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA das proteínas CoveGP64 e DisaF foram cortadas do gel de agarose, o DNA foi purificado e aluído com água estéril de acordo

com o protocolo do *Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Tabela 2: Programas de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados neste trabalho.

Desnaturação inicial	94 °C, 4 min
Ciclo de extensão (30 repetições)	Desnaturação: 94 °C, 30 s
	Anelamento: 50 °C, 30 s
	Extensão: a) 72 °C, 2 min
	b) 72 °C, 3 min c) 72 °C, 7 min
Extensão final	72 °C, 10 min
“Overnight”	12 °C

O plasmídeo doador pFB-pAcgp64-pA-PG (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016b) (Figura 4) foi utilizado como vetor de transferência para possibilitar a inserção dos genes das proteínas de interesse no genoma do *gp64*-null AcMNPV. Esse plasmídeo doador foi construído a partir do vetor pFastBac™1 (Invitrogen), no qual possui os flancos Tn7R e Tn7L reconhecidos pela enzima transposase que promove a transposição da região contida entre os flancos para o genoma do baculovírus. Além dos genes de resistência à ampicilina e gentamicina já contidos no vetor pFastBac™1, foi adicionado o gene da poliedrina do AcMNPV (AcPOLH) controlado pelo promotor da poliedrina do AcMNPV (prAcPOLH), o promotor do gene *gp64* do AcMNPV (prAcGP64) para controlar o gene da proteína de fusão de envelope (EFP) a ser inserida e o gene *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) da proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* (Leptomedusae - Aequoreidae), controlado pelo promotor do gene *ie1* (*immediate early 1*) do AcMNPV (prAcIE1). Após às regiões gênicas, também foram adicionadas regiões de sinal de poliadenilação do vírus SV40 poli-A para controlar o processamento dos mRNAs gerados.

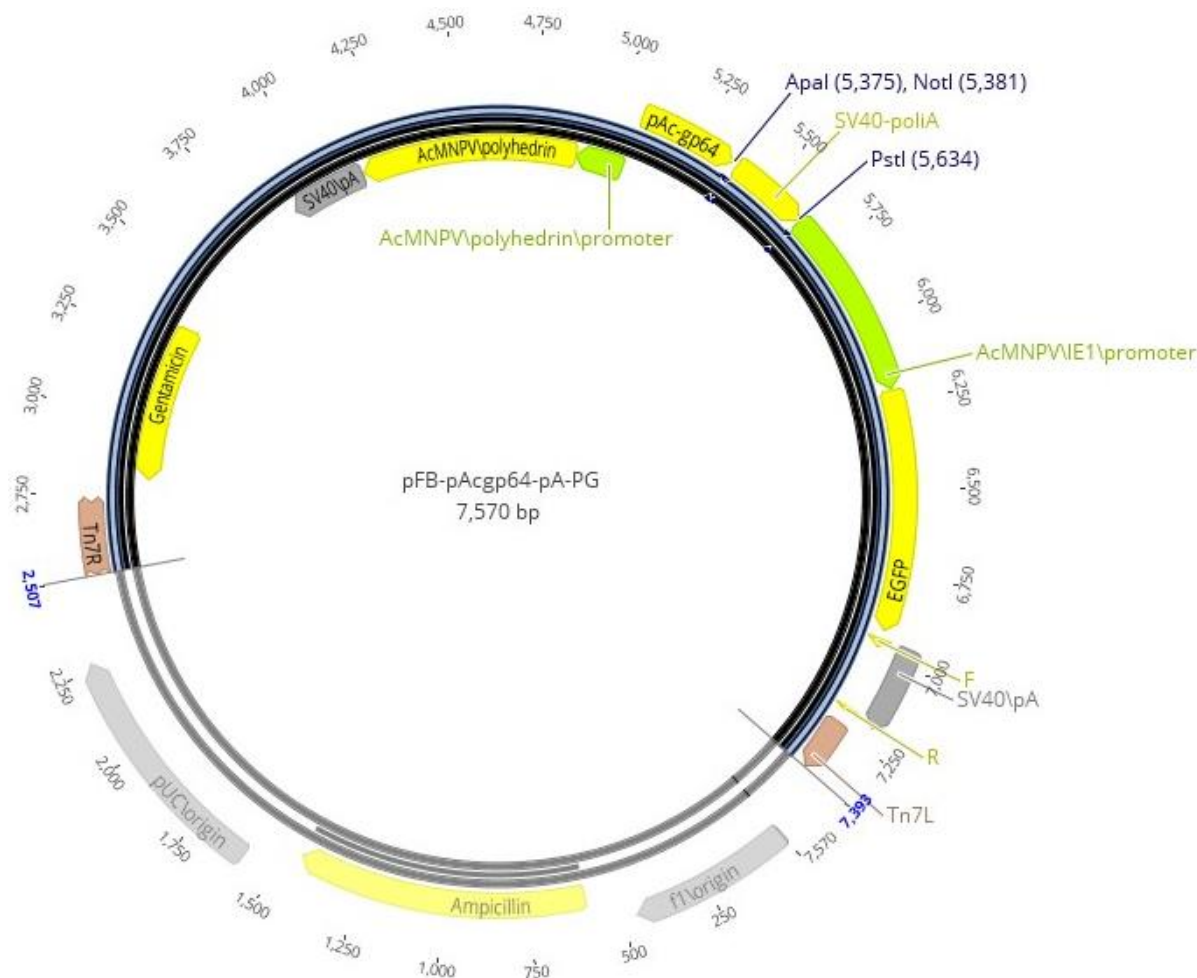


Figura 4: Mapa vetor do plasmídeo doador pFB-pAcgp64-pA-PG. Plasmídeo contendo flancos de transposição Tn7R e Tn7L, genes de resistência à ampicilina e gentamicina, gene da poliedrina do AcMNPV (AcPOLH) controlado pelo seu respectivo promotor (prAcPOLH), o promotor do gene gp64 do AcMNPV (prAcGP64) para controlar o gene da proteína de fusão de envelope a ser inserida, o gene *egfp* da proteína verde fluorescente (GFP) controlado pelo promotor do gene *immediate early 1* do AcMNPV (prAcIE1) e regiões de sinal de poliadenilação (SV40 poli-A) ao final das regiões gênicas. Região referente à transposição para o genoma do *gp64*-null AcMNPV em destaque. Figura gerada no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters).

Reações de digestão utilizando enzimas de restrição foram elaboradas com o DNA dos genes de interesse (inserto) como também com o plasmídeo doador (vetor), seguindo o manual *Assembly of Restriction Enzyme Digestions* (Promega) para cada tipo de enzima. Para a clonagem do gene da proteína CoveGP64 no vetor pFB-pAcgp64-pA-PG, foram realizadas digestões duplas com as enzimas *NotI* e *PstI* para 2 µg de inserto e 2 µg de vetor separadamente. Com isso, a região referente a SV40

poli-A situada entre os promotores prAcGP64 e prAcIE1 foi retirada, sendo o sinal de poliadenilação substituído por outro sinal de poli-A adicionada ao final do gene através do oligonucleotídeo COVE_R HA pA. Esta estratégia de clonagem foi adotada devido à presença de dois sítios de restrição de *Apal* presentes ao longo da sequência de nucleotídeos do gene da proteína GP64 do CoveNPV, dificultando o uso dos sítios *Apal* e *NotI* presentes logo após a região do promotor prAcGP64. As reações de digestão foram conservadas a -20 °C até a sua purificação.

Para a clonagem do gene da proteína DisaF no vetor pFB-pAcgp64-pA-PG, foram elaboradas reações de digestão para 4 µg de inserto e 4 µg de vetor, separadamente, com a enzima de restrição *NotI* e, em seguida, purificadas de acordo com o protocolo do *Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Outra reação de digestão foi executada com a enzima *Apal*, de forma separada com o DNA purificado do inserto e do vetor anteriormente digeridos. Ao final, todas as reações de digestão para clonagem dos genes das proteínas CoveGP64 e DisaF foram purificadas a partir de eletroforese em gel de agarose 0,7% em solução tampão TBE 0,5 x, seguindo instruções do *Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

A ligação dos insertos com os vetores foi elaborada em uma reação de ligação seguindo protocolo da *T4 DNA ligase* (Promega). A ligação foi dialisada em membrana hidrofóbica com água ultrapura por 15 min. Quatro microlitros das ligações foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes DH10B™ seguindo instruções descritas por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989), suplementadas com 1 mL de meio SOC (do inglês, *Super Optimal Broth* – caldo super ideal) e mantidas a 37 °C por uma h em agitação. As transformações foram plaqueadas em placas de Petri 90 x 15 mm, com 20 mL de meio LB (Luria Bertani) sólido, suplementado com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e gentamicina (7 µg/mL), e mantidas a 37 °C por 16 h.

Para confirmação das colônias obtidas, uma PCR de colônia foi elaborada conforme método estabelecido por BERGKESSEL & GUTHRIE (2013) e protocolo do *G2 Green Master Mix* (Promega), utilizando o oligonucleotídeo GP64 F (Tabela 1) que anela na região 5' do promotor do gene *gp64* do AcMNPV (prAcGP64), juntamente com o oligonucleotídeo COVE_R HA pA para as colônias correspondentes a CoveGP64 e o oligonucleotídeo DISA_R HA para as colônias de DisaF. O programa utilizado está descrito na Tabela 2 com tempo de extensão em b). Os fragmentos

obtidos na PCR de colônia foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em solução tampão TBE 0,5 x, com marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig).

As colônias correspondentes aos clones foram inoculadas em 20 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 7 µg/mL de gentamicina, mantidas a 37 °C por 16 h sob agitação. O DNA plasmidial das bactérias foi extraído seguindo protocolo do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) e conservado a -20 °C até a sua utilização. Após a obtenção do DNA purificado dos bacmídeos, foi enviada parte do material para ser analisado através de sequenciamento do tipo Sanger desenvolvido na empresa Macrogen (Coréia do Sul).

4.3 Obtenção dos baculovírus recombinantes

Através da utilização do sistema de expressão de proteínas heterólogas Bacto-Bac® (Invitrogen), foram obtidos os baculovírus recombinantes utilizados neste trabalho. Este sistema de expressão se utiliza de um vetor de transferência, com o gene de interesse nele clonado, para transpor a região contida entre os flancos mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L) no qual possuem propriedades do transposon bacteriano Tn7. Também constitui esse sistema as células competentes DH10Bac™, que possuem o genoma completo do AcMNPV na forma de um plasmídeo (também chamado de bacmídeo) e um outro plasmídeo auxiliar chamado “helper”, responsável por expressar uma transposase (LUCKOW et al., 1993). Com a transformação destas células juntamente com o vetor de transferência, o bacmídeo recombinante é formado a partir da transposição sítio-específica entre os flancos mini-Tn7 do vetor de transferência e o sítio de ligação mini-attTn7 presente no bacmídeo (Figura 5). Com esta ferramenta biotecnológica é possível obter, em poucos dias, bacmídeos recombinantes capazes de transfectar células de inseto e expressar proteínas heterólogas sob o comando de promotores fortes.

A primeira etapa de confirmação dos bacmídeos recombinantes é através da coloração das colônias obtidas quando submetidas ao cultivo em meio LB sólido suplementado por antibióticos e indutores a depender do vetor de transferência utilizado. Isso ocorre por que o sítio de ligação mini-attTn7 do bacmídeo está inserido na sequência do peptídeo LacZα do vetor de clonagem pUC (New England Biolabs). Conforme a transposição ocorre, as colônias de bactérias permanecem com a cor

branca e, quando não ocorre, obtêm a coloração azul na presença do substrato X-Gal. A segunda etapa de confirmação se dá por uma reação de PCR de colônia com os oligonucleotídeos comerciais pUC/M13 FWR e pUC/M13 REV (Tabela 1) para analisar a presença da região de transposição nas colônias obtidas.

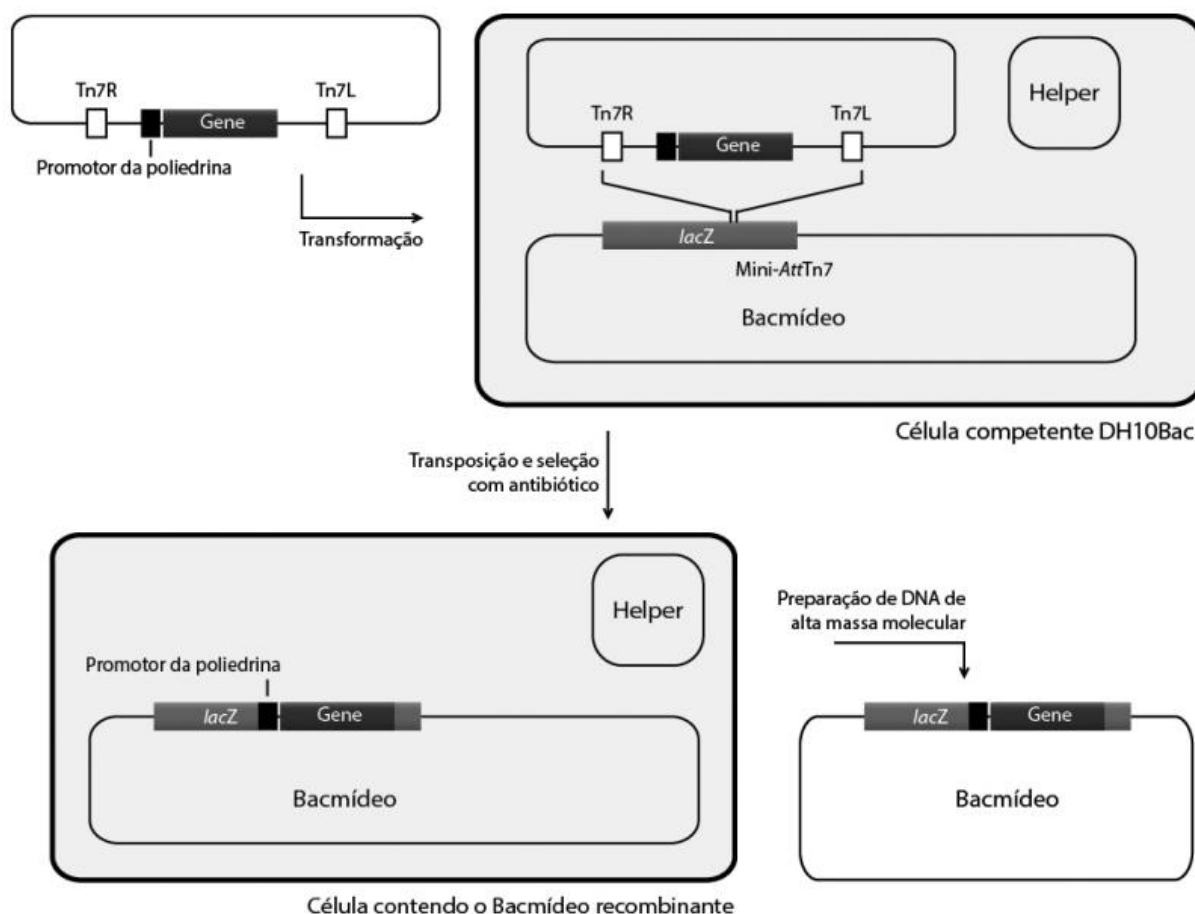


Figura 5: Esquema representativo do sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado em baculovírus Bac-to-Bac® (Invitrogen). A partir de um plasmídeo doador utilizado como vetor de expressão, o gene de interesse é transposto para o genoma do AcMNPV contido dentro da célula DH10Bac™ na forma de um plasmídeo (bacmídeo). Esta célula também possui o plasmídeo "helper" que expressa uma transposase que atua em uma ligação sítio-específica entre os flancos mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L) do vetor de expressão e a região mini-attTn7 do bacmídeo, sendo este último inserido na sequência do peptídeo LacZα para facilitar a seleção das colônias de bactérias. Uma vez obtida a colônia com o bacmídeo recombinante, o DNA plasmidial é extraído para ser transfectado em culturas de células de insetos para, então, ser expressa a proteína de interesse. Imagem retirada de RIBEIRO et al. (2015).

Neste trabalho foi utilizado o sistema de expressão Bac-to-Bac® (Invitrogen) baseado no genoma de um AcMNPV no qual o gene *gp64* endógeno foi deletado e substituído, por meio de recombinação homóloga, pelo gene cloranfenicol acetiltransferase (*cat*) que confere resistência à cloranfenicol (LUNG et al., 2002), aqui denominado *gp64*-null AcMNPV. Nele foi inserido, por meio do plasmídeo doador pFB-pAcgp64-pA-PG, o gene da proteína CoveGP64 dando origem ao bacmídeo (bac) bacAcCoveGP64, e o gene da proteína DisaF gerando o bacmídeo bacAcDisaF. Como controle positivo, foi adotado o bacmídeo recombinante denominado bacAcRepGP64 anteriormente construído por ARDISSON-ARAÚJO et al. (2016b), no qual é um *gp64*-null AcMNPV reparado novamente com a proteína GP64 do AcMNPV, obtendo seu potencial infectivo recuperado. Como controle negativo, foi construído um bacmídeo a partir do *gp64*-null AcMNPV sem a inserção de uma EFP denominado bacAcΔGP64, sendo assim, um vírus sem potencial infectivo (Figura 6).

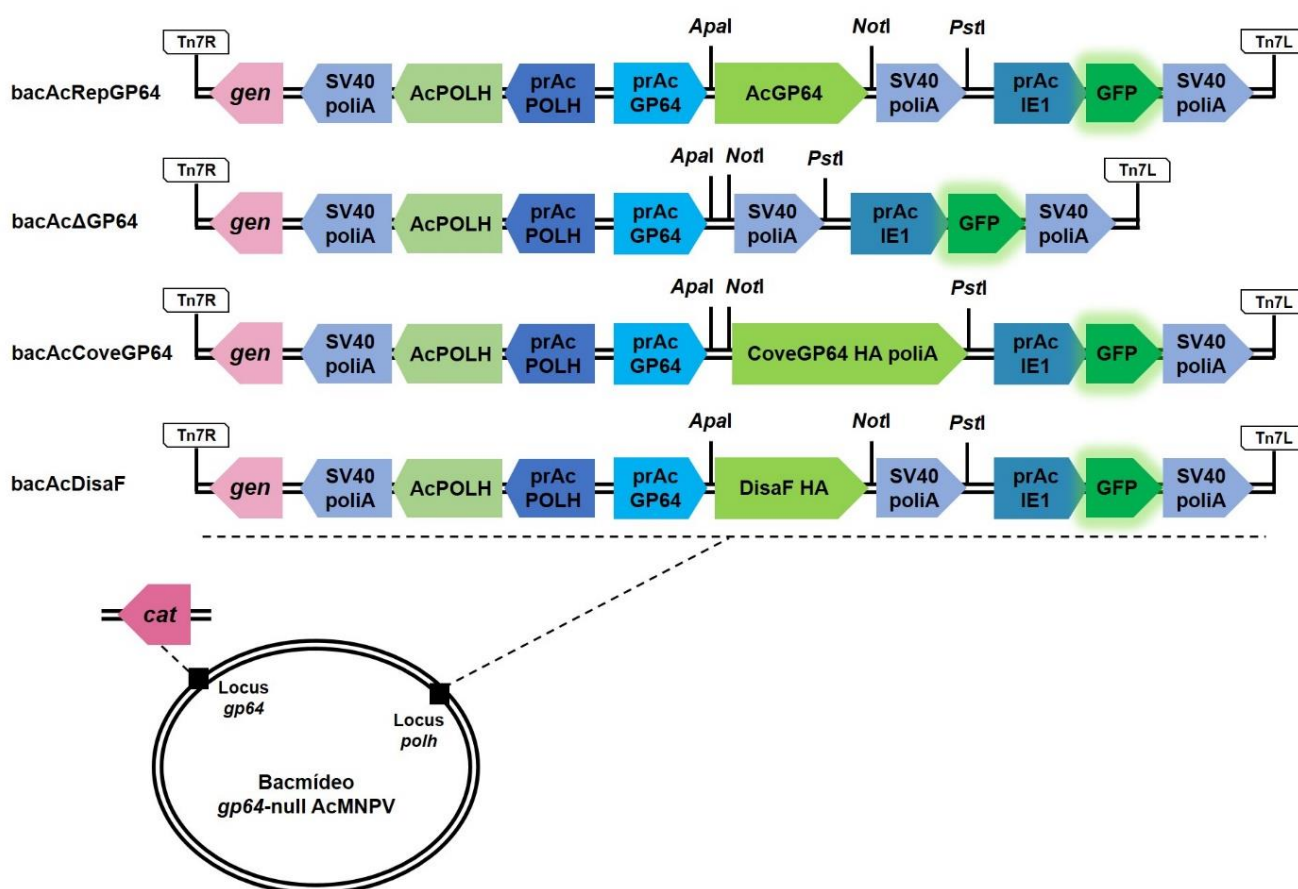


Figura 6: Esquema representativo dos bacmídeos recombinantes utilizados neste trabalho. Foi utilizada a célula eletrocompetente DH10Bac™ (Invitrogen) com o bacmídeo *gp64*-null AcMNPV baseado no genoma de um AcMNPV com o gene *gp64* endógeno deletado e substituído pelo gene do

cloranfenicol acetiltransferase (*cat*). No locus do gene da poliedrina (*polh*), é adicionada a região presente entre os flancos mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L) através de transposição sítio-específica. Todos os bacmídeos recombinantes possuem o gene de resistência à gentamicina (*gen*), o gene da poliedrina do AcMNPV (AcPOLH) controlado por seu respectivo promotor (prAcPOLH), o promotor da GP64 do AcMNPV (prAcGP64) para controlar a EFP inserida e o gene da proteína verde fluorescente (GFP) controlado pelo promotor do IE1 do AcMNPV (prAcIE1). Todos os genes possuem ao final uma região de sinal de poliadenilação do vírus SV40 (SV40 poliA), com exceção do gene que codifica a proteína CoveGP64 no qual foi inserida uma calda poliA na região 3' do gene. Os sítios de restrição utilizados para a clonagem dos genes das EFPs estão demonstrados na figura. Legenda de cores: em rosa – genes de resistência à antibiótico; em verde – regiões gênicas; em azul – regiões promotoras.

Seguindo as instruções do manual *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System* (Invitrogen), foi elaborada a transformação de células DH10Bac™ eletrocompetentes com aproximadamente 200 ng de DNA dos clones do vetor de transferência, inoculadas em 1 mL de meio SOC e mantidas a 37 °C por 4 h em agitação. Posteriormente, as transformações foram inoculadas em placas de Petri com meio LB sólido suplementado com os antibióticos gentamicina (7 µg/mL), cloranfenicol (7 µg/mL), tetraciclina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), juntamente com o indutor IPTG (40 µg/mL) e o substrato X-Gal (80 µg/mL). Após 48 h a 37 °C, várias colônias brancas e uma azul foram selecionadas para elaboração de uma PCR de colônia, seguindo instruções de BERGKESSEL & GUTHRIE (2013), para confirmar a transposição da região de interesse. Foram incluídos na reação de PCR os oligonucleotídeos pUC/M13 FWR, pUC/M13 REV e GP64 F (Tabela 1), seguindo protocolo do *G2 Green Master Mix* (Promega), com programa contido na Tabela 2 e tempo de extensão em c). As colônias confirmadas de bacAcDisaF e de bacAcΔGP64 foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido com os antibióticos gentamicina (7 µg/mL), cloranfenicol (7 µg/mL), tetraciclina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), mantidas a 37 °C, por 16 h em agitação. Já a colônia referente ao bacAcCoveGP64 foi submetida a um esgotamento pelo método “*streak plate*” (SANDERS, 2012) em placa de Petri com meio LB sólido contendo gentamicina (7 µg/mL), cloranfenicol (7 µg/mL), tetraciclina (7 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), IPTG (40 µg/mL) e X-Gal (80 µg/mL) por 48 h, a 37 °C. Colônias brancas e uma azul foram selecionadas e submetidas a PCR de colônia com os mesmo elementos e parâmetros supracitados a fim de se obter um bacmídeo recombinante sem contaminantes. A colônia obtida sem contaminação foi inoculada em 20 mL de meio LB líquido suplementado com

gentamicina (7 µg/mL), cloranfenicol (7 µg/mL), tetraciclina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), mantida a 37 °C, por 16 h em agitação. O DNA plasmidial das colônias confirmadas foi extraído a partir do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo orientações do fabricante.

4.4 Ensaios de transfecção e infecção *in vitro*

Para avaliar a recuperação da infectividade do *gp64-null* AcMNPV pelas EFPs dos vírus testados, ensaios de transfecção e infecção foram elaborados. Para isso, foram utilizadas placas de cultivo celular de 24 poços com 1,88 cm³, contendo cerca de 1,3 x 10⁵ células Tn5B por poço, em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife), com volume final de meio mais célula igual a 500 µL. O ensaio foi realizado em triplicata, partindo de 300 ng de DNA de cada bacmídeo para a transfecção, seguindo as instruções contidas no protocolo do reagente *Cellfectin™ II* (Gibco). Este método viabiliza a entrada do DNA do bacmídeo em células de inseto por meio de lipídeos catiônicos, permitindo a replicação do material genético viral e a formação de partículas, podendo a infectividade do vírus recombinante ser testada posteriormente. Após a transfecção, as culturas de células foram mantidas a 27 °C e observadas por sete dias em microscópio de luz e de fluorescência (Axiovert 100, ZEISS) para acompanhar os sintomas decorrentes da transfecção celular.

Com 168 horas pós transfecção (h.p.t.), o sobrenadante do meio de cultivo celular, denominado de “passagem 0” (P0), foi coletado a partir de centrifugação com 5.000 *g* por 7 min. Foram utilizados 50 µL desta passagem 0 para infectar novas células Tn5B, seguindo as mesmas instruções anteriores. As células foram mantidas a 27 °C por 4 dias. O restante do inóculo da P0 foi submetido a centrifugação de 5.000 *g* por 20 min a 4 °C para concentrar as partículas de vírus brotado (BV) geradas na transfecção celular. O sedimento obtido foi conservado a - 20 °C até sua utilização.

Com 96 horas pós infecção (h.p.i.), as placas contendo as células infectadas com a P0 foram visualizadas em microscópio de luz e de fluorescência (Axiovert 100, ZEISS). O sobrenadante celular, agora chamado de “passagem 1” (P1), foi coletado por meio de centrifugação a 5.000 *g* por 7 min. Foram utilizados 50 µL desta passagem 1 para infectar novas células seguindo mesmo materiais e instruções supracitados. O inóculo restante foi concentrado por centrifugação e conservado a - 20 °C até sua utilização.

Após 96 horas de infecção celular, as células infectadas com o inóculo P1, foram observadas por microscopia de luz e de fluorescência. O sobrenadante celular, agora denominado de “passagem 2” (P2), foi primeiramente centrifugado a 5.000 g por 7 min para separar dos sedimentos celulares, posteriormente centrifugado a 5.000 g por 20 minutos a 4 °C para concentrar as partículas de BV e, por último, armazenado a -20 °C até sua utilização.

4.5 Contagem de células GFP positivas

A partir das imagens obtidas na visualização por microscopia de fluorescência das culturas de células transfectadas e infectadas, foram selecionados três campos distintos para cada ensaio referente às passagens 0, 1 e 2 dos baculovírus recombinantes gerados. Foi realizada uma contagem das células verdes provenientes da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) que indica a expressão dos genes das proteínas de interesse. Esta contagem foi feita utilizando o programa ImageJ v. 1.53 e o gráfico com a análise dos dados obtidos foi elaborado no programa GraphPad Prism v. 9.0.

4.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para avaliar o título viral gerado nas passagens 0, 1 e 2 do ensaio de transfecção e infecção, uma Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR, do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) foi elaborada utilizando o sobrenadante das células do referido ensaio, para avaliar quantitativamente a presença de DNA viral advindo das partículas de vírus brotado (BV) para cada baculovírus recombinante construído.

4.6.1 Elaboração de qPCR para curva padrão

Primeiramente, uma curva padrão foi elaborada a fim de construir uma referência de concentração de DNA viral utilizando um plasmídeo no qual possui parte do gene *ie1* (*immediate early 1*) de AcMNPV clonado no vetor pCR2.1-TOPO-TA™ (Invitrogen) (MORGADO et al., 2020), aqui chamado de pCR2.1-TOPO-TA_AcIE1. O gene *ie1* é indispensável para a replicação de baculovírus e, portanto, usado como referência para quantificar a presença de DNA de baculovírus na amostra. O plasmídeo referido foi utilizado em cinco diluições diferentes em quadruplicata: 0,5

ng/ μ L; 0,05 ng/ μ L; 0,005 ng/ μ L; 0,0005 ng/ μ L e 0,00005 ng/ μ L. Além disso, foi adicionada uma amostra chamada NTC (“*No Template Control*”, do inglês, controle de ausência de amostra) para garantir a ausência de contaminantes na análise. Juntamente com os oligonucleotídeos Acie1FWR e Acie1REV (Tabela 1) foi elaborada uma reação de qPCR seguindo o protocolo do *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), com programa de extensão segundo a Tabela 3, utilizando o termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN) e o Rotor-Gene Q Software v. 2.3.1.49 (QIAGEN) para analisar a corrida.

Tabela 3: Programa de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizado neste trabalho.

Etapa 1	50 °C, 2 min 0 s
Etapa 2	95 °C, 2 min 0 s
Etapa 3 (45 repetições)	1: 95 °C, 5 s
	2: 60 °C, 30 s
Melt	Rampa de 60 °C para 95 °C
	Manter por 90 s no 1° passo
	Manter por 5 s nos próximos passos

4.6.2 Elaboração de qPCR para DNA viral

O DNA advindo do sobrenadante celular das transfecções e infecções (P0, P1 e P2) dos diferentes vírus recombinantes foi extraído seguindo instruções do kit *QIAmp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), sem a execução da etapa de adição de DNase. Os DNAs extraídos foram padronizados para a concentração de 5 ng/ μ L e utilizados 5 ng de DNA na reação de qPCR, somados os oligonucleotídeos Acie1FWR e Acie1REV (Tabela 1), com programa de amplificação contido na Tabela 3, seguindo o protocolo do *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). Os vírus vAcRepGP64, vAc Δ GP64, vAcCoveGP64 e vAcDisaF foram analisados quanto a presença de DNA de vírus brotado (BV) no sobrenadante, durante as três diferentes passagens do vírus por células (P0, P1 e P2), com reações em triplicata totalizando 36 reações, além do controle de reação NTC.

Os dados obtidos durante a reação de qPCR para todos os vírus nas três diferentes passagens, foram analisados quanto a quantificação de DNA viral

detectado em cada uma dessas passagens utilizando o programa GraphPad Prism, v. 9,0, obtendo como referência a curva padrão anteriormente elaborada. O método estatístico utilizado foi o Tukey's, um tipo de teste ANOVA onde são feitas múltiplas comparações entre grupos distintos.

4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analisar a constituição proteica das amostras virais, foi elaborado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida), com gel concentrador a 5% e separador a 12%, utilizando o aparato *Mini-PROTEAN 3 System*® (Bio-Rad). Após a corrida, o gel foi corado e fixado com 0,1% Comassie® Azul brilhante G 250 em solução composta por 10% de ácido acético e 40% metanol, sob agitação por 2 h. Posteriormente, foi tratado com solução descorante composta por 40% de metanol e 10% de ácido acético, para visualização das proteínas.

Para as amostras vAcRepGP64 e vAcCoveGP64, células Tn5B foram infectadas com MOI 5 e, posteriormente, os sobrenadantes celulares foram coletados com 7 d.p.i. Os sobrenadantes foram centrifugados a 5.000 g por 20 min a 4 °C para concentração dos vírus brotados gerados na infecção e conservados a 4 °C até sua utilização. Para analisar o vírus recombinante vAcDisaF, foi necessário utilizar o sedimento celular advindo de transfecção para melhor avaliar a presença da proteína F de DisaGV, sabendo que, pela ineficácia deste vírus em gerar um inóculo viral viável, não foi possível utilizar um inóculo advindo de infecção celular. Partindo de 800 ng de DNA de bacmídeo, células Tn5B em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Enbriolife), foram transfectadas seguindo protocolo do reagente *Cellfectin™ II* (Gibco), em placa de cultura celular de 6 poços (9,4 cm²), com 4,0 x 10⁵ células. As células foram coletadas com 7 d.p.t., centrifugadas a 5.000 g por 7 min e conservadas a -20 °C até sua utilização. Também foi adicionado a esta análise, o sedimento de células Tn5B não infectadas ("*mock-infected*"), seguindo mesmas instruções de coleta anteriormente citadas, para servir de controle negativo.

4.8 Imunodeteção por Western Blot

Para verificar a expressão das proteínas de fusão de envelope nos inóculos virais, foram elaborados ensaios de detecção imuno específica por western blot, tendo

como base a análise da constituição proteica realizada anteriormente, bem como as amostras advindas dela. As proteínas contidas nas amostras foram separadas novamente por eletroforese, utilizando-se de dois géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), com a mesma concentração do gel supracitado, cada um para uma imunomarcação distinta. Após a corrida em cuba de eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (difluoreto de polivinilideno) *Amersham Hybond P 0.45* (GE Healthcare) utilizando o aparelho Trans-Blot® Turbo™ System (Bio-Rad), seguido dos passos de imunodeteção com anticorpos específicos e etapas de lavagens contidos no manual *Protein Blotting Guide* (Bio-Rad). A detecção dos anticorpos que se ligaram às proteínas se deu a partir de quimiluminescência, seguindo instruções do fabricante do reagente *Novex™ AP Chemiluminescent Substrate* (Invitrogen) e a visualização da detecção foi realizada no aparelho ImageQuant LAS 4000. As imagens obtidas foram editadas quanto a quantidade de brilho e contraste no programa ImageJ v. 1.53.

O primeiro western blot foi empregado na detecção das proteínas GP64 do CoveNPV e F do DisaGV, que possuem uma HA-tag (resíduos da hemaglutinina da influenza humana) na sua região C-terminal. Com isso, foram aplicadas no gel de poliacrilamida as amostras de sobrenadante de células infectadas com os vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64, a amostra de sedimentos de células transfectadas com o bacmídeo bacAcDisaF e o sedimento de célula Tn5B não infectada “*mock*” como controle negativo. Além destas, foi adicionada neste primeiro western blot uma amostra de sedimento de células Tn5B 7 d.p.i. (MOI 5) com o baculovírus recombinante BACIAP2 que expressa uma HA-tag na região N-terminal da proteína antiapoptótica IAP2, com cerca de 35 kDa, presente no vírus recombinante ChinNPV-UNB1, derivado do *Chrysodeixes includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV). Esta amostra, aqui denominada BACIAP2(HA+), foi utilizada como controle positivo de presença da HA-tag nos inóculos virais e foi gentilmente cedida pelo Dr. Fabricio Morgado. Os dados referentes a esta amostra foram apresentados no XXX Congresso Brasileiro de Virologia ocorrido em 2019 na cidade de Cuiabá - MT (dados não publicados).

Para detectar a HA-tag contida nas proteínas de interesse, foi utilizado o anticorpo primário *Rabbit anti-HA polyclonal antibody* (Invitrogen) na concentração 1:2000 e o anticorpo secundário *Goat anti-Rabbit IgG H+L* (Invitrogen) conjugado com fosfatase alcalina na concentração 1:2000 para visualização da detecção.

O segundo western blot teve como objetivo detectar a presença da proteína GP64 do AcMNPV na amostra vAcRepGP64. Além disso, a proteína GP64 do CoveNPV também poderia ser detectada na amostra vAcCoveGP64 pelo fato do anticorpo monoclonal utilizado ser específico contra uma sequência de aminoácidos conservados entre as GP64 (SWKDASGWS). Para isso, foram aplicadas as amostras de sobrenadante de células infectadas com os vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64, somado ao sedimento de célula Tn5B não infectada “*mock*”. Para a detecção das proteínas, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal *Baculovirus Envelope gp64 Antibody AcV5* (eBioscience™) feito em camundongo na concentração 1:1000, seguido do anticorpo secundário *Goat F(ab')₂ Anti-Mouse IgG - H&L* (abcam) conjugado com fosfatase alcalina na concentração 1:3000 para visualizar a detecção.

4.9 Alinhamento de sequências de aminoácidos

Foram construídos dois alinhamentos com as proteínas GP64 do CoveNPV e F do DisaGV a partir de um BLAST baseado em sequências de aminoácidos de proteínas (BLASTp) contidas no banco de dados de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As sequências com maior porcentagem de identidade com a proteína CoveGP64 e com a proteína DisaF foram escolhidas para elaborar um alinhamento do tipo MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* – do inglês, Comparação de Múltiplas Sequências a partir da Expectativa do Log).

A partir do alinhamento de sequências, uma árvore filogenética foi construída para as proteínas GP64 e outra para as proteínas F utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* – do inglês, Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética). Regiões e domínios proteicos também foram preditos utilizando o servidor EMBOSS *sigcleave* v. 6.5.7 ou SignalP v. 5.0 para peptídeo sinal, TMHMM v. 2.0 para domínio transmembrana e ProP v. 1.0 para sítio de clivagem de furina. A análise de sítios de glicosilação foi baseada nos sítios já preditos e confirmados para a GP64 do AcMNPV (JARVIS et al., 1998). As figuras geradas nestas análises foram obtidas por meio do programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters).

5

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação da clonagem no vetor de transferência

Os genes das proteínas de fusão de envelope GP64 do CoveNPV (CoveGP64) e da proteína F do DisaGV (DisaF) foram amplificados e obtidos os fragmentos de DNA nos tamanhos de 1556 pb e 1658 pb, respectivamente, de acordo com o tamanho esperado para cada gene juntamente com as adições de bases contidas nos oligonucleotídeos (Figura 7).

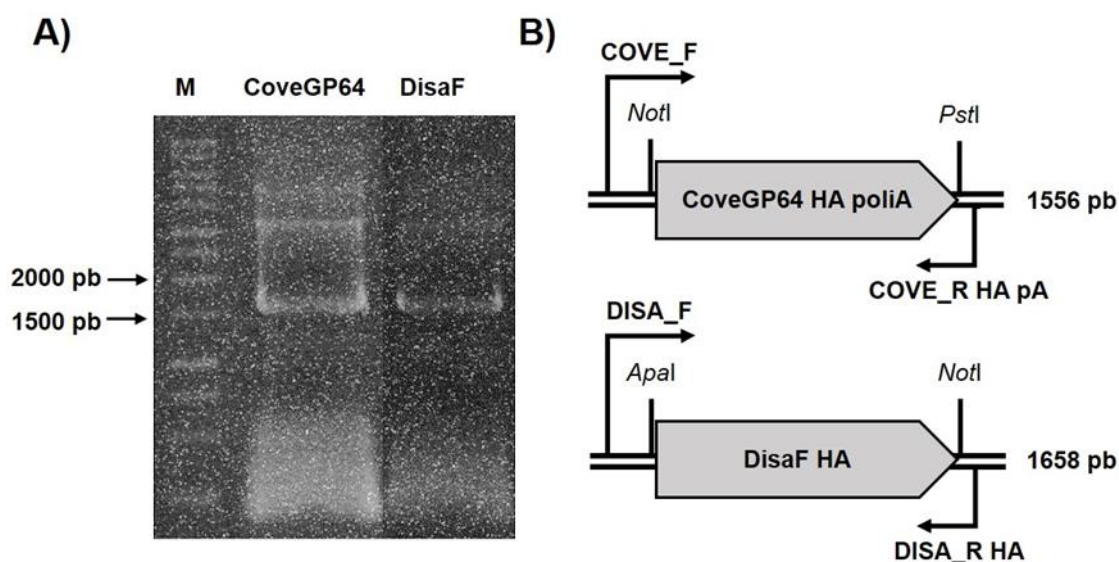


Figura 7: Confirmação da amplificação dos genes das proteínas de fusão de envelope dos vírus CoveNPV e DisaGV. **A)** Gel de agarose 0,7 % mostrando fragmentos de 1556 pb e 1658 pb de DNA amplificados dos vírus CoveNPV (CoveGP64) e DisaGV (DisaF), respectivamente. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (KASVI). O tamanho em pares de bases (pb) de dois fragmentos do marcador estão indicados por setas. **B)** Esquema representativo da amplificação dos genes das proteínas com as regiões inseridas através dos oligonucleotídeos representados por setas. O tamanho em pares de bases esperado para cada produto de PCR está demonstrado no lado direito da figura.

Os genes das proteínas foram corretamente inseridos no vetor de transferência pFB-pAcgp64-pA-PG, sendo confirmados por uma PCR de colônia no qual os fragmentos de DNA amplificados correspondem ao esperado. Foi observada a amplificação de DNA em seis clones de CoveGP64 (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) com fragmentos em torno de 1874 pb, sendo este o tamanho indicado através de simulação feita no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters) (Figura 8). O clone C1 foi escolhido

para prosseguir na geração do baculovírus recombinante. Para DisaF, foram obtidos cinco clones (D4, D6, D8, D9 e D10) com fragmentos de DNA em torno de 1967 pb de acordo com simulação feita no mesmo programa (Figura 9).

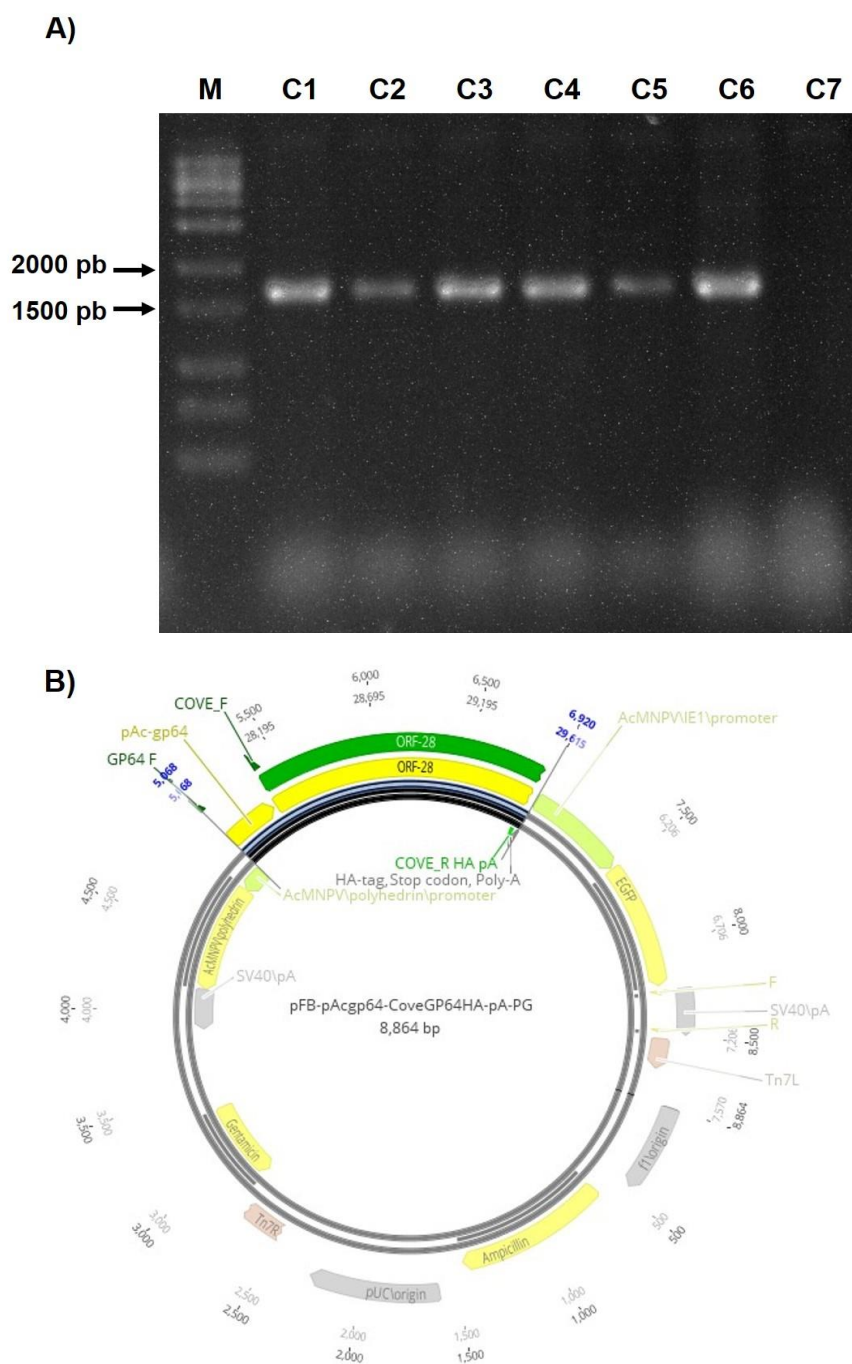


Figura 8: Confirmação da clonagem da proteína GP64 do CoveNPV no vetor de transferência. **A)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % da amplificação por PCR de colônia dos fragmentos contendo o gene *gp64* do CoveNPV referente às colônias C (CoveGP64) 1 a 7. As colônias C1 a C6 amplificaram o fragmento do tamanho esperado. Marcador de peso molecular (M) 1 Kb DNA Ladder (Ludwig). O tamanho em pares de bases (pb) de dois fragmentos do marcador estão indicados por

Resultados

setas. **B)** Mapa vetor desenvolvido no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters) indicando a região amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos GP64 F e COVE_R HA pA, no qual demonstra o tamanho esperado de 1874 pb do fragmento de DNA.

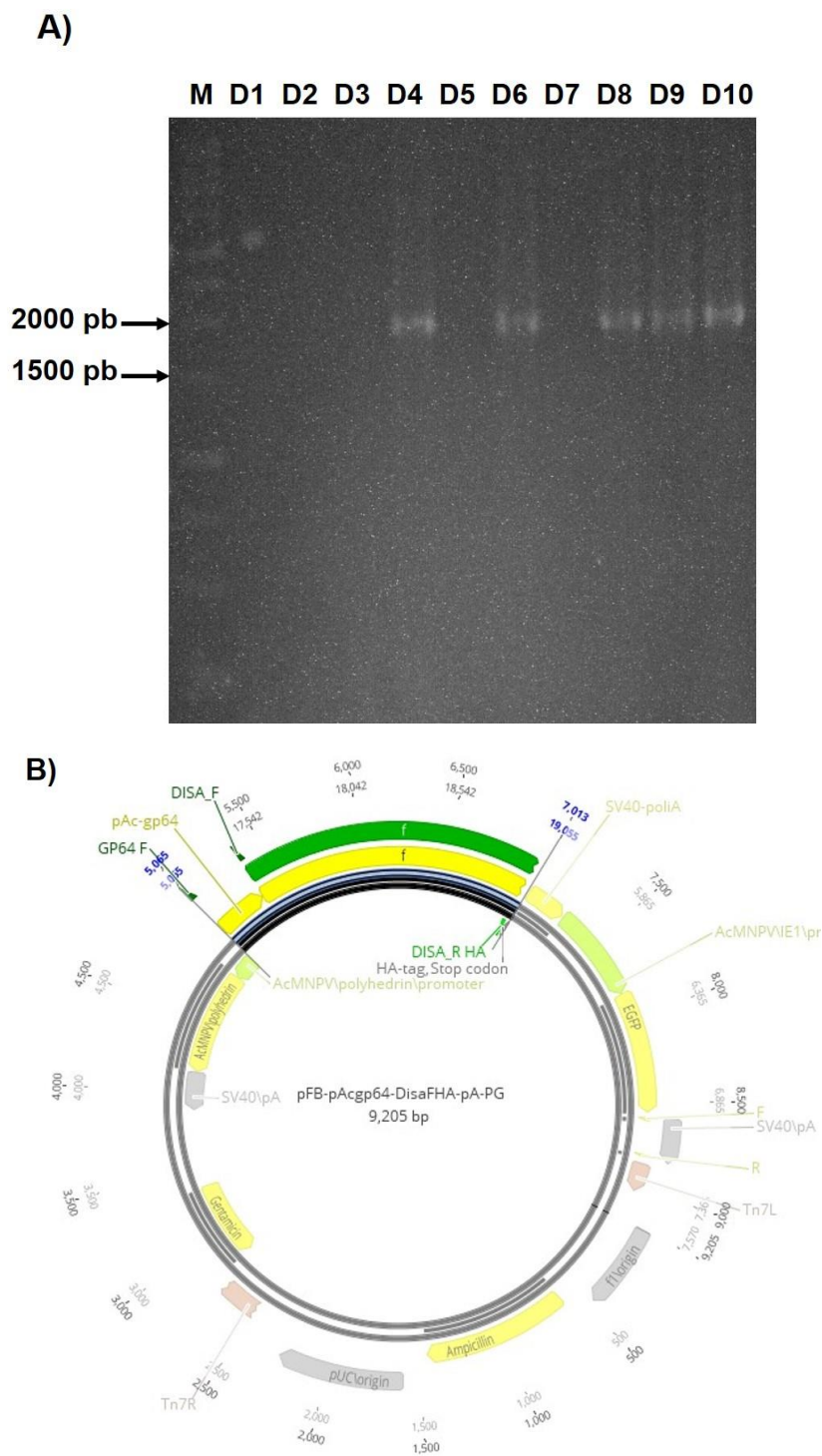


Figura 9: Confirmação da clonagem da proteína F do DisaGV no vetor de transferência. **A)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % da amplificação por PCR de colônia dos fragmentos contendo

o gene F do DisaGV referente às colônias D (DisaF) 1 a 10. As colônias D4, D6, D8, D9 e D10 amplificaram o fragmento no tamanho esperado. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig). O tamanho em pares de bases (pb) de dois fragmentos do marcador estão indicados por setas. **B)** Mapa vetor desenvolvido no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters) indicando a região amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos GP64 F e DISA_R HA, no qual demonstra o tamanho esperado de 1967 pb do fragmento de DNA.

Os clones selecionados também foram confirmados por meio de digestão com enzimas de restrição. Na digestão do clone C1 de CoveGP64 foram observados os três fragmentos de DNA no tamanho esperado, segundo simulação feita no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters) (Figura 10). Igualmente na digestão feita para os clones obtidos de DisaF, foram observados todos os quatro fragmentos de DNA no tamanho esperado, conforme demonstra a simulação (Figura 11).

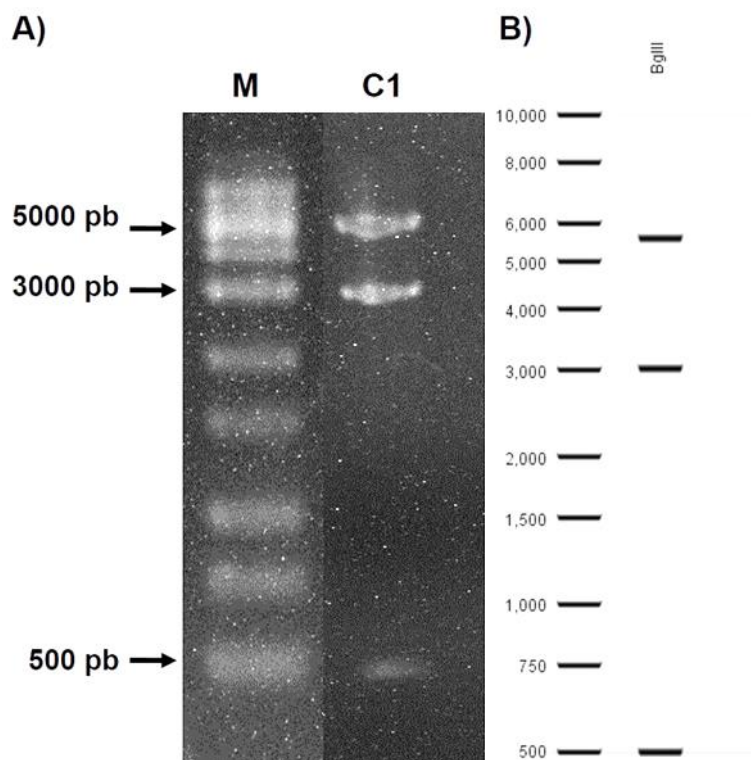


Figura 10: Confirmação da clonagem do fragmento de DNA contendo o gene *gp64* do CoveNPV pela digestão do clone C1 com a enzima de restrição *Bgl*II (Promega). **A)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA plasmidial do clone C1 digerido com *Bgl*II. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig). O tamanho em pares de bases (pb) de três fragmentos do marcador estão indicados por setas. **B)** Simulação da digestão feita no programa Geneious, v. 11.1.5 (Biomatters). A

digestão resultou em três fragmentos de tamanho esperado como pode ser observado na simulação mostrada em B.

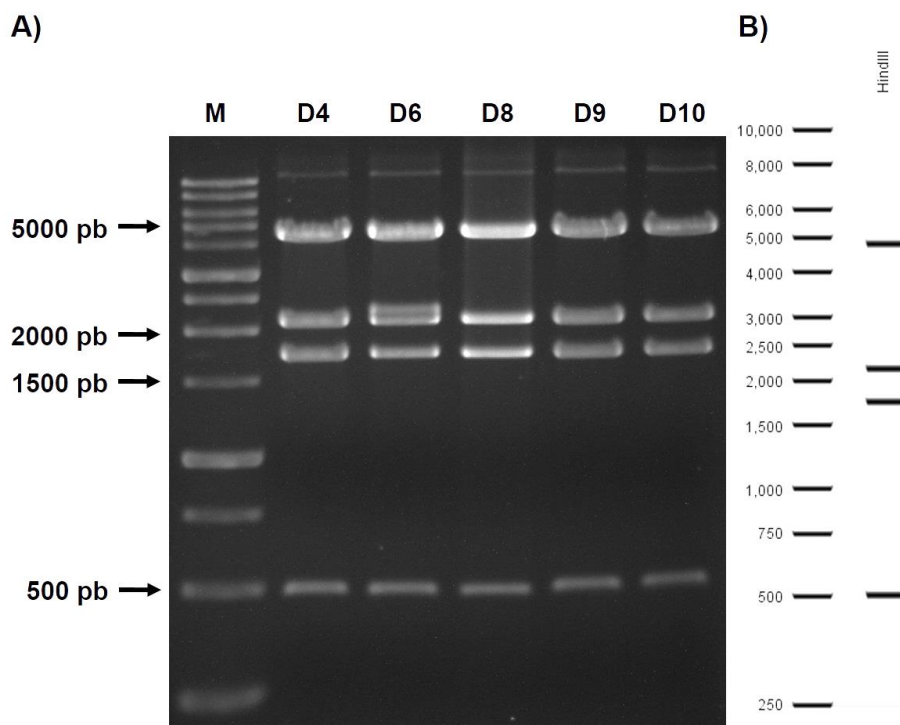


Figura 11: Confirmação da clonagem do fragmento de DNA contendo o gene *F* do DisaGV pela digestão dos clones recombinantes com a enzima de restrição *HindIII* (Promega). **A)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA plasmidial dos clones D4, D6, D8, D9 e D10 digeridos com *HindIII*. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig). **B)** Simulação da digestão feita no programa Geneious, v. 11.1 (Biomatters). O tamanho em pares de bases (pb) de quatro fragmentos do marcador estão indicados por setas. A digestão resultou em quatro fragmentos de tamanho esperado como pode ser observado na simulação mostrada em B.

5.2 Confirmação da obtenção dos baculovírus recombinantes

Os baculovírus recombinantes gerados com as proteínas de fusão de envelope foram confirmados por meio de PCR de colônia. O clone C14 de CoveGP64 foi confirmado obtendo fragmento de DNA no tamanho esperado em torno de aproximadamente 4520 pb, porém, um fragmento de 300 bp foi também amplificado (Figura 12A). Este fragmento diz respeito a presença de bacmídeos não recombinantes no qual não possuem o gene de interesse. Após a realização do esgotamento em placa de Petri do clone C14, foram obtidos novos clones sem a

presença de contaminantes (Figura 12B). Com isso, o clone C14/C2 foi selecionado para a realização dos ensaios subsequentes.

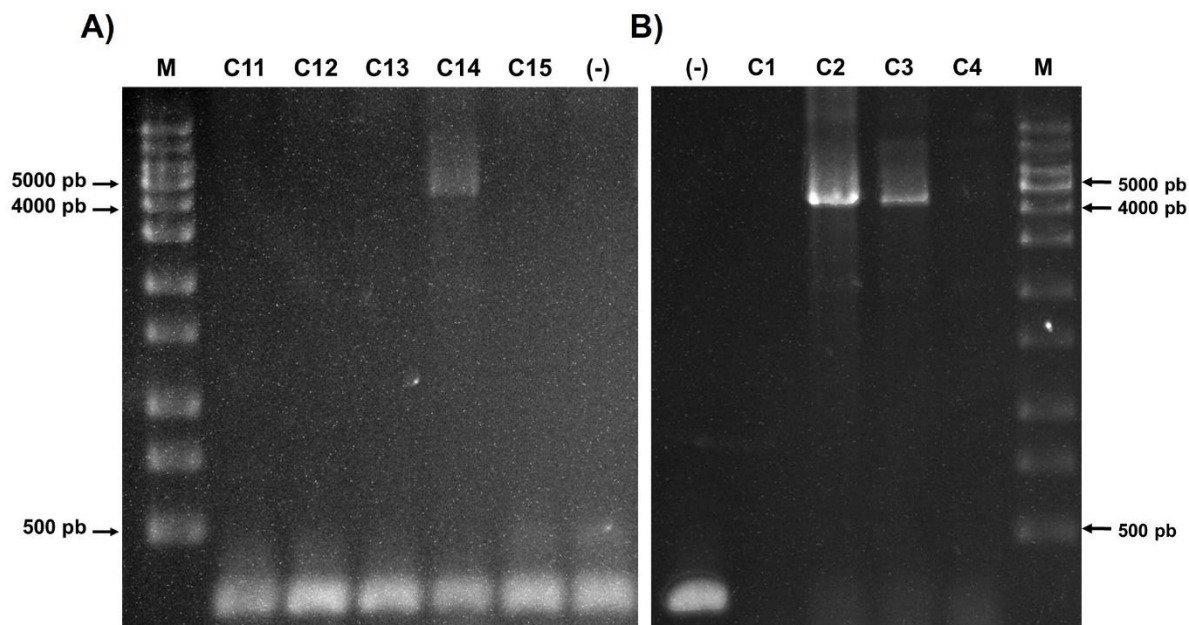


Figura 12: Confirmação da inserção do gene *gp64* do CoveNPV no genoma do baculovírus. **A)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % da reação de PCR com os oligonucleotídeos pUC/M13 F, pUC/M13 R e COVE_R HA pA mais DNA de diferentes colônias de *E. coli* contendo o DNA dos baculovírus recombinantes na forma de um plasmídeo (bacmídeo). O clone C14 apresentou a banda de tamanho esperado (≈ 4520 pb), confirmando a inserção do gene no bacmídeo. Entretanto, uma banda em torno de 300 pb também foi observada, indicando que havia uma mistura de colônias com e sem o gene de interesse. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig). O tamanho em pares de bases (pb) de três fragmentos do marcador estão indicados por setas. **B)** Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % da reação de PCR com os oligonucleotídeos pUC/M13 F, pUC/M13 R e COVE_R HA pA mais DNA de diferentes colônias de *E. coli* isoladas a partir da colônia C14. As colônia C2 e C3 apresentaram o tamanho esperado (≈ 4520 pb), confirmando a inserção do gene no bacmídeo e não apresentaram o fragmento em torno de 300 pb.

A obtenção do baculovírus recombinante de DisaF foi também confirmada pela amplificação de fragmento de DNA no tamanho esperado em torno de 4640 pb em uma colônia (D1). Esta colônia não apresentou a amplificação da banda de 300 pb referente ao bacmídeo contaminante e, por isto, ela foi selecionada para dar prosseguimento ao trabalho (Figura 13).

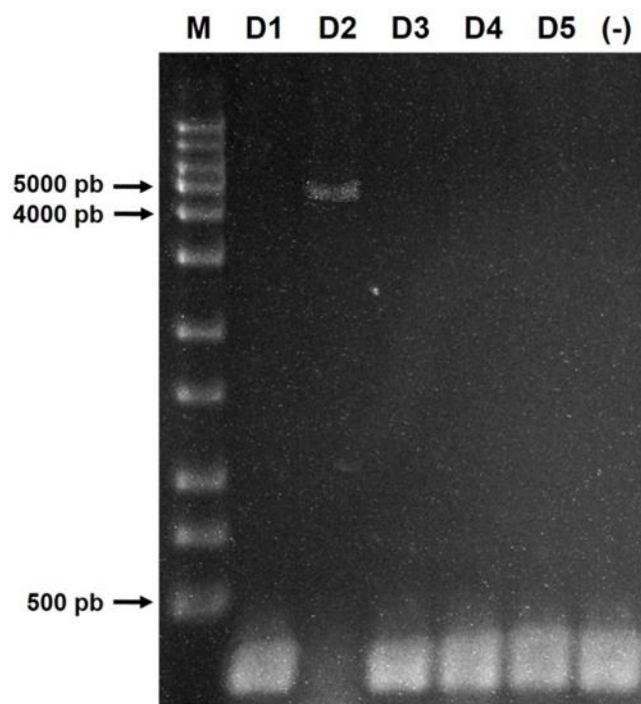


Figura 13: Confirmação da inserção do gene da proteína F do DisaGV no genoma do baculovírus. Resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8 % da reação de PCR com os oligonucleotídeos pUC/M13 F, pUC/M13 R e DISA_R HA, mais DNA de diferentes colônias de *E. coli* contendo o DNA dos baculovírus recombinantes na forma de um plasmídeo (bacmídeo). O clone D2 apresentou a banda de tamanho esperado (≈ 4640 pb), confirmando a inserção do gene no bacmídeo. Marcador de peso molecular (M) *1 Kb DNA Ladder* (Ludwig). O tamanho em pares de bases (pb) de três fragmentos do marcador estão indicados por setas.

5.3 Análise da recuperação da infectividade pelas EFPs

A partir dos ensaios de transfecção e infecção *in vitro* com os baculovírus recombinantes construídos, juntamente com os controles positivo e negativo, a recuperação da infectividade foi analisada ao longo de três passagens virais (P0, P1 e P2). No controle positivo, é possível verificar o padrão de infectividade esperado para um AcMNPV que possui uma proteína GP64 funcional (Figura 14). Todas as células apresentam sintomas de infecção nas três passagens virais, como núcleo inchado e produção de poliedros visto no campo claro e células verdes pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) quando emitida luz azul no campo de fluorescência.

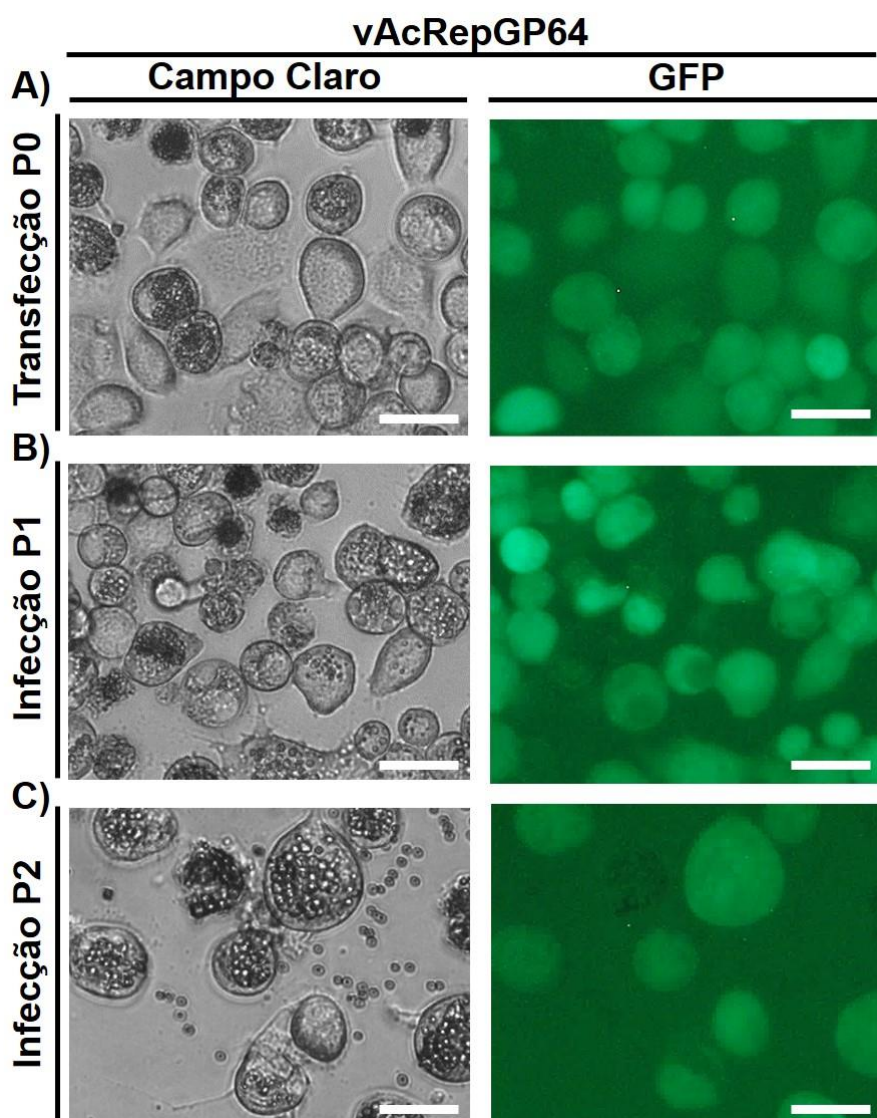


Figura 14: Ensaio de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcRepGP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcRepGP64. **A)** Células Tn5B transfectadas (96 h.p.t.) com 300 ng de bacmídeo bacAcRepGP64 e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP) **B)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da transfecção em A e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **C)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da infecção em B e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). É possível notar a infecção eficiente das células transfectadas e infectadas pela coloração verde da proteína verde fluorescente (GFP). Barra de escala: 50 µm.

Já no controle negativo, é possível observar o padrão esperado para um vírus que não possui, ou que possui uma proteína de fusão de envelope incapaz de acessar às células e propagar a infecção (Figura 15). Na transfecção do controle negativo, há células que emitem fluorescência pela característica desta metodologia de possibilitar

a geração de partículas virais independente do acesso aos receptores celulares, pois o DNA viral entra na célula através de lipossomos que atravessam a membrana plasmática. É a partir desse inóculo gerado por transfecção que é possível analisar a eficiência das partículas virais de acessarem às células, gerarem uma progênie viral capaz de infectar novas células, replicar seu material genético, produzirem novas partículas virais, brotarem para fora e, finalmente, começarem um novo ciclo de infecção.

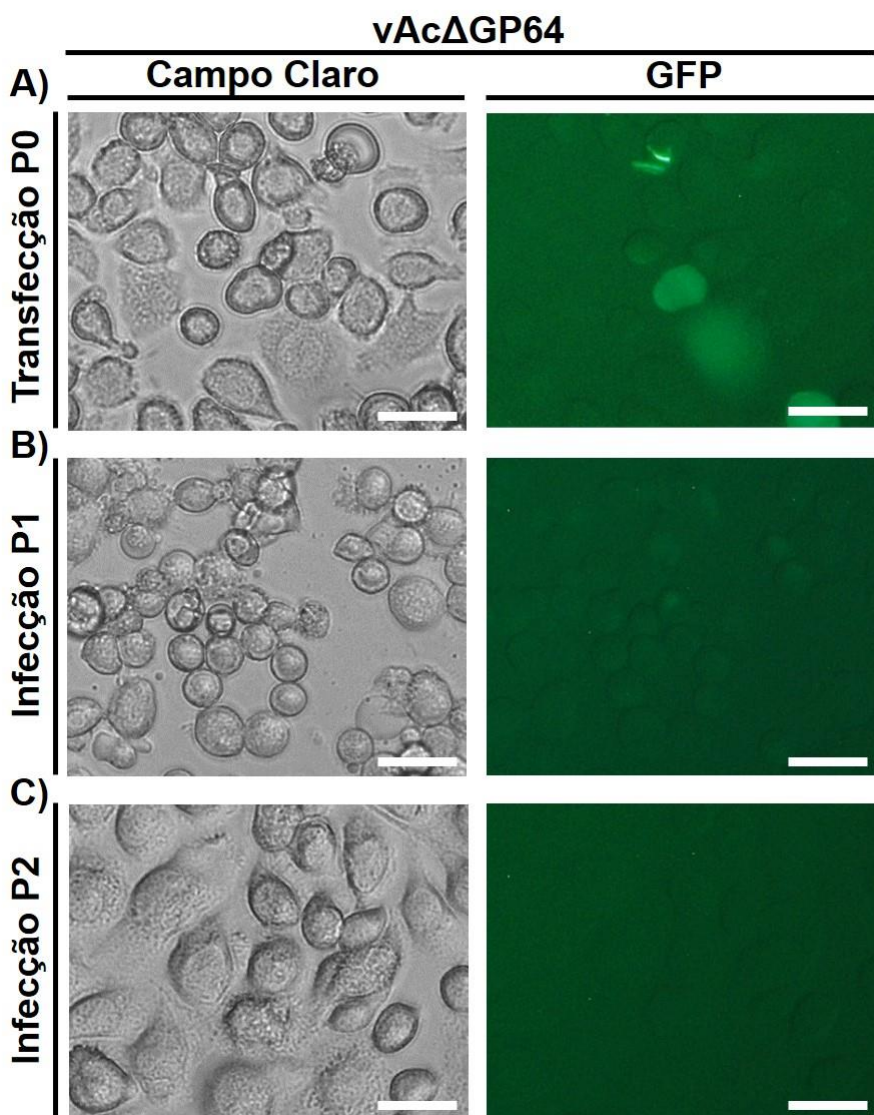


Figura 15: Ensaios de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAc Δ GP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAc Δ GP64. **A)** Células Tn5B transfectadas (96 h.p.t.) com 300 ng de bacmídeo bacAc Δ GP64 e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **B)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da transfecção em A e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **C)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da infecção em B e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência

(GFP). É possível notar a presença de infecção apenas nas células transfectadas pela coloração verde da proteína verde fluorescente (GFP). Barra de escala: 50 μ m.

No ensaio correspondente ao baculovírus recombinante vAcCoveGP64, é observada uma grande semelhança do padrão de infecção referente ao controle positivo (Figura 16). Os efeitos citopáticos da infecção e a fluorescência estão presentes em todas as células. Este resultado indica a capacidade desta EFP em recuperar a infectividade de um AcMNPV sem o gene *gp64* de forma altamente eficaz, gerando uma progênie viral que acessa às células, se replica no núcleo, produz poliedros repletos de partículas virais que, quando na presença de novas células, é capaz de iniciar um novo ciclo infectivo.

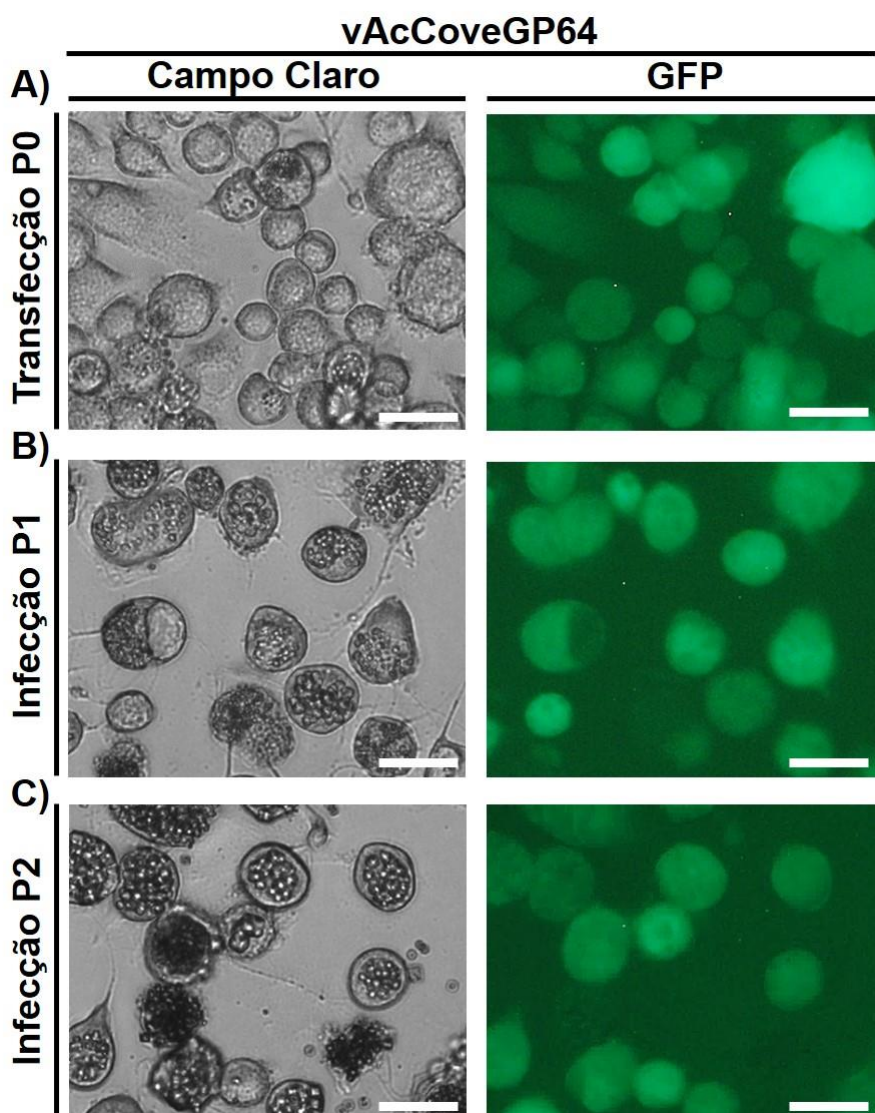


Figura 16: Ensaios de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcCoveGP64 e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcCoveGP64. **A)** Células Tn5B transfectadas (96 h.p.t.) com 300 ng de bacmídeo vAcCoveGP64 e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP) **B)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da transfecção em A e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **C)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da infecção em B e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). É possível notar a infecção eficiente das células transfectadas e infectadas pela coloração verde da proteína verde fluorescente (GFP). Barra de escala: 50 μ m.

O ensaio referente ao vírus vAcDisaF já demonstra um padrão de infecção semelhante ao obtido no controle negativo, no qual a presença de efeitos citopáticos e fluorescência são observados de forma mais clara no campo correspondente à transfecção (Figura 17). Na primeira passagem de infecção (P1) não são observadas células com forte fluorescência semelhante ao controle positivo, mas sim, uma fluorescência muito baixa e que geralmente não compreende a célula como um todo. Este resultado indica uma baixa eficiência da proteína F do DisaGV em recuperar a infectividade de um *gp64*-null AcMNPV.

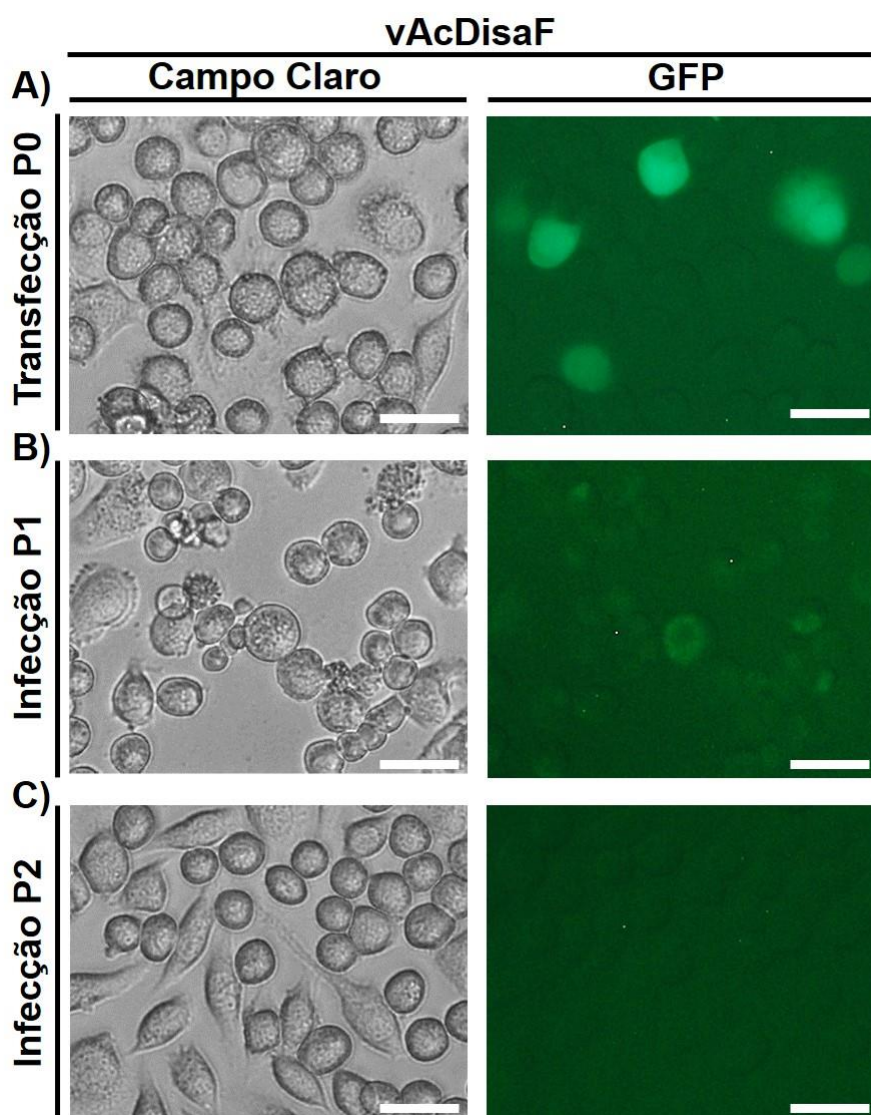


Figura 17: Ensaio de transfecção e infecção com o DNA do bacmídeo bacAcDisaF e sobrenadante de células infectadas com o vírus vAcDisaF. **A)** Células Tn5B transfectadas (96 h.p.t.) com 300 ng de bacmídeo bacAcDisaF e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **B)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da transfecção em A e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). **C)** Células Tn5B infectadas (96 h p.i.) com o sobrenadante da infecção em B e analisadas pela microscopia de luz (campo claro) e fluorescência (GFP). É possível notar a presença de infecção apenas nas células transfectadas e algumas células na passagem P1 pela coloração verde da proteína verde fluorescente (GFP). Barra de escala: 50 μ m.

5.4 Quantificação de células GFP positivas

A partir da contagem de células verdes presentes nas três passagens virais do ensaio anteriormente ilustrado, a porcentagem de células GFP positivas foi calculada

para melhor comparar a recuperação da infectividade obtida por cada baculovírus recombinante (Figura 18).

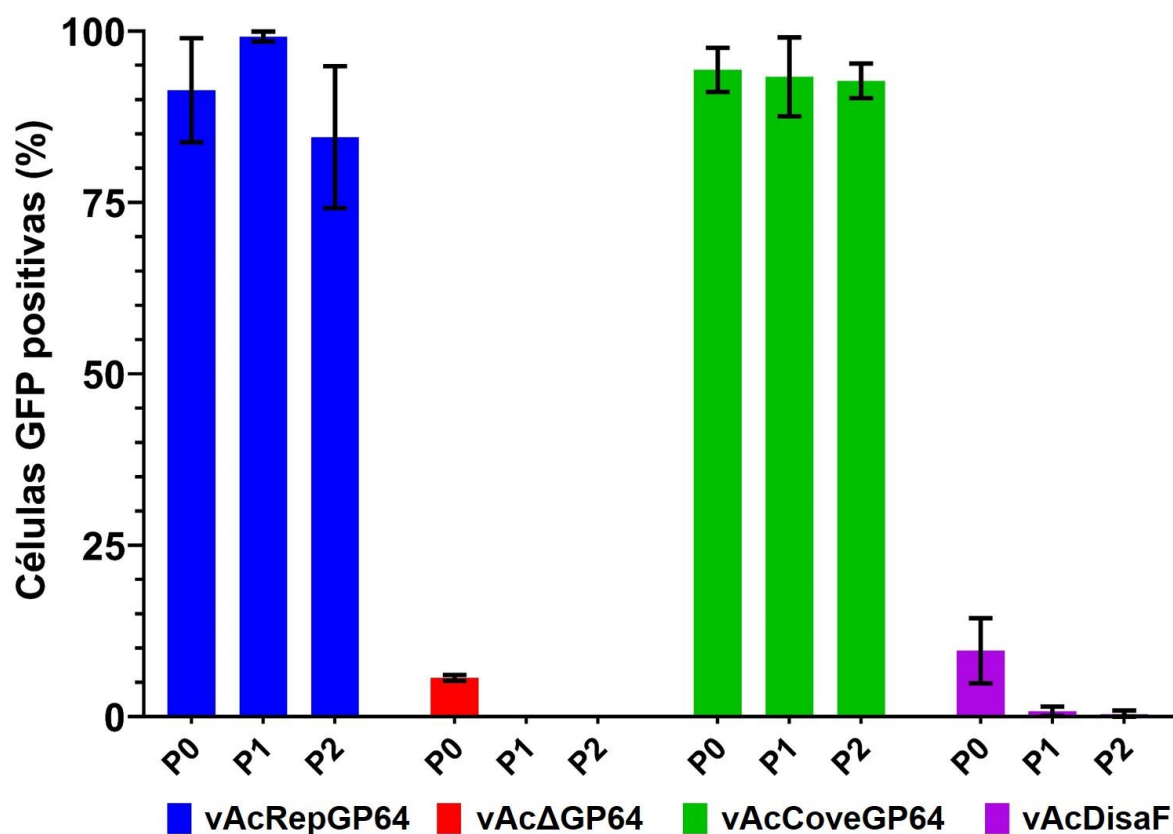


Figura 18: Análise da quantidade de células Tn5B fluorescentes nas diferentes transfecções e infecções dos bacmídeos e vírus recombinantes. Porcentagem de células GFP positivas nas passagens 0 (P0), 1 (P1) e 2 (P2) dos vírus vAcRepGP64 (azul), vAcΔGP64 (vermelho), vAcCoveGP64 (verde) e vAcDisaF (roxo).

É possível notar o contraste existente no número de células verdes visualizadas entre as infecções dos vírus vAcCoveGP64 e vAcDisaF, demonstrando a semelhança do primeiro com o controle positivo e do segundo com o controle negativo. Ao comparar o vAcCoveGP64 com o vAcRepGP64, é constatada uma menor variabilidade na porcentagem de células verdes presentes no ensaio. Isso é explicado pela maior presença de poliedros no vAcRepGP64, uma vez que a produção de poliedros ocorre no final do ciclo de infecção dos baculovírus e, conforme maior eficiência do vírus em se espalhar, mais rapidamente todas células estarão infectadas

e repletas de poliedros, o que ocasiona a atenuação da emissão de fluorescência por parte da GFP. Com isso, apesar de todas células visualizadas em ambos os casos estarem infectadas, no controle positivo possui mais poliedros e, portanto, mais células estão desintegradas e sem capacidade de continuar emitindo fluorescência.

Quando o vAcDisaF é comparado com o controle negativo, é possível verificar já na passagem 0 (P0) sua baixa infectividade. Mesmo em uma transfeção, onde o vírus independe da eficiência da EFP em fusionar a membrana celular para se replicar, é visto que, sem a complementação da atividade de fusão de membranas, o vírus não consegue se espalhar e alcançar todas células do poço. O fato da passagem 1 (P1) do vAcDisaF apresentar em torno de 1% de células GFP positivas, demonstra a incompatibilidade desta proteína de fusão de envelope em substituir a proteína GP64 e, apesar das células verdes indicarem infecção celular, o inóculo viral gerado não é capaz de alcançar um número maior de células e propagar o vírus, visto que na passagem 2 (P2) um valor abaixo de 1% de fluorescência foi detectado. Este resultado mostra que, conforme as poucas partículas virais geradas na P1 do vAcDisaF vai passando por novas passagens de infecção, o número delas vai se perdendo pela ineficácia em entrar em novas células.

5.5 Quantificação de partículas virais

5.5.1 Parâmetros da corrida de qPCR

A amplificação do DNA do plasmídeo utilizado na curva padrão foi detectada pela fluorescência emitida em um intervalo de ciclos esperados, com exceção de uma das 4 repetições da diluição 0,05 ng/ μ L e, portanto, esta foi excluída da análise da curva padrão (Figura 19). Não foi detectada amplificação na amostra NTC (“*no template control*”) que representa um controle de reação sem adição de DNA molde (“*template*”), demonstrando que não houve contaminação na reação executada. O “*Threshold*” foi estabelecido em 0,057, o R^2 da curva padrão obtido foi de 0,99775 e o método de tratamento de normalização da fluorescência utilizado foi “*Dynamic Tube Normalisation*”.

Resultados

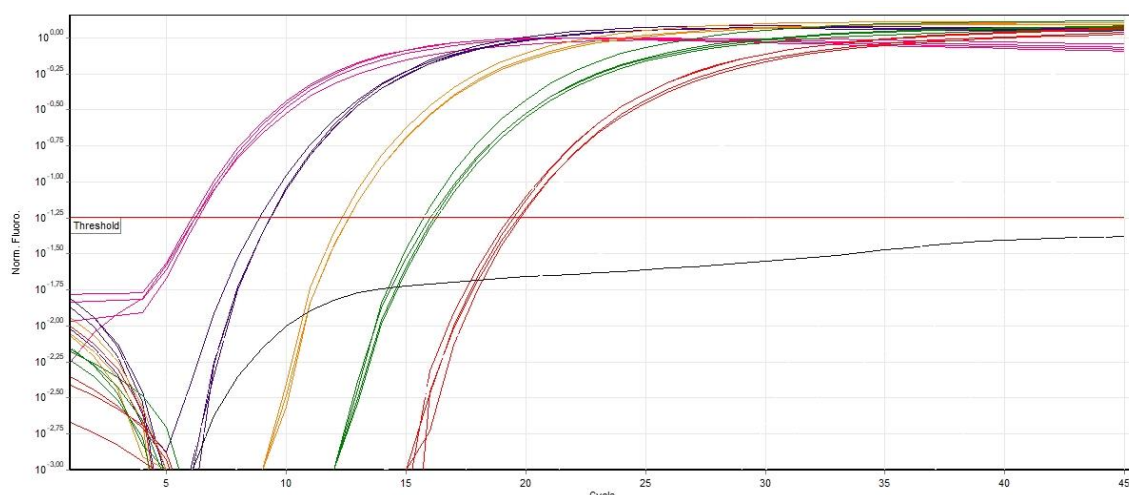


Figura 19: Curva padrão da qPCR usando oligonucleotídeos para o gene *ie-1* do AcMNPV e o plasmídeo pCR2.1-TOPO-TA_AcIE1 como molde. Gráfico de fluorescência normalizada da curva padrão. Diferentes concentrações do plasmídeo TOPO-AcMNPV-qPCR-V2-IE1 em ng/ μ L: 0,5 (rosa), 0,05 (azul), 0,005 (amarelo), 0,0005 (verde) e 0,00005 (vermelho). Todas as amostras foram amplificadas nas diferentes concentrações.

A curva de desnaturação (“*melt*”) obtida para a curva padrão, demonstra uma uniformidade na constituição nucleotídica presente nos *amplicons* (produto da amplificação) gerados na reação (Figura 20). Apenas um pico de desnaturação dos *amplicons* foi observado em torno de 78 °C para a grande maioria das diferentes concentrações. O *Threshold* estabelecido foi de 1,66955 em torno de 72,3 °C.

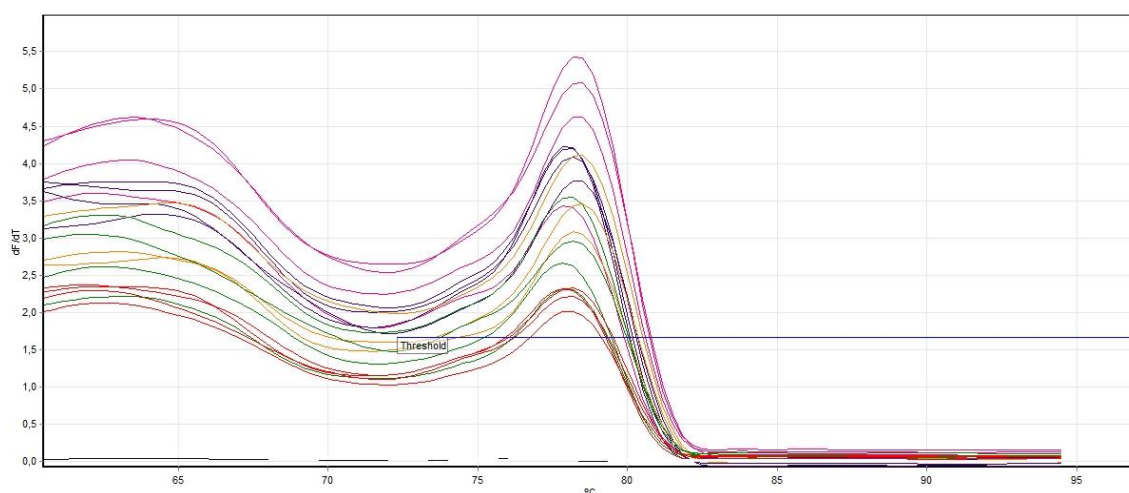


Figura 20: Análise da curva de desnaturação (“*melt*”) dos produtos da qPCR utilizando o plasmídeo TOPO-AcMNPV-qPCR-V2-IE1. Diferentes concentrações do plasmídeo TOPO-AcMNPV-qPCR-V2-IE1

em ng/ μ L: 0,5 (rosa), 0,05 (azul), 0,005 (amarelo), 0,0005 (verde) e 0,00005 (vermelho). Apenas um pico de desnaturação dos *amplicons* foi observado em torno de 78 °C para as diferentes concentrações.

Na reação de qPCR realizada com o DNA viral extraído do sobrenadante celular, foi detectada a fluorescência advinda da amplificação de DNA em todas as reações presentes, exceto no controle de reação NTC, o que demonstra a ausência de contaminação (Figura 21). Para obter a concentração das amostras, foram utilizados como referência os dados de *Threshold* e R^2 da curva padrão anteriormente elaborada. O gráfico de fluorescência foi normalizado também pelo método “*Dynamic Tube Normalisation*”.

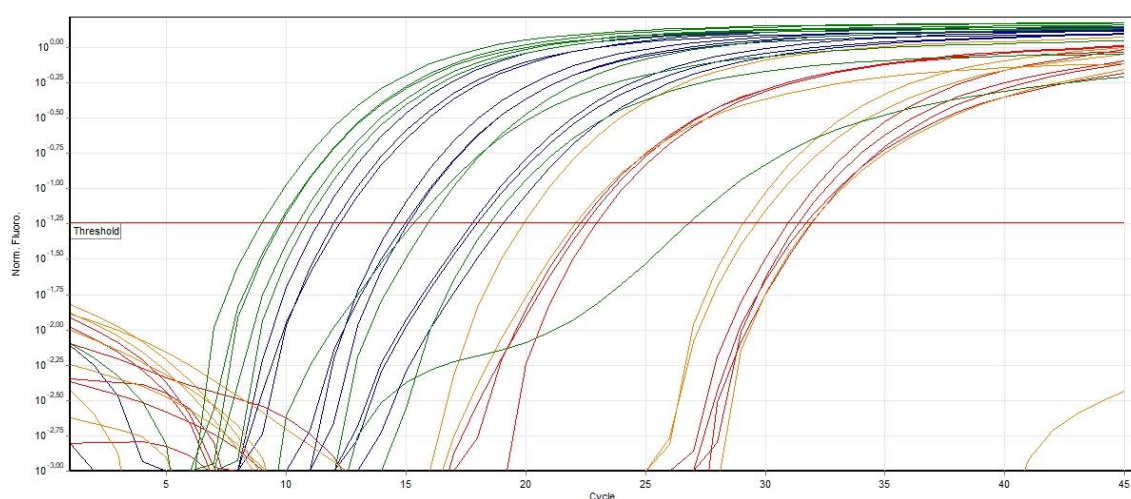


Figura 21: Análise da amplificação de DNA por qPCR dos diferentes vírus recombinantes nas passagens por células. Gráfico de fluorescência normalizada da amplificação do DNA de vírus brotado (BV) dos vírus vAcRepGP64 (azul), vAc Δ GP64 (vermelho), vAcCoveGP64 (verde) e vAcDisaF (amarelo). Todas as amostras amplificaram DNA viral.

A curva de “*melt*” obtida para a amplificação do DNA dos vírus brotados demonstra um único pico para cada amostra, variando em torno de 77,3 °C a 78,5 °C, o que mostra uma proximidade muito grande na constituição desses fragmentos de DNA gerados a nível de nucleotídeo (Figura 22). O *Threshold* estabelecido foi de 0,69273 a 73,3 °C.

Resultados

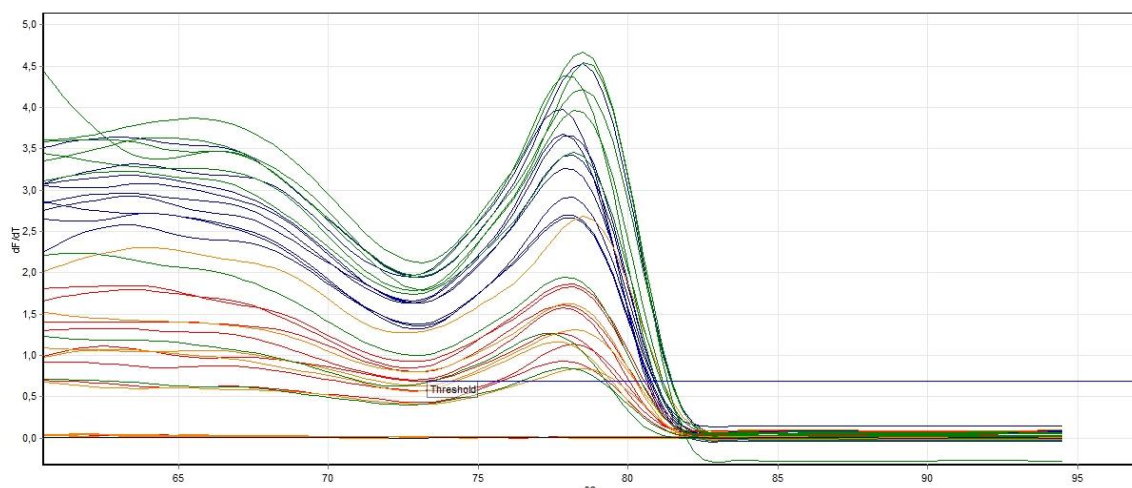


Figura 22: Análise da curva de desnaturalização (“*melt*”) dos produtos da qPCR utilizando DNA de vírus brotado (BV) dos vírus vAcRepGP64 (azul), vAcΔGP64 (vermelho), vAcCoveGP64 (verde) e vAcDisaF (amarelo). A curva de “*melt*” obtida para a amplificação do DNA dos vírus brotados demonstra um único pico para cada amostra, variando em torno de 77,3 °C a 78,5 °C.

5.5.2 Amplificação do DNA viral

A partir dos dados gerados na qPCR, foi possível estimar o número de partículas virais gerado a cada passagem celular com os baculovírus recombinantes (Figura 23).

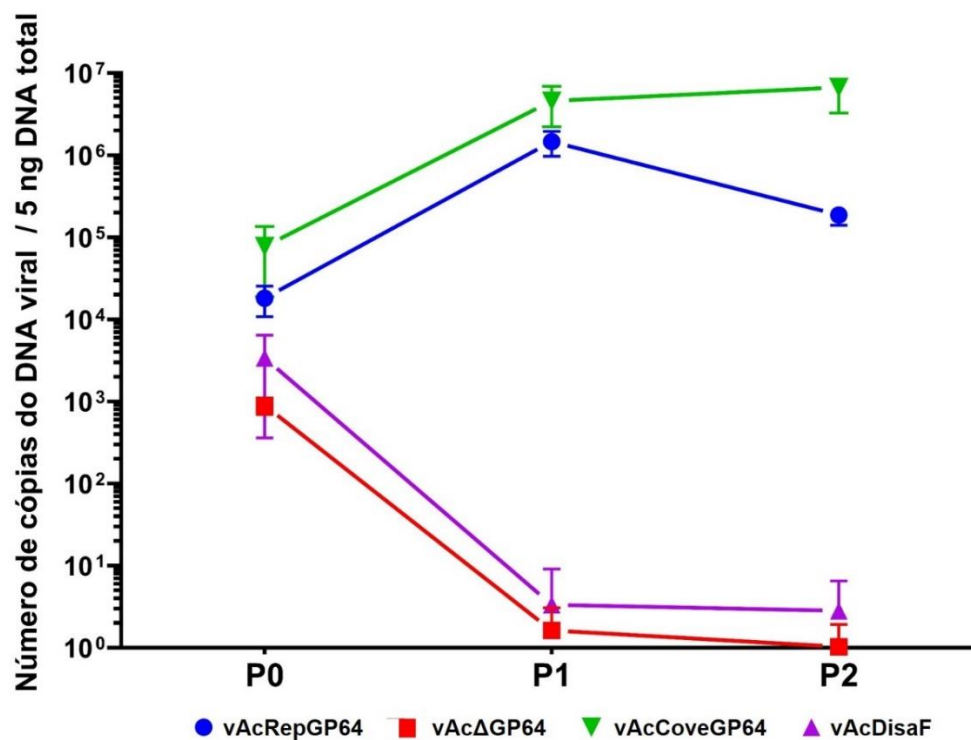


Figura 23: Quantificação da amplificação dos vírus recombinantes nas diferentes passagens por qPCR. Número de cópias do DNA viral dos baculovírus recombinantes (vAcRepGP64, vAcΔGP64, vAcCoveGP64 e vAcDisaF) em diferentes passagens (P0, P1 e P2) nas células Tn5B. Apenas os DNAs dos vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64 aumentaram nas infecções P1 e P2.

No sobrenadante da passagem 0, é verificável a detecção de DNA viral em todas as amostras, sendo que o vAcRepGP64 e vAcCoveGP64 demonstram uma maior quantidade já na transfecção, apesar de não ser significativo ($P \geq 0,9999$). Na passagem 1, a distinção entre as amostras com maior e menor presença de DNA viral fica mais evidente, onde as amostras do DNA vAcΔGP64 e vAcDisaF não superam o número de cem cópias de DNA, enquanto que as demais possuem mais de um milhão de cópias. Nesta passagem, o vAcCoveGP64 possui um número de cópias de DNA um pouco acima do que o controle positivo, mas que já é significativo ($P = 0,0362$). Comparando-se o vAcCoveGP64 com vAcΔGP64 e vAcDisaF, também foi observado um número de cópias significativamente maior ($P = 0,0015$). Na segunda passagem de infecção, os vírus vAcΔGP64 e vAcDisaF mantêm um padrão de quantificação aproximado do obtido na passagem 1, o que não é observado para os vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64, pois fica mais evidente a diferença na quantificação de cópias de DNA obtida. Nesta passagem, quando comparado o vAcCoveGP64 com as outras três amostras separadamente, foi atingido o valor de $P < 0,0001$.

5.6 Análise da expressão proteica

A partir da corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida desenvolvido para traçar o perfil proteico das amostras derivadas de transfecção ou infecção celular, foi possível analisar as características de cada amostra (Figura 24). Nas amostras de sobrenadante vAcRepGP64 e vAcCoveGP64 advindas de infecção celular, é vista uma grande concentração de proteínas na altura dentre os fragmentos de 55 e 70 kDa do marcador de peso molecular. Estas proteínas podem ser atreladas à abundante presença das proteínas GP64 encontradas nos vírus brotados (BVs) gerados ao longo da infecção celular. A altura em que estas proteínas aparecem então dentro do esperado, já que as GP64 de baculovírus possuem peso molecular próximo de 64 kDa.

Nas amostras de vAcDisaF e do controle negativo *mock* derivadas de sedimentos de célula, é observada a presença de diversas proteínas com pesos moleculares distintos. Esta diversidade é esperada em uma amostra de sedimento celular, vista a enorme variedade de proteínas encontradas nas células. Desta forma, adotar somente este método para analisar a amostra vAcDisaF se mostra insuficiente, pois não é possível diferenciá-la do controle negativo.

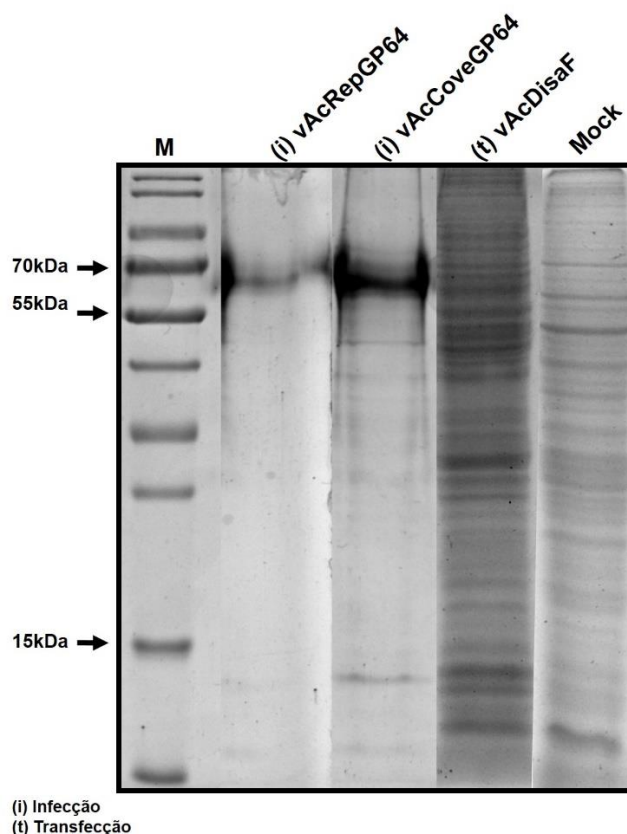


Figura 24: Análise do perfil proteico de células e sobrenadantes de células infectadas por diferentes vírus recombinantes. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de sobrenadantes de células infectadas (i) (7 d.p.i.) pelos vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64; sedimento de células transfectadas (t) (7 d.p.t.) com o bacmídeo bacAcDisaF e sedimento de células Tn5B não infectadas (*mock*). O tamanho em quilodaltos (kDa) de três fragmentos do marcador estão indicados por setas. Marcador de peso molecular de proteínas (M) *PageRuler™ Prestained protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Para melhor distinguir a presença da proteína F de DisaGV dentre as demais proteínas encontradas nas células, bem como confirmar a detecção da proteína GP64 do CoveNPV e do AcMNPV no sobrenadante celular, foi elaborada uma detecção imuno-específica por western blot com anticorpos policlonal anti-HA e monoclonal anti-GP64.

Em uma primeira análise, foi verificada a presença das proteínas CoveGP64 e DisaF através da detecção da HA-tag nelas contida (Figura 25). Foi observada a detecção da GP64 do CoveNPV no tamanho esperado, com ausência de marcações inespecíficas, contendo uma única banda com marcação forte semelhante ao controle positivo BACIAP2(HA+). A amostra vAcRepGP64, ao contrário, não obteve uma marcação forte na altura de sua GP64, confirmando a ausência de uma HA-tag em sua constituição.

Por outro lado, a detecção da proteína F do DisaGV permaneceu inconclusiva, pois várias marcações foram obtidas em diferentes tamanhos de peso molecular. Quando comparada esta amostra com o controle negativo, *mock*, que também obteve várias marcações, é possível identificar bandas semelhantes em torno de 35 kDa, podendo indicar a presença de proteínas celulares em comum nas duas amostras. As demais marcações de alto e baixo peso molecular que estão presentes somente em vAcDisaF, podem ser atribuídas à proteína F em diferentes estados de processamento proteico como clivagens e glicosilação. Porém, não há dados suficientes para concluí-lo, sendo necessária a adoção de novas estratégias de detecção de proteínas em consequência das limitações em gerar um inóculo viral viável, com quantidade de vírus brotado suficiente para elaborar mais ensaios.

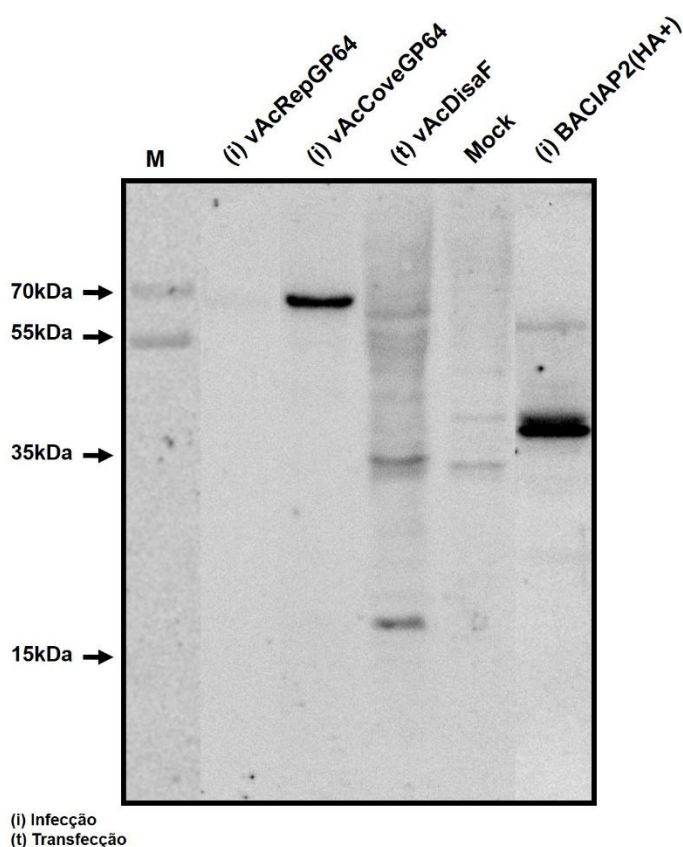


Figura 25: Imunodeteção das proteínas GP64 e F dos vírus vAcCoveGP64 e vAcDisaF, respectivamente. Western blot anti-HA de sobrenadante de células Tn5B infectadas (i) (7 d.p.i.) com os vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64, sedimento de células transfectadas (t) (7 d.p.t.) com o bacmídeo bacAcDisaF, sedimento de células Tn5B não infectadas (*mock*) e sedimento de células infectadas (i) (7 d.p.i.) com o baculovírus recombinante BACIAP2(HA+). O tamanho em quilodaltons (kDa) de quatro fragmentos do marcador estão indicados por setas. Marcador de peso molecular de proteínas (M) *PageRuler™ Prestained protein ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Em uma segunda análise utilizando o anticorpo anti-GP64, foi verificada a presença da proteína GP64 do AcMNPV (AcGP64) na amostra vAcRepGP64 como controle positivo e, ao mesmo tempo, observada a proteína CoveGP64 na amostra vAcCoveGP64 de forma indireta (Figura 26A). A partir desse método, foi confirmada a presença das proteínas GP64, indicando sua correta expressão durante a infecção celular. Em vAcCoveGP64 é vista uma fraca marcação na altura de sua proteína, não observado no controle negativo. As duas GP64 compartilham a mesma sequência dos 9 aminoácidos (SWKDASGWS) referente a região do epítipo reconhecido pelo anticorpo AcV5 (eBioscience™) (Figura 26B), sendo uma região muito conservada entre as GP64 de baculovírus (MONSMA; BLISSARD, 1995). Com isso, a marcação na altura próximo a 64 kDa já era esperada.

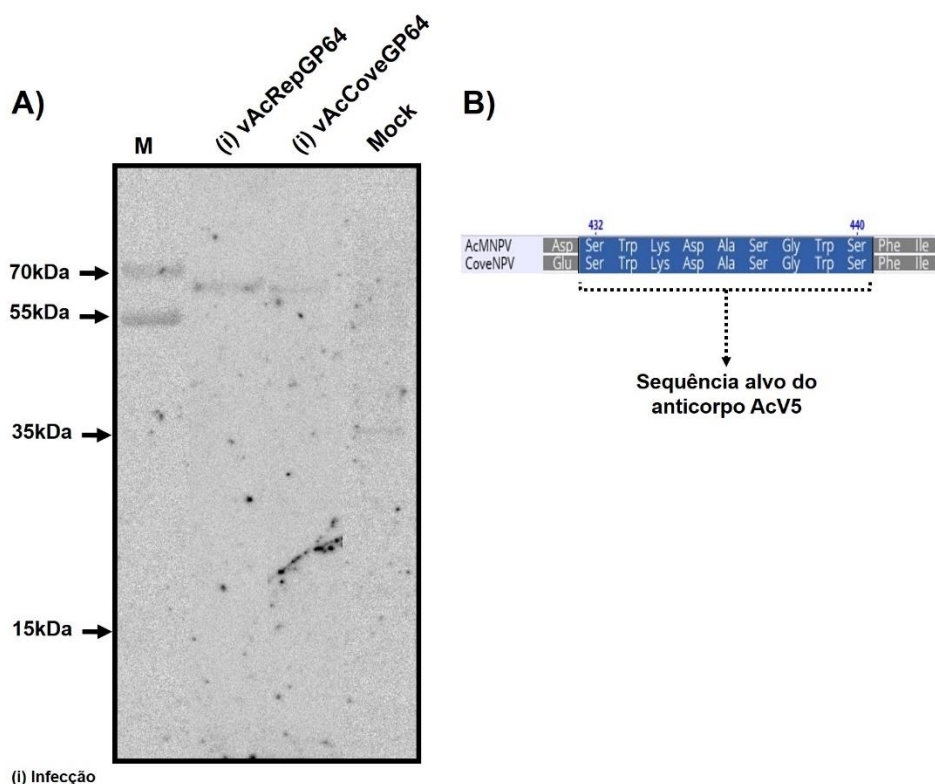


Figura 26: Imunodeteção da proteína GP64 em sobrenadante de células infectadas por baculovírus recombinantes. **A)** Western blot usando um anticorpo monoclonal (AcV5) anti-GP64 para as amostras de sobrenadante de células infectadas (i) com os vírus vAcRepGP64 e vAcCoveGP64 coletados 7 d p. i. e sedimento de células Tn5B não infectadas (*mock*). O tamanho em quilodaltons (kDa) de quatro fragmentos do marcador estão indicados por setas. (M) marcador de peso molecular de proteínas *PageRuler™ Prestained protein ladder* (Thermo Fisher Scientific). **B)** Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas GP64 dos baculovírus AcMNPV e CoveNPV feita no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters), mostrando a região referente ao epítipo do anticorpo monoclonal anti-GP64 AcV5 (eBioscience™).

5.7 Análises filogenéticas

Obtendo como base o alinhamento de sequência de aminoácidos de proteínas de fusão de envelope de baculovírus representativos, uma árvore filogenética foi construída para a proteína GP64 e outra para a proteína F. A árvore baseada em sequências de diversas GP64, apresentou um grande clado (verde) que agrupa todos os *Alphabaculovirus* do grupo I inseridos no alinhamento (Figura 27). Nele está inserida a proteína GP64 do CoveNPV que possui 72,8 % de similaridade com a sequência da proteína GP64 do AcMNPV. Porém, outros dois nucleopoliedrovírus demonstraram maior semelhança na sequência de aminoácidos com a proteína CoveGP64, sendo as proteínas GP64 do AgMNPV e do CfDEFNPV, contendo 92,4 % e 88,3 % de similaridade, respectivamente. Além das sequências de aminoácidos de *Alphabaculovirus* do grupo I, também foi inserida nesta análise a sequência da proteína homóloga a GP64 presente no *Betabaculovirus* DisaGV (roxo), a única descrita nesse gênero da família *Baculoviridae*. Esta proteína não se agrupou com o grupo I dos NPVs, demonstrando uma maior distância evolutiva para com as proteínas GP64 já encontradas em baculovírus. Esta maior distância é também verificada pela similaridade na sequência de aminoácidos ao se comparar com a proteína AcGP64 com 73,4 % e com a CoveGP64, na qual demonstra 66,5 % de similaridade.

A segunda árvore, baseada em sequências de aminoácidos de proteínas F de baculovírus, apresentou dois grandes clados, sendo um composto por sequências de *Alphabaculovirus* do grupo II (azul) e outro por *Betabaculovirus* (roxo) (Figura 28). A proteína F do DisaGV está inserida no clado do gênero *Betabaculovirus* e apresenta maior similaridade com a proteína do *Choristoneura fumiferana* granulovirus, ChfuGV, (38 %) e menor similaridade com a proteína do *Spodoptera frugiperda* granulovirus,

SfGV, (25 %). Já dentre os nucleopoliedrovírus do grupo II, a proteína DisaF demonstrou maior similaridade com o *Operophtera brumata* nucleopolyhedrovirus, OpbuNPV, (20,8 %) e menor similaridade com os baculovírus *Hemileuca species* nucleopolyhedrovirus (HespNPV), e *Perigonia lusca* single nucleopolyhedrovirus (PeluSNPV), no qual obtiveram igual porcentagem (16,7 %). Para melhor ilustrar a representação de proteínas F na história evolutiva dos baculovírus, foi inserida nesta análise a proteína F-like do AcMNPV (Ac23), uma proteína que não possui atividade fusogênica mas que está presente nos nucleopoliedrovírus do grupo I (verde). A proteína F-like apresenta uma distância filogenética considerável das demais proteínas F de baculovírus, possuindo apenas 11,3 % de similaridade com a sequência de aminoácidos da proteína DisaF.

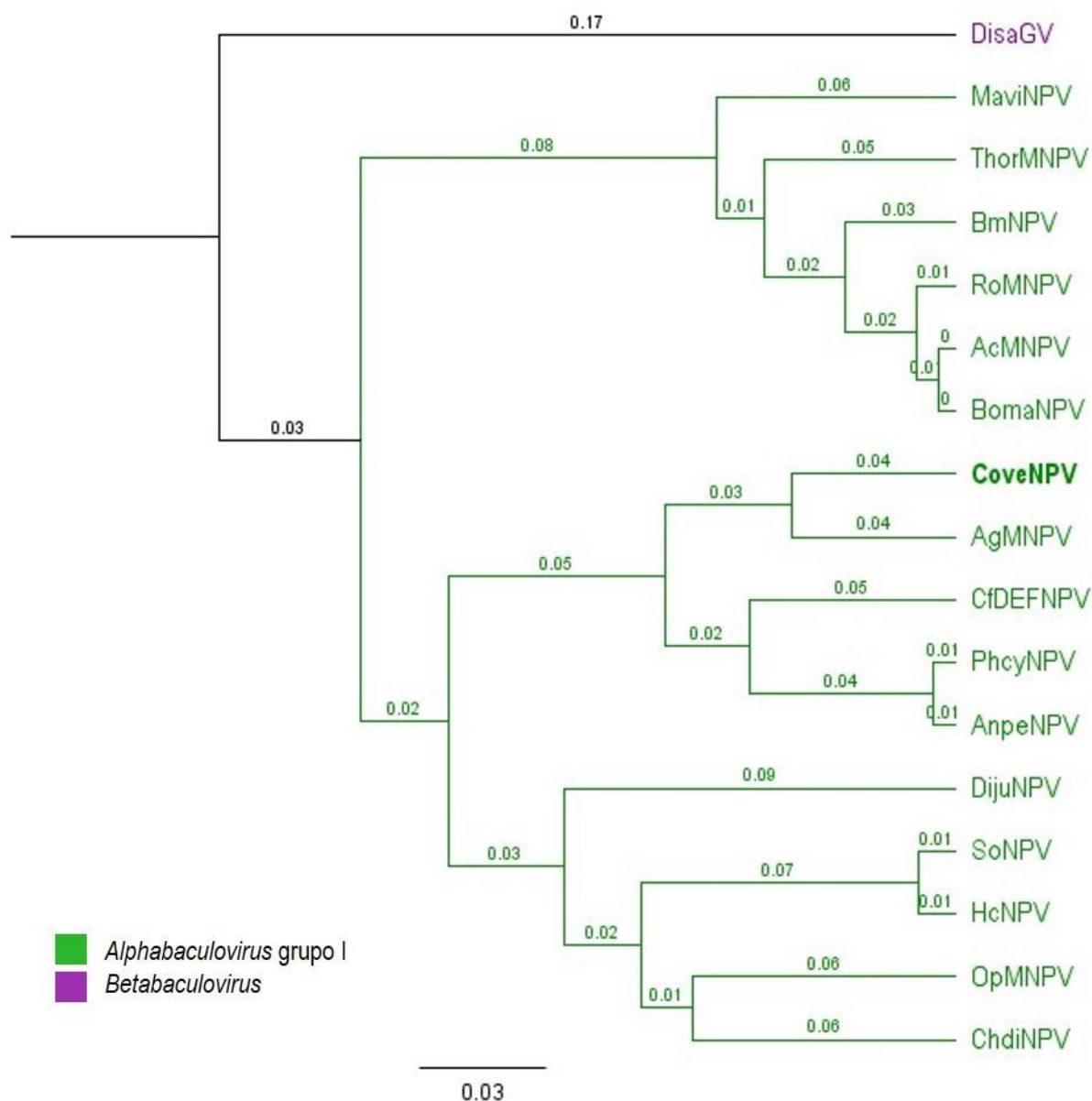


Figura 27: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas GP64 de baculovírus. Em verde, baculovírus representativos do grupo I dos *Alphabaculovirus*, no qual está inserido o CoveNPV. Em roxo, o DisaGV, sendo o único *Betabaculovirus* descrito com uma proteína homóloga à GP64, além da proteína F também presente neste granulovírus. Alinhamento feito segundo o método MUSCLE e árvore segundo o método UPGMA, utilizando o programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters). Os valores inseridos nos ramos se referem à substituição de aminoácidos por sítio.

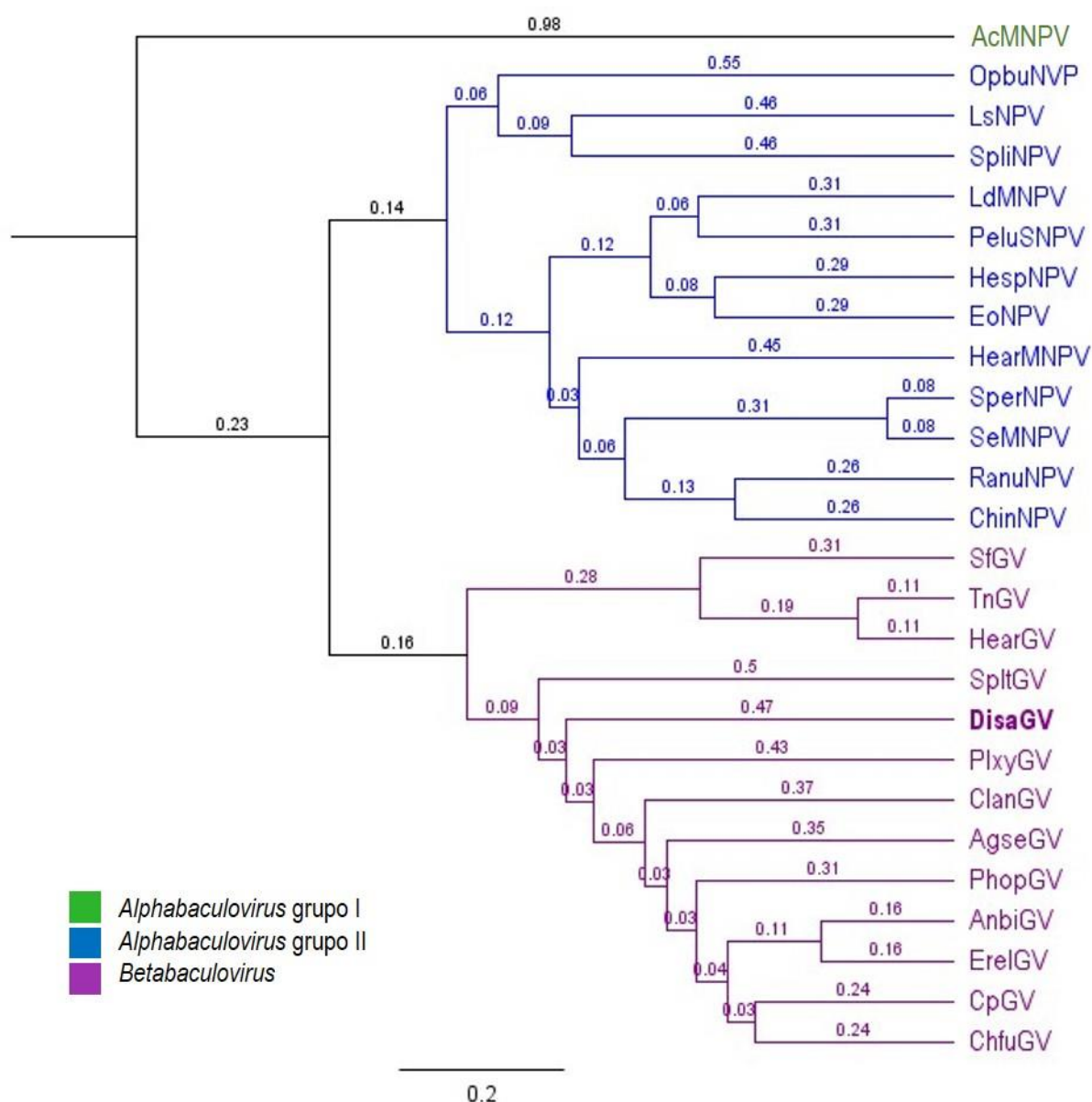


Figura 28: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas F de baculovírus. Em verde, o AcMNPV, um *Alphabaculovirus* do grupo I que possui uma proteína F defectiva (F-like), além da proteína GP64. Em azul, baculovírus representativos do grupo II no qual possuem como EFP a proteína F. Em roxo, *Betabaculovirus* representativos que possuem a proteína

F, no qual está incluso o DisaGV. Alinhamento feito segundo o método MUSCLE e árvore segundo o método UPGMA, utilizando o programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters). Os valores inseridos nos ramos se referem à substituição de aminoácidos por sítio.

5.8 Análise de regiões e domínios proteicos

A partir do alinhamento de sequências de aminoácidos de proteínas de fusão de envelope de diferentes baculovírus, foi possível prever regiões e domínios proteicos importantes para a função dessas proteínas. Para a análise da proteína CoveGP64, foram utilizadas as sequências das GP64 dos alphabaculovírus AcMNPV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) e AgMNPV, como também a do betabaculovírus DisaGV (Figura 29). O peptídeo sinal (PS) foi localizado próximo à extremidade N-terminal das proteínas GP64 a partir da predição de um sítio de clivagem. O domínio transmembrana (TM) foi localizado próximo à extremidade C-terminal das proteínas. Ambas regiões apresentaram baixa similaridade entre si, além das diferenças nos tamanhos das sequências de aminoácidos. Ainda assim, é possível observar alguns aminoácidos conservados nessas regiões. Ao longo de toda região solúvel das proteínas, entre PS e TM, a maior parte da sequência apresenta alta similaridade. Nesta região, são localizados os cinco sítios de glicosilação descritos para a proteína AcGP64. Dentre estes cinco sítios, quatro (N-197, N-355, N-385 e N-426) já haviam sido confirmados como sendo utilizados pelo AcMNPV e um não seria utilizado (N-159) (JARVIS et al., 1998). De todos os sítios de glicosilação conservados entre os *Alphabaculovirus*, foi observada uma substituição no sítio N-355, onde o aminoácido asparagina foi substituído por glutamina, um outro aminoácido polar. Este mesmo sítio também demonstrou uma substituição na GP64 do betabaculovírus DisaGV, onde o aminoácido presente é isoleucina (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016b).

Resultados

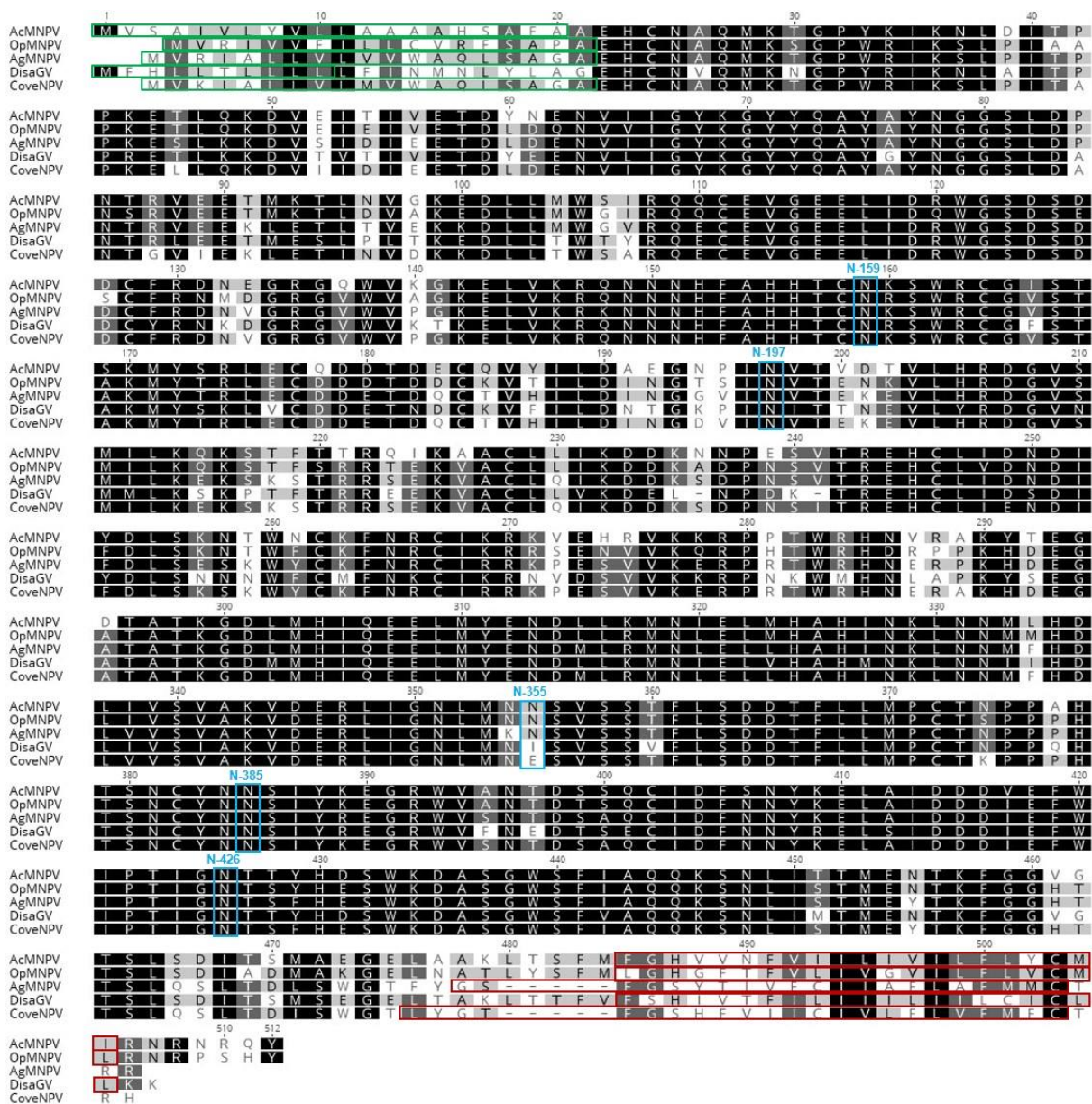


Figura 29: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de proteínas GP64. A proteína CoveGP64 foi alinhada com as EFPs dos alphabaculovírus AcMNPV, OpMNPV e AgMNPV, juntamente com o betabaculovírus DisaGV utilizando o método MUSCLE. A escala de cores dos aminoácidos indicam o grau de similaridade, sendo baixa (branca), mediana (cinza) ou alta (preta) similaridade. Regiões referentes ao peptídeo sinal (PS) foram preditas com o servidor EMBOSS *sigcleave* v. 6.5.7 e SignalP v. 5.0 (verde), domínios transmembrana (TM) com o servidor TMHMM v. 4.1 (vermelho) e os sítios de glicosilação (N-159, N-197, N-355, N-385 e N-426) foram preditos a partir dos sítios já caracterizados para a proteína AcGP64 (azul). Figura gerada no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters).

Figura 30: Alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas F. A proteína DisaF foi alinhada com as EFPs dos alphabaculovírus AcMNPV (grupo I) e LdMNPV (grupo II) e com os betabaculovírus AgseGV e PlxyGV utilizando o método MUSCLE. A escala de cores dos aminoácidos indicam o grau de similaridade, sendo baixa (branca), mediana (cinza) ou alta (preta) similaridade. Regiões referentes ao peptídeo sinal (PS) foram preditas com o servidor EMBOSS *sigcleave* v. 6.5.7 e SignalP v. 5.0 (verde), domínios transmembrana (TM) com o servidor TMHMM v. 4.1 (vermelho) e os sítios de clivagem de furina com o servidor Prop v. 1.0 (alaranjado). Figura gerada no programa Geneious v. 11.1.5 (Biomatters).

Para melhor analisar as regiões e domínios da proteína DisaF, foi utilizada a sequência da proteína F-like do AcMNPV, a proteína F do *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV), um *Alphabaculovirus* do grupo II, juntamente com as proteínas dos granulovírus *Agrotis segetum* GV (AgseGV) e *Plutella xylostella* GV (PlxyGV) (Figura 30). O peptídeo sinal foi localizado próximo à extremidade N-terminal e o domínio transmembrana próximo à extremidade C-terminal das proteínas F. Estas regiões e domínios demonstraram uma maior divergência na similaridade das sequências de aminoácidos nos e tamanhos quando comparados à GP64. Sítios de clivagem de furina foram preditos para as proteínas do LdMNPV, AgseGV, DisaGV e dois possíveis sítios para PlxyGV, um em seguida do outro. Como já esperado, a F-like do AcMNPV não obteve sítio de furina previsto, já que este fato está possivelmente relacionado à ausência de atividade fusogênica observada em F-like, uma vez que a clivagem deste sítio expõe o peptídeo de fusão responsável pela interação com as células do hospedeiro (WESTENBERG et al., 2002). De maneira geral, a conservação de aminoácidos é pouco observada ao longo de toda sequência, demonstrando que essas proteínas não possuem similaridade na sequência de aminoácidos, mas sim, na conservação de sua estrutura e forma de atuação.

6

Discussão

6 DISCUSSÃO

A partir da construção e confirmação dos baculovírus recombinantes contendo as proteínas CoveGP64 e DisaF, foram elaborados ensaios a fim de testar a atividade destas proteínas. Com os resultados obtidos, foi possível constatar a confirmação das hipóteses previamente elaboradas acerca da funcionalidade dessas proteínas de fusão de envelope em um contexto de infecção *in vitro*. O vírus vAcCoveGP64 demonstrou ter uma alta infectividade em células Tn5B, com tempo de infecção e capacidade de replicação do seu material genético muito semelhante ao vírus vAcRepGP64 adotado como controle positivo. Por outro lado, o vírus vAcDisaF demonstrou ter uma baixa infectividade, sendo inábil em acessar as células, produzir e espalhar novas partículas no meio, se assemelhando ao vírus vAcΔGP64 que não possui proteína de fusão. De todos ensaios elaborados para testar a infectividade dos vírus, essas características prevaleceram.

No ensaio de transfecção e infecção de células Tn5B, ficou evidente a capacidade da proteína CoveGP64 de substituir a AcGP64, conseguindo infectar todas as células presentes no poço da placa, gerando efeitos citopáticos comuns para um baculovírus, conduzindo o processo de infecção até o final com a produção de poliedros sendo observada na grande maioria das células em 120 h.p.i., além da fluorescência verde indicar infecção de forma unânime entre as células. Em um estudo prévio de complementação de um *gp64*-null AcMNPV com a proteína GP64 do OpMNPV (NPV do grupo I) sendo expressa constitutivamente por uma linhagem de célula Sf9 (Sf9^{OP64-6}), foi constatada a produção de BVs capazes de propagar a infecção em células Sf9 selvagens (MONSMA; OOMENS; BLISSARD, 1996). No estudo de substituição da AcGP64 pela GP64 do DisaGV, também foi observada a recuperação da infectividade viral mesmo esta proteína sendo uma EFP com baixa similaridade de aminoácidos com as demais GP64 de baculovírus, no entanto, ela mantém uma estrutura proteica conservada (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016b). De forma geral, as proteínas GP64 revelam um grau de similaridade suficiente para gerar um cenário favorável para trocas.

Diferentemente, a proteína DisaF não foi capaz de substituir a AcGP64. Logo na transfecção já é possível observar uma diferença significativa para com o controle positivo, pois as partículas virais produzidas parecem não ter a habilidade de

proporcionar fusão entre as células ali presentes. Este fato é reforçado na passagem seguinte, sendo observado pouco efeito citopático e uma fluorescência muito basal em algumas células, contudo, esta não compreendia a célula como um todo. Além disso, não foi observada a produção de poliedros até mesmo após as 120 h.p.i., indicando um processo de infecção fraco e incompleto. Estes sinais não se repetem na última passagem, demonstrando a incapacidade do vírus vAcDisaF de gerar uma progênie viral infectiva. Estudos anteriores feitos com diferentes proteínas F de *Alphabaculovirus* do grupo II e *Betabaculovirus*, foram obtidos diferentes resultados de substituição da proteína AcGP64. Dentre os NPVs do grupo II, é relatado que as proteínas F de SeMNPV, LdMNPV e HearNPV conseguiram pseudotipar um *gp64*-null AcMNPV, sendo que o LdMNPV alcançou um título viral maior quando utilizado o promotor do gene *gp64* para controlar a expressão gênica quando comparado com o promotor da poliedrina (LONG et al., 2006; LUNG et al., 2002). Já dentre os granulovírus há relatos de substituições que foram eficientes como também que não foram eficientes. As proteínas F dos vírus AgseGV, XecnGV, CpGV e PhopGV conseguiram recuperar a infectividade do AcMNPV sem o gene *gp64* de forma eficiente, ao passo que a proteína do ChocGV demonstrou poucos indícios de recuperação da infecção como o obtido com a proteína DisaF, porém, o vírus recombinante com a proteína F de PlxyGV não expressou nenhum sinal de infecção (YIN et al., 2008, 2013). Esses resultados colaboram com o entendimento que se tem da grande divergência existente entre as proteínas F de baculovírus, resultado de longos anos de especialização aos seus hospedeiros, dando características particulares a cada uma delas a ponto de dificultar cenários de substituições.

Em uma outra tentativa de substituir a AcGP64 com uma proteína heteróloga, foi demonstrado que a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV) foi capaz de gerar infecção, se replicar e se propagar em culturas de células Sf9, possibilitando também a transdução em células de mamífero (BARSOUM et al., 2008; MANGOR et al., 2001). Estes estudos deram aos baculovírus novos horizontes de aplicação na saúde humana, além de reforçar a poderosa ferramenta que é a substituição de EFPs para o estudo dessas proteínas.

No ensaio de contagem de células GFP positivas, foi verificada de forma quantitativa o resultado obtido no ensaio de transfecção e infecção de células. Ao longo das passagens do vírus vAcCoveGP64, cerca de 100% das células emitiram de forma integral a fluorescência verde, indicando que as partículas virais foram

produzidas em quantidades suficientes para alcançarem todas as células e que, somado a isso, a proteína CoveGP64 conseguiu mediar a entrada por fusão ou endocitose na célula Tn5B. Nas passagens com o vírus vAcDisaF, a fluorescência emitida obteve uma baixa porcentagem. Na transfecção, a fluorescência apresentada ficou em torno de 10 a 15% das células. Na primeira passagem de infecção, apenas 1% e na segunda passagem, 0%. Este resultado fica muito próximo do controle negativo que obteve em torno de 7% de células verdes na transfecção e 0% nas passagens seguintes, levando a considerar que a proteína DisaF não é compatível com a estrutura necessária que um AcMNPV necessita para acessar, entrar e, conseqüentemente, se espalhar por células Tn5B.

Visto que nem toda partícula viral produzida durante a infecção celular é necessariamente infectiva, uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) foi elaborada para quantificar as moléculas de DNA viral contidas no sobrenadante celular e, a partir disso, averiguar se o número de partículas formadas era compatível com o grau de infecção observado para cada vírus recombinante em cada uma das passagens. O resultado demonstrou que, mesmo em quantidades menores, a transfecção com o bacmídeo bacAcDisaF produziu partículas virais que foram liberadas para o meio extracelular, assim como com bacAc Δ GP64. Mas a partir da passagem seguinte, as partículas virais contendo a proteína DisaF falharam no processo de entrada nas células, impedindo que novas partículas virais fossem sintetizadas através da replicação viral e transcrição gênica. Sem essas novas partículas, a infecção não pôde chegar até a última passagem por células. Diferindo desse resultado, o bacmídeo bacAcCoveGP64 gerou partículas virais contendo a proteína CoveGP64 que pôde, de forma altamente eficaz, proporcionar a entrada em todas as células, possibilitando o aumento da progênie com o uso da maquinaria de replicação e transcrição celular, alcançando um número de moléculas de DNA viral ligeiramente maior do que o controle positivo.

Mas para melhor assegurar esses resultados, fazia-se necessário avaliar a correta expressão das proteínas estudadas. Uma vez que o sedimento celular é composto por uma variedade de proteínas, o mais ideal seria utilizar o sobrenadante das células infectadas com os baculovírus recombinantes. Para o vAcCoveGP64 foi possível fazer essa utilização, já que este vírus produzia em poucos dias um inóculo viral altamente infectivo. Mas para o vAcDisaF não foi possível utilizar o sobrenadante celular de infecção, pois o número de partículas virais produzidas era insuficiente para

realizar a detecção da proteína de fusão. Com isso, apesar do sedimento celular apresentar algumas desvantagens em relação ao sobrenadante, ele foi utilizado para analisar a expressão da proteína DisaF. A constituição proteica esperada para cada tipo de amostra foi observada em gel de poliacrilamida. O sobrenadante, em sua maioria, é composto por partículas de vírus brotado (BV), no qual há uma maior concentração das proteínas de fusão de envelope, neste caso, a GP64 do CoveNPV. Já o sedimento celular é composto por várias proteínas de peso molecular e concentrações diferenciados, não sendo possível distinguir a presença e o peso molecular da proteína DisaF dentre as demais.

A expressão correta da proteína CoveGP64 foi confirmada por Western Blot em um peso molecular próximo ao da AcGP64 de 64 kDa. Este resultado indica que houve um correto processamento e incorporação da proteína na partícula viral do vírus vAcCoveGP64. A expressão da proteína DisaF, no entanto, permaneceu inconclusiva, pois foram observadas marcações em pesos moleculares distintos e, apesar de algumas marcações se assemelharem ao *mock*, não é possível comprovar se se trata de marcações inespecíficas do extrato celular ou se são marcações correspondentes à produtos de processamentos incorretos da proteína DisaF por parte do AcMNPV ou por conta da célula Tn5B. Para elucidar essa questão, a adoção de outros meios para obtenção de um inóculo viável advindo do vírus vAcDisaF é imprescindível para analisar a expressão proteica.

Apesar da falta de clareza da expressão da proteína DisaF, fica evidente nos demais experimentos a sua incompatibilidade com um alphabaculovírus do grupo I, levando a não recuperação de sua infectividade. Somado a isso, o fato da proteína CoveGP64 ter conseguido substituir a AcGP64 traz vestígios de uma tendência evolutiva no cenário das proteínas de fusão de envelope na família *Baculoviridae*. Quando analisada a árvore filogenética de proteínas GP64, é visto que a incidência desta proteína se encontra nos NPVs do grupo I, além de uma exceção encontrada no betabaculovírus DisaGV. Esta exceção pode indicar um evento de transferência horizontal de sucesso, pois, apesar da presença da proteína F no DisaGV, a permanência da GP64 representa uma contribuição positiva para este vírus. No entanto, não é possível afirmar exatamente qual a contribuição de cada uma dessas EFPs no contexto de infecção do DisaGV na natureza, visto que mais estudos serão necessários para desvendar essa exceção entre os baculovírus.

A GP64 do CoveNPV demonstrou estar mais filogeneticamente relacionada com as proteínas presentes nos vírus AgMNPV e CfDEFNPV do que com a proteína do AcMNPV. Porém, este fato não impediu que a CoveGP64 pudesse substituir de forma eficiente a AcGP64. Isso demonstra a grande proximidade existente entre as GP64 do grupo I, podendo ocorrer uma substituição de sucesso com maior probabilidade entre elas. Além da proximidade filogenética, as GP64 de baculovírus demonstram uma alta similaridade a nível de aminoácidos, chegando a mais de 90 % de semelhança. A conservação de grande parte da sequência, sugere um menor tempo de variação contribuindo com a hipótese de aquisição mais recente desta proteína pelos baculovírus (PEARSON; ROHRMANN, 2002). A baixa variação da sequência também indica uma menor dependência de fatores intrínsecos às células dos hospedeiros, reforçando uma característica previamente elucidada de que a maior atuação das GP64 é por meio de fusão direta mediada por baixo pH do que por endocitose (WANG et al., 2014). Esse fato também explica a maior facilidade da GP64 em transitar entre diferentes famílias e gêneros de vírus e substituir proteínas com a mesma função com que a sua.

Por outro lado, a proteína F apresenta uma relação filogenética muito diversa entre os baculovírus. Sua distribuição ocorre por toda a árvore, sendo mais incidente do que a GP64. Sua ampla existência na família *Baculoviridae* sugere uma presença anterior à da GP64, indicando ser a EFP mais ancestral nessa família. A enorme falta de similaridade na sequência de aminoácidos se reflete nas baixas porcentagens, não ocorrendo números maiores que 40%. Ao longo das sequências, são notadas tímidas regiões conservadas, podendo esta alta variabilidade ser relacionada à maior quantidade de eventos de especiação que gera mais especificidade aos hospedeiros. Isso também acarreta na maior dependência de fatores intrínsecos às células, como receptores de ligação envolvidos na entrada do vírus. Essas características da proteína F se manifestam na via de entrada mais utilizada por ela que é a via da endocitose (WANG et al., 2014).

Embora haja diferentes padrões de conservação de aminoácidos entre as proteínas de fusão de baculovírus, o alinhamento de algumas sequências revelaram uma manutenção na estrutura das proteínas no que se refere a regiões e domínios essenciais para a sua atividade. A região do peptídeo sinal, responsável por encaminhar a proteína recém sintetizada para a membrana citoplasmática, e o domínio transmembrana, que interage com o envelope viral, foram determinadas em

todas as sequências analisadas. Sítios de glicosilação, importantes para um transporte, montagem e fusão eficientes, também foram determinados em todas as proteínas GP64 (JARVIS et al., 1998). O sítio correspondente a posição N-355 não foi estabelecido para CoveGP64, pois apresentou uma troca do aminoácido asparagina por glutamina. No entanto, essa perda não parece afetar a eficiência da infectividade do CoveNPV, uma vez que os outros sítios permanecem conservados. Os sítios de clivagem de furina, essenciais para a exposição do peptídeo de fusão das proteínas F, foram encontrados para as sequências verificadas, fora a já conhecida exceção da proteína F-like do AcMNPV que não possui este sítio, dando a ela a incapacidade de proporcionar fusão de membranas (ROHRMANN; KARPLUS, 2001; WESTENBERG et al., 2002). O fato da proteína GP64 não necessitar de clivagem por parte de uma enzima do hospedeiro para realizar sua função, expõe mais uma vantagem desta proteína sobre a proteína F.

Os estudos até o momento elaborados com o intuito de compreender os eventos de evolução dentro da família *Baculoviridae*, indicam que, a partir da aquisição do gene *gp64* por um nucleopoliedrovírus ancestral do grupo II, uma pressão seletiva foi gerada na proteína F já presente, fazendo com que ela perdesse sua função principal de fusão e dando origem a proteína F-like (JIANG et al., 2009). Uma pergunta pertinente é se a proteína F do DisaGV estaria também sofrendo essa pressão seletiva negativa por parte da GP64 também presente neste vírus a ponto de perder sua capacidade de fusão? No entanto, para responde-la, seria necessário compreender de fato o papel de cada uma dessas EFPs no percurso de uma infecção natural em lagartas de *D. saccharalis*. Apesar de no presente estudo não ter sido verificada uma atividade fusogênica eficiente na DisaF, esta proteína apresenta um sítio de clivagem de furina conservado, dando a ela a potencialidade de expor seu peptídeo de fusão e proporcionar a entrada do vírus na célula. Uma limitação deste trabalho foi o fraco paralelismo entre AcMNPV e DisaGV, dificultando a interpretação do resultado negativo da pseudotipagem de DisaF. A ausência de sistemas *in vitro* de infecção de granulovírus em linhagens celulares de inseto dificulta a geração de recombinantes com deleções, algo que poderia ser feito com o DisaGV, deixando-o apenas com a DisaF ou apenas com a DisaGP64, permitindo a avaliação do efeito individual de cada EFP sobre o fenótipo.

Um fato interessante de observar é a ausência do gene *ac23* no CoveNPV que codifica a proteína F-like nos *Alphabaculovirus* do grupo I (CASTRO et al., 2017). A

perda desse gene pode ter ocorrido em algum evento de recombinação, no qual outros genes ausentes (*gp37*, *v-cath* e genes *chiA*) podem ter sido perdidos também. Apesar da ausência de atividade de fusão, essa proteína já foi relacionada com o aumento no número de partículas virais oclusas no poliedro, no aumento da infectividade do BV e também como sendo um fator de virulência para o inseto hospedeiro (LUNG; CRUZ-ALVAREZ; BLISSARD, 2003; WANG et al., 2008; YU et al., 2009). Entretanto, mesmo com essas possíveis funções da proteína F-like, o vírus CoveNPV demonstra ter um alto potencial infectivo, podendo indicar que o gene *ac23* não tenha uma função essencial para a perpetuação deste vírus na natureza.

7

Conclusões e Perspectivas

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como conclusão desta dissertação, tem-se que a proteína GP64 do alphabaculovírus CoveNPV foi capaz de recuperar eficientemente um AcMNPV sem o gene *gp64* e que a proteína F do betabaculovírus DisaGV falhou na substituição da proteína GP64 do AcMNPV. Os motivos pelos quais cada uma dessas proteínas de fusão apresentaram resultados distintos estão relacionados às divergências na constituição molecular de cada uma delas. Apesar de exercerem a mesma função de proporcionar fusão de membranas, a origem e relação filogenética entre elas demonstraram divergências evolutivas.

A proteína CoveGP64 é bastante similar à AcGP64, possuindo grande parte da sequência de aminoácidos conservadas entre elas, levando o vírus recombinante que possuía a proteína GP64 do CoveNPV a proporcionar a entrada nas células de forma muito semelhante ao que continha a GP64 do AcMNPV. Esse padrão de infectividade muito próximo leva a considerar que a expressão dos genes, síntese e pós-processamento proteico ocorreram de maneira inalterada. Essas características demonstram uma íntima relação filogenética observada entre os vírus CoveNPV e AcMNPV.

Um cenário oposto foi verificado com o vírus recombinante que possuía a proteína F do DisaGV. A enorme variação na sequência de aminoácidos da proteína DisaF em comparação com a AcGP64 impossibilitou o vírus recombinante de exercer sua entrada de forma eficiente nas células. A função de fusão pode não ter ocorrido pela grande diferença observada entre as proteínas GP64 e F, que deriva na incompatibilidade de uma proteína de fusão de envelope de um betabaculovírus de exercer sua função de acordo com a estrutura que um *Alphabaculovirus* do grupo I necessita para entrar nas células. No entanto, houve divergências na detecção correta da expressão da proteína DisaF, podendo ser resultado de um processamento proteico incorreto. A possibilidade desta proteína exercer fusão de membranas não é descartada, visto a conservação de regiões e domínios próprios de uma F funcional. É fundamental que haja novas estratégias para esclarecer a expressão desta proteína F em um sistema baseado em baculovírus e sua consequente inabilidade em recuperar sua infectividade.

Com isso, as hipóteses previamente desenvolvidas nesta dissertação foram satisfeitas, de modo a possibilitar, a partir delas, novas estratégias para a continuação e aperfeiçoamento do uso biotecnológico do CoveNPV no campo e na melhor caracterização do papel da proteína F na história do DisaGV, podendo trazer novas descobertas sobre os caminhos que os baculovírus percorreram na aquisição e substituição de proteínas de fusão de envelope ao longo de sua evolução.

Perspectivas:

- CoveNPV

- Quantificar o DNA viral do vAcCoveGP64 em sedimentos de células infectadas a fim de comparar com a quantidade de DNA viral encontrada no sobrenadante de células infectadas pelo mesmo vírus;
- Detectar a proteína GP64 do CoveNPV no vírus brotado do baculovírus recombinante vAcCoveGP64 através de imunomarcação com partículas de ouro e visualizar com Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Publicar os resultados obtidos da análise funcional da proteína CoveGP64.

- DisaGV

- Quantificar o DNA viral do vAcDisaF em sedimentos de células infectadas a fim de comparar com a quantidade de DNA viral encontrada no sobrenadante de células infectadas pelo mesmo vírus;
- Construir um baculovírus recombinante contendo a proteína GP64 do AcMNPV mais a proteína F do DisaGV a fim de produzir um inóculo viral viável para ensaios de detecção desta proteína;
- Quantificar o DNA viral deste novo baculovírus recombinante no sedimento celular, bem como no sobrenadante de células infectadas;

- Detectar a proteína DisaF através de imunomarcação com partículas de ouro e visualizar com MET;
- Elaborar ensaio de fusão por expressão transiente em células de inseto seguida por tratamento com pH baixo para testar a capacidade fusogênica da proteína DisaF;
- Publicar os resultados obtidos da análise funcional da proteína DisaF.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H. W.; SMIRNOFF, W. A. A morphological investigation of 23 baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, n. 3, p. 269–280, 1983.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. et al. A betabaculovirus encoding a gp64 homolog. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2016a.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. et al. A Betabaculovirus-Encoded gp64 Homolog Codes for a Functional Envelope Fusion Protein . **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1668–1672, 2016b.
- BARSOUM, J. et al. Efficient Transduction of Mammalian Cells by a Recombinant Baculovirus Having the Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 17, p. 2011–2018, 2008.
- BERGKESSEL, M.; GUTHRIE, C. Colony PCR. In: **Methods in Enzymology**. 529. ed. São Francisco, CA: Elsevier Inc., 2013. p. 299–309.
- BLISSARD, G. W.; THEILMANN, D. A. Baculovirus entry and egress from insect cells. **Annual Review of Virology**, v. 5, p. 113–139, 2018.
- BLISSARD, G. W.; WENZ, J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 66, n. 11, p. 6829–6835, 1992.
- CASTRO, M. E. B. et al. **Identificação do baculovírus da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae)** Brasília - DFEMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, , 2003.
- CASTRO, M. E. B. et al. Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, n. 2, p. 149–154, 2009.
- CASTRO, M. E. B. et al. The genome sequence of *Condylorrhiza vestigialis* NPV, a novel baculovirus for the control of the Alamo moth on *Populus* spp. in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 148, n. March, p. 152–161, 2017.
- CHEN, Y.-R. et al. The Transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Cells. **Journal of Virology**, v. 87, n. 11, p. 6391–6405, 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. 1. ed. Brasília - DF: [s.n.]. v. 8

DONG, S. et al. Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Efficiently Infects Sf9 Cells and Transduces Mammalian Cells via Direct Fusion with the Plasma Membrane at Low pH. **Journal of Virology**, v. 84, n. 10, p. 5351–5359, 2010.

FEDERICI, B. A. Ultrastructure of baculoviruses. In: GRANADOS, R.; FEDERICI, B. (Eds.). **The Biology of Baculoviruses**. 1. ed. Boca Raton (FL): CRC Press (EUA), 1986. p. 61–88.

GRANADOS, R. R. et al. A new insect cell line from Trichoplusia ni (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to Trichoplusia ni single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 3, p. 260–266, 1994.

GRANADOS, R. R.; LAWLER, K. A. In vivo pathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection. **Virology**, v. 108, n. 2, p. 297–308, 1981.

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Virology**, v. 479–480, p. 498–507, 2015.

IJKEL, W. F. J. et al. Sequence and organization of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 12, p. 3289–3304, 1999.

IJKEL, W. F. J. et al. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. **Virology**, v. 275, n. 1, p. 30–41, 2000.

JARVIS, D. L. et al. Mutational Analysis of the N-Linked Glycans on Autographa californica Nucleopolyhedrovirus gp64. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9459–9469, 1998.

JEHLE, J. A. et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257–1266, 2006.

JIANG, Y. et al. Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. **Virus Research**, v. 142, n. 1–2, p. 85–91, 2009.

KADLEC, J. et al. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 10, p. 1024–1030, 2008.

KUZIO, J. et al. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for Lymantria dispar. **Virology**, v. 253, n. 1, p. 17–34, 1999.

LONG, G. et al. Function, oligomerization and N-linked glycosylation of the Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 839–846, 2006.

LUCKOW, V. A. et al. 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**, v. 67, n. 8, p. 4566–4579, 1993.

LUNG, O. et al. Pseudotyping *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F Proteins from Group II NPVs Are Functionally Analogous to AcMNPV GP64. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5729–5736, 2002.

LUNG, O. Y.; CRUZ-ALVAREZ, M.; BLISSARD, G. W. Ac23, an Envelope Fusion Protein Homolog in the Baculovirus *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus, Is a Viral Pathogenicity Factor. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 328–339, 2003.

MANGOR, J. T. et al. A GP64-Null Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G Protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 6, p. 2544–2556, 2001.

MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. **A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks**. 4. ed. Portland (OR): Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station (EUA), 1986.

MIELE, S. A. B. et al. Baculovirus: Molecular Insights on Their Diversity and Conservation. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

MONSMA, S. A.; BLISSARD, G. W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. **Journal of Virology**, v. 69, n. 4, p. 2583–2595, 1995.

MONSMA, S. A.; OOMENS, A. G. P.; BLISSARD, G. W. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. **Journal of Virology**, v. 70, n. 7, p. 4607–4616, 1996.

MORGADO, F. DA S. **Caracterização de promotores de genes virais durante a infecção de células de inseto com baculovírus recombinantes**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.

MORGADO, F. DA S. et al. *Trichoplusia ni* and *Chrysodeixis includens* larvae show different susceptibility to *Chrysodeixis includens* single nucleopolyhedrovirus per os infection. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 3, p. 1019–1029, 2020.

PEARSON, M. N.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G. F. Identification of the *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Envelope Fusion Protein Provides Evidence for a Phylogenetic Division of the Baculoviridae. **Journal of Virology**, v. 74, n. 13, p. 6126–6131, 2000.

PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Transfer, Incorporation, and Substitution of Envelope Fusion Proteins among Members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (Insect Retrovirus) Families. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5301–5304, 2002.

PEARSON, M. N.; RUSSELL, R. L. Q.; ROHRMANN, G. F. Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. **Virology**, v. 291, n. 1, p. 22–31, 2001.

PENG, R. et al. Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 42, p. E8905–E8912, 2017.

RIBEIRO, B. M. et al. Baculovirus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. (Eds.). . **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. 1. ed. Belo Horizonte (MG): Bluncher, 2015. p. 256–306.

ROHRMANN, G. Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019a. p. 1–19.

ROHRMANN, G. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019b. p. 57–82.

ROHRMANN, G. Baculoviruses as insecticides: Four examples. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019c. p. 163–168.

ROHRMANN, G. Baculovirus expression technology: Theory and application. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019d. p. 169–183.

ROHRMANN, G. Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019e. p. 21–56.

ROHRMANN, G. Baculoviruses, retroviruses, DNA transposons (piggyBac), and insect cells. In: ROHRMANN, G. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EUA), 2019f. p. 185–200.

ROHRMANN, G. F. Early events in infection: Virus transcription. In: ROHRMANN, G. F. (Ed.). . **Baculovirus Molecular Biology**. 4. ed. Bethesda (MD): National Center for

Biotechnology Information (EUA), 2019g. p. 83–95.

ROHRMANN, G. F.; KARPLUS, P. A. Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. **BMC Evolutionary Biology**, v. 1, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–18, 2012.

WANG, M. et al. The F-Like Protein Ac23 Enhances the Infectivity of the Budded Virus of gp64-Null *Autographa californica* Multinucleocapsid Nucleopolyhedrovirus Pseudotyped with Baculovirus Envelope Fusion Protein F. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9800–9804, 2008.

WANG, M. et al. Partial Functional Rescue of *Helicoverpa armigera* Single Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus Infectivity by Replacement of F Protein with GP64 from *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11505–11514, 2010.

WANG, M. et al. Unraveling the Entry Mechanism of Baculoviruses and Its Evolutionary Implications. **Journal of Virology**, v. 88, n. 4, p. 2301–2311, 2014.

WASHBURN, J. O. et al. Multiple Nucleocapsid Packaging of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Accelerates the Onset of Systemic Infection in *Trichoplusia ni*. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 411–416, 1999.

WESTENBERG, M. et al. Furin Is Involved in Baculovirus Envelope Fusion Protein Activation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 1, p. 178–184, 2002.

WESTENBERG, M.; VLAK, J. M. GP64 of group I nucleopolyhedroviruses cannot readily rescue infectivity of group II f-null nucleopolyhedroviruses. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2, p. 424–431, 2008.

YIN, F. et al. A Functional F Analogue of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus GP64 from the *Agrotis segetum* Granulovirus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8922–8926, 2008.

YIN, F. et al. Betabaculovirus F proteins showed different efficiencies when rescuing the infectivity of gp64-null *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 436, n. 1, p. 59–66, 2013.

YU, I. L. et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewer nucleocapsids. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 6, p. 1499–1504, 2009.

ZANOTTO, P. M. DE A.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic Interrelationships among Baculoviruses: Evolutionary Rates and Host Associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 2, p. 147–164, 1993.