



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**O Genoma de um Baculovírus Isolado de Cadáveres de
Larvas de *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae), uma
Lagarta de Interesse Médico**

CLARA WANDENKOLCK SILVA ARAGÃO

BRASÍLIA

2015

**O Genoma de um Baculovírus Isolado de Cadáveres de Larvas de
Lonomia obliqua (Lepidoptera: Saturniidae), uma Lagarta de
Interesse Médico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais
Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas
Melo

CLARA WANDENKOLCK SILVA ARAGÃO

BRASÍLIA

2015

**O Genoma de um Baculovirus Isolado de Cadáveres de Larvas de
Lonomia obliqua (Lepidoptera: Saturniidae), uma Lagarta de
Interesse Médico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Presidente)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Membro efetivo)

Dr^a. Simone Ribeiro (Membro efetivo)

Dr^a. Érica Soares Martins Queiroz (Membro suplente)

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, quem me teceu a vida para estar aqui e poder contemplar todos os fascínios da natureza os quais tento entender por meio do estudo da biologia. Obrigada meu Deus por ser meu porto seguro e força nessa caminhada, obrigada Mãe de Deus e minha Mãe por me carregar nos braços com sua ternura!

Agradeço ao Professor Bergmann, quem tanto admiro como pessoa e profissional, por confiar em mim e me conceder essa grande oportunidade de crescimento intelectual e consequentemente pessoal. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela sabedoria, pela amizade!

Agradeço ao meu co-orientador Fernando, que com toda sua presteza, interesse e disposição em ensinar, me passou conhecimentos essenciais para a conclusão desse trabalho, sendo sempre compreensivo, aberto e amigo! Obrigada de coração boss!

Agradeço aos meus pais, meus progenitores, que nesse ninho de amor me criaram e me ensinaram os valores mais dignos e fundamentais que me estruturam como ser. Obrigada minha amada mãezinha Rosana e meu amado paizinho Hamilton, pelas orações, pelo amor incondicional, pela confiança, pela amizade, pelo colinho, pela cumplicidade, pela prontidão em sempre ajudar, pelo companheirismo, pelo amparo em todos os momentos, e principalmente, por serem os melhores pais do mundo! Meu amor por vocês é imenso! Dedico a conclusão dessa etapa à vocês!

Ao meu amado filhotinho Samuel, fruto que em mim brotou, que me transforma a cada dia, que me ensinou que ser mãe é amar da forma sublime, e que é essa a força que me alavanca ao alcance de coisas que jamais imaginei poderia. Para mim filho, você é a expressão mais pura do amor de Deus em mim vida! Me desculpe os momentos de ausência para a dedicação à pesquisa, mas esse amor materno é mágico, e faz com que eu esteja com você todos os momentos! Amo você da forma mais pura que existe em mim!

Ao meu esposo, Filipe, que com toda sua paciência e compreensão, me deu forças para persistir em mais essa etapa da vida, sempre estando ao meu lado, cuidando de mim com carinho, me tolerando, me incentivando, acreditando nos meus potenciais, quando nem eu mesma acreditava mais...Obrigada por ser esse esposo/pai companheiro!

Agradeço aos meus irmãos, Thiago, my big bro, e Lucas, my little bro, que por diversos momentos dessa vida me acompanharam, sempre me dando força, acreditando em mim, e compartilhando desse amor fraterno que existe entre nós! Cada um de vocês me inspira com sua bondade de coração e espírito, e me faz uma irmã muito feliz e apaixonada por vocês meus irmãos amados! Luv you both!

Agradeço a minha amada vizinha Raimundinha, por me ensinar com doçura, paciência e doação, valores que comigo carrego com muito carinho. Não existem limitações quanto a esse amor é eternamente selado entre nós vizinha. Amo você bem gigante!

Agradeço a minha vizinha Claudete, e meu saudoso vovô Pirica (eternamente no coração), que sempre me cercaram de muito amor, e acima de tudo, acreditaram em mim, com muito orgulho e estima! Tê-los em minha vida é um presente de Deus!

Agradeço a minha linda sobrinha Cinthia, que com sua alegria de criança colore meu mundo, e me faz perceber que a vida está em ser feliz com as coisas mais simples...amo você minha melhor amiga! Conte sempre com sua Tia Cá!

Agradeço a minha titia Maria Fabião queria, que sempre acredita em mim, e mesmo com seu jeitinho danado, está sempre a brincar e sorrir! Amo você minha titia!

Ao meu padrinho amado, Assis Aragão, pelo incentivo, pela fé e por ser um exemplo de vida para mim! Amo você!

Aos meus sogros e a minha cunhada, pela ajuda e incentivo na conclusão dessa etapa! Vocês são muito queridos!

À Lucinha, minha amiga que me acompanha e cuida desde pequenininha, transmitindo esse amor puro em forma de quitutes maravilhosos e abraços apertados nos momentos que mais precisei! Lucinha, você é uma pessoa de luz, que ensina tanto na simplicidade. Amo você!

Agradeço às minhas amigas de infância de sempre, minhas companheiras, amigas incondicionais, confidentes, sempre me colocando para cima, sempre torcendo pelo meu sucesso e felicidade, e sempre dispostas a me dar um ombro amigo e carinhoso a qualquer momento! Naira, Mila, Aninha, Ju, Duda, Su, Lu, Larinha, Lelê, Gabi, Drica, Tatá, Dani e Re, my dolls, my friends for ever, amo cada umazinha de vocês!

Às minhas “bioamigas” irmãs com quem escolhi grudar meu coração, Liginha, Rafa, Nina e Marthinha, que com um carinho especial nessa fase, me apoiaram, me aconselharam, acreditaram em todo meu potencial e me transmitiram toda essa energia positiva que muito colaborou para que eu pudesse concluir mais essa etapa! Estamos juntas na vida, pro que der e vier!

Aos amigos do Ibama que me incentivaram e ajudaram muito nessa missão concomitante: Marília, Fê, Carla, Mônica, Lorena, por sempre acreditarem em mim, e em especial ao Danilo, por todas as conversas e histórias divertidas, pelo apoio de todas as horas, pelo carinho, pelas revisões, opiniões críticas e por toda motivação! Você é muito especial!

Aos meus amigos Daniel (Dzinho and co-co) e Fabrício (Big bro), que se não fosse pelo seu incentivo, amizade e fé em mim e em meus potenciais científicos, eu não estaria conquistando esse título! Em especial também à toda co-co-orientação do Dzinho em relação a conclusão desse trabalho, por me nortear, me colocar o pé no chão, critica e aguçar meu senso crítico aconselhar e simplesmente discutir ciência!

Agradeço a todo apoio e incentivo dos amigos do laboratório, Leo, Isabella, Deborah, Roberto, Mayarinha, Mariana, Claudinha, Mateus, Thiago, em especial ao Miguel, por tanto me ajudar nas figuras lindas desse trabalho, e ao Jhon, por me ajudar com o teste de hipóteses.

Aos meus amigos de sempre, Bele, Bu, Lili, Cindão, Carol, Yandra e Pat que sei que muito torcem pelo meu sucesso e estão no meu coração, independente da distância!

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Biologia Molecular, por propiciarem as bases do desenvolvimento acadêmico.

Ao Cnpq, CAPES e FAPDF, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Lonomia obliqua (Lepidoptera: Saturniidae) é uma lagarta venenosa de importância médica devido a severidade de acidentes causados no Brasil pelo contato dessas lagartas com humanos. Patógenos naturais foram isolados dessa lagarta, como o baculovírus *Lonomia oblique multiple nucleopolyhedrovirus* – LoobMNPV. Nesse contexto, esse trabalho envolve o sequenciamento, a montagem, a análise da composição genômica e do contexto evolutivo de LoobMNPV. Esse genoma possui 120,023 pb, 134 ORFs, 12 ORFs únicas, 7 regiões homólogas (*hrs*) e conteúdo G+C de 35,7%. Baseado em análises que incluem os genes conservados de baculovírus (*core genes*) de 72 espécies únicas de baculovírus sequenciados, LoobMNPV localiza-se filogeneticamente no grupo I de *Alphabaculovirus*, pertencente a um clado irmão aos genomas similares a AcMNPV, apresentado também inversões e rearranjos genômicos em relação a esse clado. Uma das ORFs únicas (LoobNPVOrf-35) apresentou similaridade (*E-value* de $3e10^{-11}$) significativa a um Fator de Terminação de Transcrição (*Transcription terminator factor* -TTF2) oriundo do lepidóptero *Danaus plexippus* (GenBank: EHJ68439.1). Por outro lado, ao restringir essa busca aos baculovírus, essa ORF também apresentou similaridade (*E-value* de $1e10^{-6}$) ao *Global Transactivator* (GTA) de *Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus* (Genbank: YP_611073.1). Esses resultados indicam duas hipóteses para a possível origem dessa ORF em LoobMNPV: esse gene pode ter sido adquirido independentemente por transferência horizontal de genes, ou é uma variação divergente do gene GTA. Esse genoma também apresentou a ausência dos genes da *cathepsina* e *quitinase*, que por sua vez estão envolvidos na liquefação do hospedeiro ao final da infecção, propiciando a dispersão dos corpos de oclusão do baculovírus no ambiente. Essa ausência pode estar relacionada ao hábito gregário observado em *Lonomia obliqua*.

Palavras-chave: *Lonomia obliqua*, LoobMNPV, baculovírus, *Transcription terminator factor* -TTF2, *Global Transactivator* -GTA, *cathepsina*, *quitinase*.

ABSTRACT

Lonomia obliqua (Lepidoptera: Saturniidae) is a poisonous larvae of medical importance due to the severity of accidents caused by the contact of these larvae with humans occurred in Brazil. Natural pathogens were isolated from these larvae, such as the baculovirus *Lonomia oblique multiple nucleopolyhedrovirus* – LoobMNPV. In this work, we have sequenced the genome of the baculovirus LoobMNPV and analyzed its genomic composition and evolutionary history. The genome is 120.023 bp long, comprising 135 putative ORFs, 12 unique ORFs, 7 homologous regions (*hrs*), and 35, 7% G+C content. Furthermore, in an evolutionary context, based on analysis that include the *core genes* from 72 unique species of sequenced baculovirus, LoobMNPV is located among *Alphabaculovirus* group I, as a sister-clade of the AcMNPV-like genomes, also presenting genomic inversions and rearrangements when compared to this clade. Interestingly, one unique ORF (LoobNPVOrf-35) showed significant similarity (*E-value* equals to $3e10^{-11}$) to a eukaryotic Transcription Terminator Factor (TTF2) from the lepidoptera *Danaus plexippus* (GenBank: EHJ68439.1). On the other hand, when restricting this search only to baculoviruses, this ORF also demonstrated similarity (*E-value* of $1e10^{-6}$) to the Global Transactivator (GTA) gene from *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus (Genbank: YP_611073.1). These results indicated two hypothesis: this gene may have been independently acquired from the host through horizontal transfer, or it is a divergent variation of the GTA. This genome also lacks the *cathepsin* and *chitinase* genes that are involved in the host liquefaction at the end of the infection, benefiting the spread of the baculovirus occlusion bodies in the environment. This absence may be due to the gregarious habits observed in *Lonomia obliqua*,

Key words: *Lonomia obliqua*, LoobMNPV, baculovirus, Transcription terminator factor -TTF2, Global Transactivator -GTA, *cathepsin*, *chitinase*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de <i>Lonomia obliqua</i>	3
Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de <i>Lonomia obliqua</i>	4
Figura 3. Hábito gregário de <i>Lonomia obliqua</i>	5
Figura 4. Ultra micrografias das cerdas de <i>Lonomia obliqua</i>	7
Figura 5. Aspecto das lesões hemorrágicas causadas por <i>Lonomia obliqua</i>	8
Figura 6. Ultra micrografias de LoobMNPV.....	10
Figura 7. Ultramicrografias de NPVs.....	11
Figura 8. Ultra Micrografia de GV.....	12
Figura 9. Diagrama esquemático da estrutura dos corpos de oclusão.....	13
Figura 10. Ciclo de infecção de baculovírus.....	18
Figura 11. Mapa genômico de LoobMNPV.....	33
Figura 12. Região de baixa cobertura de LoobMNPV.....	34
Figura 13. Gel de agarose das hrs de LoobMNPV.....	36
Figura 14. Alinhamento múltiplo de região repetitiva das hrs de LoobMNPV.....	37
Figura 15. Árvore filogenética da família <i>Baculoviridae</i>	39
Figura 16. Mapa comparativo do genoma de LoobMNPV a outros <i>Alphabaculovirus</i>	42
Figura 17. Sintenia genômica de LoobMNPV em relação a outros <i>Alphabaculovirus</i>	44
Figura 18. Árvore filogenética de LoobNPVOrf-35 e os genes TTF2 e GTA.....	50
Figura 19. Alinhamento LoobNPVOrf-35 e os genes TTF2 e GTA.....	53
Figura 20. Contexto gênico do gene GTA em <i>Alphabaculovirus</i> grupo I.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos genes conservados (core genes) em baculovírus.....	15
Tabela 2. Iniciadores para amplificação da região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV.....	26
Tabela 3. Procedimento da reação de PCR da região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV.....	26
Tabela 4. Programa de amplificação da região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV.....	27
Tabela 5. Iniciadores utilizados na amplificação das <i>hrs</i>	27
Tabela 6. Procedimento da reação de PCR da região das <i>hrs</i> de LoobMNPV.....	28
Tabela 7. Programa utilizado na amplificação das <i>hrs</i> do genoma de LoobMNPV.....	28
Tabela 8. Tamanho das <i>hrs</i> e seus respectivos fragmentos de amplificação LoobMNPV.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl microlitros

µm micrometros

aa amino ácido

CPV do inglês *Cytoplasmatic Polyhedroses* (Poliedroses citoplasmáticas)

GTA do inglês *Global Transactivator* (Transativador Global)

GV Granulovírus

HGT do inglês *Horizontal Gene Transfer* (Transferência Horizontal de Genes)

kb kilo bases

M molar (mol/L)

ML do inglês *Maximum likelihood* (Máxima Verossimilhança)

MNPV do inglês *multiplenucleopolyhedrovirus* (Nucleopoliedrovirus múltiplo)

nm nanômetros

NPV do inglês *nucleopolyhedrovirus* (Nucleopoliedrovírus)

OB do inglês *Occlusion bodies* (Corpos de Oclusão)

ODV do inglês *Occlusion Derived Virions* (Vírions Derivados de Oclusão)

ORF do inglês *Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta)

pb pares de base

PCR do inglês *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

SNPV do inglês *singlenucleopolyhedrovirus* (Nucleopoliedrovirus único)

TTF2 do inglês *Transcription Terminator Factor 2* (Fator de Terminação de Transcrição)

w/v do inglês *weight/volume* (peso/volume)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
SUMÁRIO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Insetos da ordem Lepidoptera	1
1.2 Lepidópteros de importância médica	2
1.3. <i>Lonomia obliqua</i>	2
1.3.1 Epidemiologia e acidentes causados por <i>L. obliqua</i>	5
1.3.2 Veneno de <i>L. obliqua</i>	6
1.3.3 Inimigos naturais de <i>L. obliqua</i>	9
1.4. Baculovírus	10
1.4.1. Classificação morfológica	11
1.4.2. Filogenia dos baculovírus	14
1.4.3. Genômica dos baculovírus	15
1.4.4. Regulação da expressão gênica	17
1.4.4. Infecção e modo de ação	18
1.4.6 Importância dos baculovírus	20
1.5. Justificativa.....	21
1.6. Objetivos	22
1.6.1. Objetivo geral.....	22
1.6.2. Objetivos específicos	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Desenho esquemático da metodologia	23
2.2. Amostra viral.....	24
2.3. Isolamento do DNA viral.....	24
2.4. Sequenciamento do genoma de LoobMNPV	25
2.5. Anotação e montagem do genoma de LoobMNPV.....	25
2.6. Confirmação das regiões de baixa cobertura.....	26
2.7. Análise e confirmação das regiões homólogas (<i>hrs</i>)	27

2.8. Análise filogenética	29
2.8.1. Análise filogenética de LoobMNPV em relação à família <i>Baculoviridae</i>	29
2.8.2. Análise filogenética de ORF de LoobMNPV	29
2.9. Comparação de LoobMNPV a outros baculovírus	30
2.10. Análise da estrutura secundária de alinhamento	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Análise da sequência genômica de LoobMNPV	31
3.1.1. Análise de região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV	34
3.2. Análise das regiões homólogas (<i>hrs</i>)	35
3.3 Análises do contexto filogenético de LoobMNPV na família <i>Baculoviridae</i>	38
3.4. Comparações de LoobMNPV a outros <i>Alphabaculovirus</i>	40
3.5 . Análise das ORFs únicas encontradas em LoobMNPV	46
3.5.1. ORF única que contém peptídeos sinal e região transmembrana	47
3.5.2. ORF única relacionada ao sistema imune.....	47
3.5.3. ORF única relacionada a fator de terminação de transcrição	48
3.6. Peculiaridades do Genoma LoobMNPV	57
3.6.1. Ausência dos genes da <i>cathepsina</i> e <i>quitinase</i> no genoma de LoobMNPV	57
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6. ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos da ordem Lepidoptera

Os insetos compreendem cerca de 59% de todos os animais do planeta e desempenham papel chave nos ecossistemas terrestres (Wilson, 2003), como a participação em processos de decomposição, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, polinização, dispersão de sementes (Freitas et al. 2003), bem como regulação de populações de plantas e de outros animais por interações ecológicas (Didham et al. 1996).

Em relação aos insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, estima-se que esta possua cerca de 146 mil espécies descritas com previsão de 255.000 espécies a serem descobertas (Heppner 1991). Esses insetos possuem asas recobertas com escamas na fase adulta (do grego *lepidó* = escamas; *ptera* = asa) e corpo vermiforme na fase larval, podendo algumas espécies apresentarem cerdas ou pelos (Pesce & Delgado 1971). As lagartas de lepidópteros são caracterizadas por um corpo cilíndrico dividido em cabeça, composta pelo aparelho bucal mastigador, os stemmata (estruturas para visão) e as antenas; o tórax, composto por três pares de pernas verdadeiras; e o abdômen, com 10 segmentos e quatro pares de pernas falsas que auxiliam na fixação e locomoção (Moraes 2003). Possuem ainda sistema digestivo completo, sistema nervoso ventral e coração dorsal, com circulação realizada por bombeamento da hemolinfa e respiração traqueal, com aberturas laterais denominadas espiráculos (Moraes 2003).

Essa ordem compreende indivíduos com desenvolvimento holometabólico, que consiste em um ciclo biológico caracterizado pelas fases de ovo, larva (lagarta), pupa (crisálida) e adulto (imago) (Moraes 2003). São divididos em dois grupos: Rhopalocera, representada por borboletas com hábitos diurnos, e Heterócera, representada por mariposas com hábitos noturnos (Cardoso 2005).

Os lepidópteros são principalmente conhecidos devido aos elevados prejuízos causados em culturas agrícolas de importância econômica, como o algodão e a soja (Cruz 2002). Entretanto, algumas espécies também são consideradas relevantes, como o caso do bicho da seda (*Bombyx mori*) na sericultura, bem como aquelas responsáveis pela ocorrência de acidentes dermatológicos, como as pertencentes às famílias Megalopygidae, Limacodidae e Saturniidae (Haddad et al 2003).

1.2 Lepidópteros de importância médica

Os lepidópteros considerados relevantes na área médica são aqueles que podem causar danos à saúde humana. Quando decorrentes do contato com as formas adultas aladas de mariposas, esses acidentes são denominados lepidopterismo, caracterizado por dermatoses intensas, com aspecto papuloso e pruriginoso. Os principais causadores desses acidentes são mariposas de espécies pertencentes à família Hemileucidae, que possuem cerdas urticantes no abdômen das fêmeas e provocam surtos em áreas rurais (Jorg 1933).

Por outro lado, o erucismo (de origem latina *eruca* = larva) é o termo utilizado para designar intoxicações decorrentes do contato com a fase larval dos lepidópteros. O perfil clínico resultante desses acidentes pode variar desde uma simples queimação no local do contato até um quadro de hemorragia intensa, dependendo da espécie envolvida e do estado físico da vítima (Pesce & Delgado 1971).

Sob o ponto de vista histórico, no Brasil, os primeiros relatos sobre acidentes envolvendo lagartas datam desde a época da colonização, na “Carta de São Vicente” de 1560, a qual o padre Anchieta relatou o medo dos índios frente a algumas lagartas que causavam reações de dor após o contato físico, sendo denominadas “tatá-raná” em Tupi-Guarani, que significa “como fogo”, mais tarde originando na língua portuguesa a palavra “taturana” (Costa, 1994). Já no final da década de 60, surgiram as primeiras publicações relatando casos de envenenamento por contato com lagartas do gênero *Lonomia* na América do Sul, mais especificamente com a espécie *Lonomia achelous* na Venezuela (Arocha-Piñango 1967), e no Brasil os primeiros relatos datam do final da década de 80, envolvendo a espécie *Lonomia obliqua* no sul do país, em que as vítimas apresentavam, após contato com o animal, irritações cutâneas, dermatites, queimaduras, alergias, distúrbios na coagulação sanguínea causando hemorragias generalizadas, insuficiência renal aguda, e, nos casos mais graves a morte (Duarte et al. 1990).

1.3. *Lonomia obliqua*

Lonomia obliqua, Walker, 1855, a lagarta hospedeira do vírus objeto de estudo desse trabalho, é classificada como pertencente à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Bombycoidea e família Saturniidae (Stehr 1987). Essas lagartas são

caracterizadas pela coloração verde claro em sua base e preto no ápice, contendo seis segmentos com uma mancha branca em cada, cabeça saliente de coloração marrom-clara com um septo marrom-escuro na parte superior, peças bucais bastante salientes (Duarte et al. 1990), e ornamentação dorsolateral de estruturas pontiagudas ramificadas de aspecto arbóreo (Figura 1). Essas estruturas, denominadas cerdas, são capazes de secretar toxinas que possuem como função biológica a defesa contra predadores naturais (Cardoso 2005). Suas propriedades urticantes são oriundas de um líquido produzido por células tricógenas, presente no interior de suas cerdas, que ao penetrar a pele são quebradas e liberam o líquido que exerce sua ação irritante (Alexander, 1984).



Figura 1. Lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) (Fonte: *Lonomia obliqua*. . In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lonomia-obliqua-citsc-1.jpg>>. Acesso em: 28 fev. 2015.)

Conforme Lorini (1999), *L. obliqua* possui um ciclo biológico de cerca de 185 dias, sendo que os insetos adultos (mariposas) vivem apenas uma média de 6,8 dias, uma vez que possuem peças bucais atrofiadas e não se alimentam. Ainda, apresentam acentuado dimorfismo sexual, e devido ao hábito noturno, sua cópula ocorre à noite, com acasalamentos que chegam a durar mais de 10 horas. Posteriormente, ovopositam sobre troncos de árvores, e mantêm-se no estágio de ovo por um período que pode variar de 17 a 30 dias (Lorini 2005). Ao eclodir, as larvas passam por seis estágios de desenvolvimento (instares), com alteração

de tegumento (muda) a cada instar, podendo atingir cerca de sete centímetros de comprimento ao final desse estágio. Posteriormente, durante o estágio de pupa, permanece em dormência sob restos vegetais por 30 a 100 dias, até emergirem as mariposas, reiniciando o ciclo (Lorini 1999) (Figura 2).

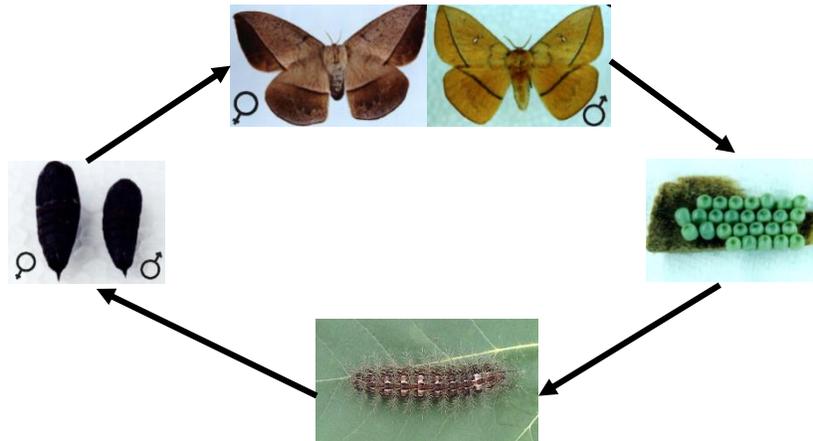


Figura 2. Ciclo de desenvolvimento holometábolo de *Lonomia obliqua*. Adaptado de (CIT 1999).

Lonomia obliqua possui hábito gregário durante cinco instares do desenvolvimento larval (Figura 3), vivendo em colônias com mais de 50 indivíduos sobre o tronco de diversas árvores de cujas folhas se alimentam, com suas cabeças apontando para fora em relação ao grupo, e, caso venham a ser perturbadas, tornam-se ativas e movimentam-se em linha (Lorini et al. 2007). Durante o período noturno, sobem os galhos mais altos em busca de alimento, e durante o dia permanecem agrupadas e camufladas nas partes mais inferiores e sombreadas dos troncos das árvores, fato esse que facilita a ocorrência dos acidentes com humanos (Lorini 1999).

O hábito gregário, bem como o mimetismo observado nesses insetos, é considerado uma forma adicional às defesas morfológicas (espículas) e químicas (toxinas) apresentadas por estes organismos, uma vez que animais de hábito gregário estão menos sujeitos a serem predados, e o mimetismo permite que a espécie explore ambientes de risco ou de grande exposição, como por exemplo, a superfície de troncos e folhas (Vulinec, 1990).

As árvores de maior preferência do gênero *Lonomia* são o Araticum (*Rollinia emarginata*), o Cedro (*Cedrella fissilis*) e o Ipê (*Tebula pulcherrima*). Entretanto, essa espécie parece adaptada também às árvores frutíferas, como os pessegueiros, abacateiros, ameixeiras e outros (Moraes 2003).



Figura 3. Hábito gregário da lagarta *Lonomia obliqua*. (Fonte: Lonomia Obliqua. In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a Enciclopédia Livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível Em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lonomia-Obliqua-Citsc-2.jpg?uselang=pt-Br>>. Acesso Em: 28 Fev. 2015).

1.3.1 Epidemiologia e acidentes causados por *L. obliqua*

As populações de *L. obliqua* são exclusivamente encontradas no continente americano (Lemaire, 1972), e no Brasil, são principalmente encontradas nas regiões Sul e Sudeste (Duarte et al. 1990). Estudos iniciais indicavam que a distribuição geográfica do inseto parecia estar restrita à áreas rurais e regiões de maior quantidade de fragmentos florestais, no entanto, a espécie aumentou sua área de ocorrência, sendo também encontrada em núcleos urbanos, com ocorrência mais expressiva nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Lorini 1999).

A maior incidência dessas lagartas, segundo Abella *et al.* (1999) pode estar relacionado à fatores como a alteração e redução de seu habitat natural causado pelo desmatamento, uso extensivo e intensivo de agrotóxicos, alteração das condições climáticas, levando a decorrente diminuição do número de seus inimigos naturais, bem como adaptações das larvas à plantas exóticas ou introduzidas (Lorini 1999). Todos esses fatores favorecem a

aproximação das lagartas com os seres humanos, aumentando conseqüentemente o número de casos de acidentes.

Dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT) (Moraes 2002), indicaram o aumento do número de casos de acidentes causados por lagartas venenosas, como é o caso da série coletada entre 1998 e 2002, com mais de 688 casos de envenenamentos. Desde então, diversos estudos vem sendo realizados com o intuito de avaliar o número acumulado de acidentes hemorrágicos causados por essa espécie no Sul e Sudeste do Brasil (Abella et al. 2006).

Nesse sentido, tem-se que no estado de Santa Catarina, por exemplo, durante o período 1990 a 2007, foram registrados aproximadamente 2.200 acidentes, sendo que 40 pacientes (1,8%) desenvolveram insuficiência renal aguda e a gravidade do envenenamento determinou risco de vida. Proporcionalmente, no Rio Grande do Sul, 1.839 casos de acidente foram registrados no Centro de Informações Toxicológicas no período de 1989 a 2005, com ocorrência de 13 óbitos, e no Estado do Paraná, entre os 199 casos de acidentes que ocorreram no período de 1977 e 1999, e houve cinco óbitos (2,5%) (CIT 2008)(Rubio, 2001).

1.3.2 Veneno de *L. obliqua*

Dermatite de contato e urticária são reações cutâneas comuns em acidentes com larvas venenosas, e as conseqüências dessas reações estão geralmente limitadas ao local de ocorrência (Hossler 2010). No entanto, o contato com *L. obliqua* está associado a uma série de outros sintomas severos que podem acarretar na morte (Pinto et al. 2010).

O veneno de *L. obliqua* é produzido por células epiteliais secretoras, encontradas nos canais de cada espicula, conforme apresenta a ultra micrografia da figura 4. Ao tocar a pele, a cerda se fragmenta e libera o conteúdo de veneno (Veiga et al. 2001).

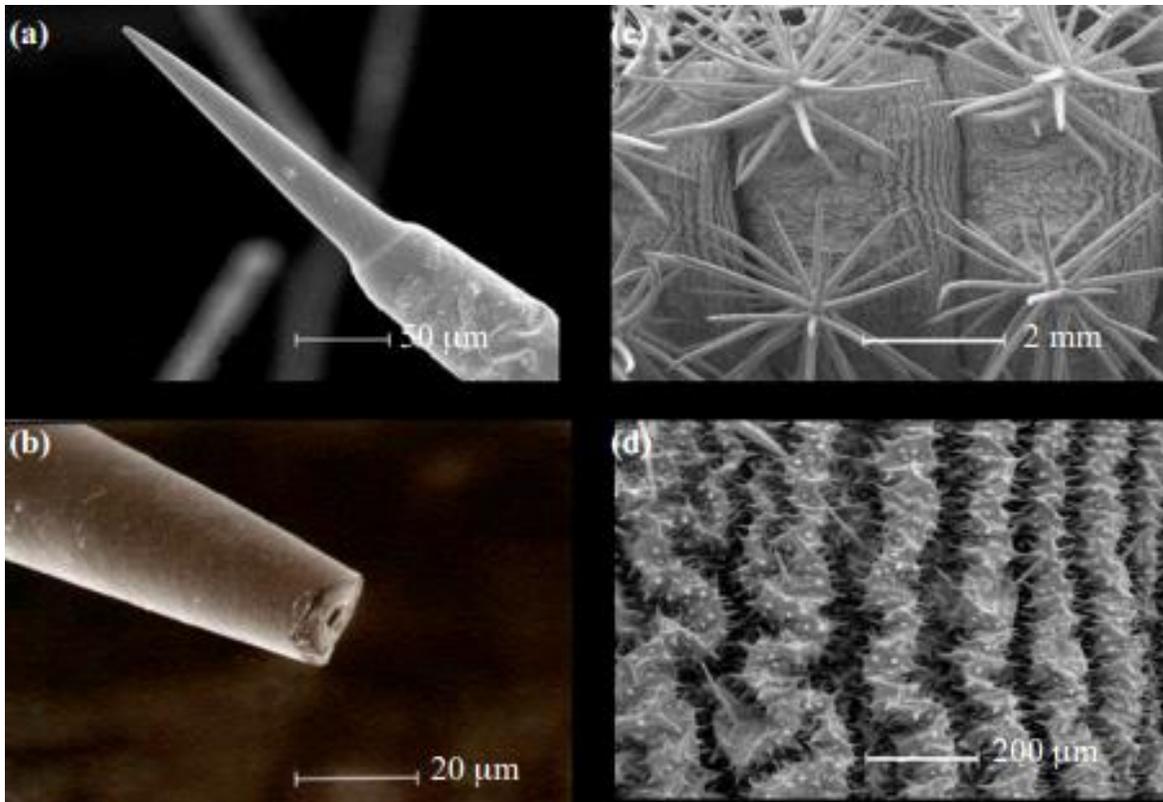


Figura 4. Ultra micrografia de varredura apresentando ultra estrutura das cerdas de *L. obliqua*. (a) espícula íntegra; (b) espícula quebrada na articulação, com canal interno exposto; (c) estrutura completa das espículas; (d) visão aproximada do tegumento que fixa as espículas. Adaptado de (Veiga et al. 2001) (Reprodução autorizada pela editora).

O efeito do veneno provoca distúrbios nos fatores de coagulação nas primeiras seis horas de contato, provocando desde hematomas na pele e nas mucosas, até síndromes hemorrágicas intensas, como hemorragia nas mucosas gengival e nasal, abdominais, pulmonares e em casos mais severos hemorragia cerebral, choque, insuficiência renal aguda, e risco de morte (Zannin et al. 2003; Gamborgi et al. 2006).

Os sintomas iniciais são reações de inflamação como dermatite urticante logo após o contato, seguida de reações sistêmicas como cefaleia, febre, náuseas, dores musculares e hipertensão. Sinais de sangramento como os hematomas, equimoses, hematúria e melenas são frequentemente observados entre 6 e 72 horas após o contato (Kowacs et al. 2006), conforme figura 5.



Figura 5. Aspecto das lesões hemorrágicas após o contato com *L. obliqua*. (a) Hematoma; (b) e (c) Equimoses e (d) hemorragia da mucosa gengival. Adaptado de (CIT 1999).

O veneno de *L. obliqua* provoca distúrbios na coagulação sanguínea, conforme foi verificado em dados laboratoriais de pacientes afetados, que mostram diminuição dos níveis plasmáticos dos fatores de coagulação fibrinogênio, FV, fator VIII (FVIII), FXII (Zannin et al. 2003). Foi mostrado também que o veneno dessa lagarta causa hemólise intravascular em ratos, com a redução do número de eritrócitos e o aumento de hemoglobina no plasma, levando a um quadro de hemoglobinúria (Seiber et al. 2006).

Portanto, o veneno possui uma alta atividade proteolítica, pro-coagulante e fibrinogenolítica (Veiga et al. 2003), uma vez que é composto por enzimas (ativadores de fator X, prototrombinas e fibrinogenases) que participam dessas atividades, conforme relatado em estudos de isolamento e caracterização dessas enzimas obtidas a partir do veneno de lagartas *L. obliqua* (Alvarez-Flores et al. 2006; Donato et al. 1998; Pinto et al. 2004). A prototrombina e o fator X geram trombina intravascular, que leva a ativação do sistema de coagulação consequentemente o consumo do fibrinogênio e de outros fatores de coagulação. Desse modo, as diversas toxinas presentes no veneno dessas lagartas atuam sinergicamente no indivíduo afetado, de modo a produzir síndromes hemorrágicas pós-contato com quadro sistêmico secundário, e desse modo, deve ser tratada do mesmo modo que acidentes ofídicos (Kelen et al. 1995).

Diante desse fato e de tantos casos relatados, e devido à falta de um medicamento específico para o tratamento da síndrome hemorrágica, o soro antilonômico (SALon) foi

produzido pelo Instituto Butantã – SP, a partir das cerdas de *L. obliqua* de último instar, imunizadas em cavalos, de onde é obtido uma alta concentração de imunoglobulinas purificadas (Dias da Silva et al. 1996). Sua eficácia é atualmente comprovada, capaz de reestabelecer os parâmetros fisiológicos de coagulação em pacientes envenenados e em experimentos modelo (Caovilla & Barros 2004), e faz parte do cronograma do Programa Nacional de Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde, podendo ser aplicado conforme a gravidade do envenenamento por via intravenosa (Brasil 2005).

1.3.3 Inimigos naturais de *L. obliqua*

Diante do aumento da dispersão e da abundância das populações de *L. obliqua*, e visando ações de controle dessa espécie para prevenir acidentes com a população, faz-se necessário estudar e analisar seus agentes naturais de controle biológico. Nesse sentido, Mores (2002) identificou que dentre os principais inimigos naturais da lagarta *L. obliqua* estão as larvas de moscas (Diptera: Tachinidae) e vespas (Hymenoptera: Ichneumonidae) que perfuram o tegumento das lagartas e se alimentam de estruturas internas, impedindo o prosseguimento do ciclo biológico da lagarta na passagem para pupa. Foram identificados também como seus predadores o hemíptero *Alcaeorrhynchus grandis* (Hemiptera: Pentatomidae), bem como o nematoide isolado de seu tubo digestivo, o *Hexameris sp.* (Nematoda: Mermithidae).

Dentre esses patógenos naturais de *L. obliqua*, um deles é o objeto de estudo desse trabalho, o vírus *Lonomia obliqua multiple nucleopolyhedrovirus* (LoobMNPV) pertencente à família *Baculoviridae* (Figura 6) (Wolff et al. 2002).

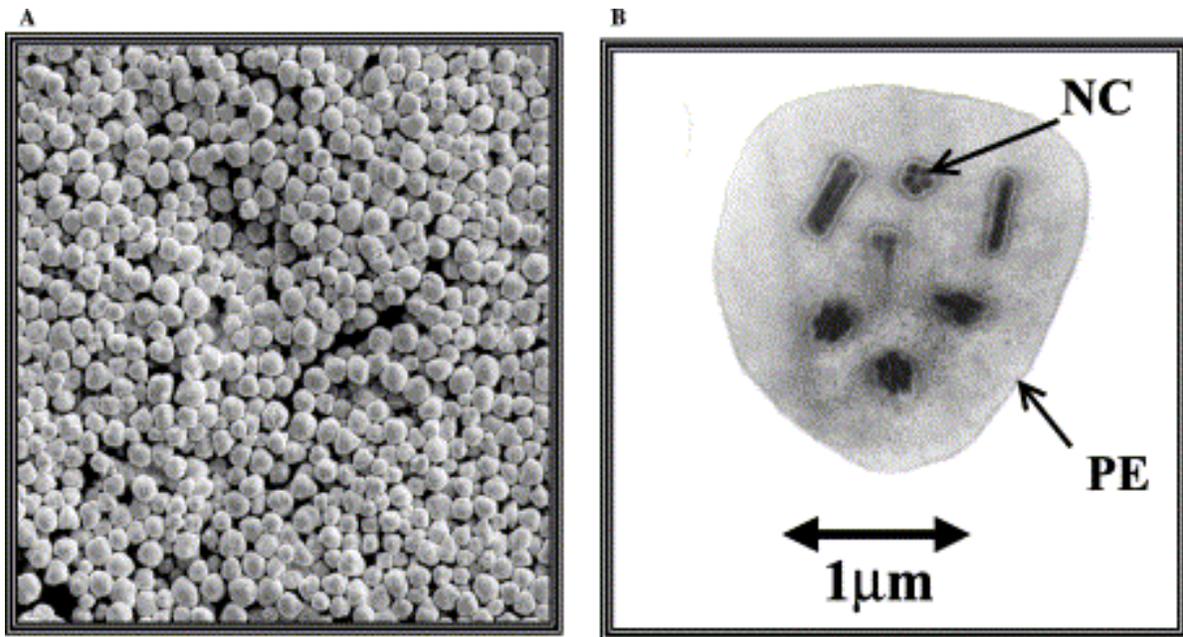


Figura 6. *Lonomia obliqua multiple nucleopolyhedrovirus* (LoobMNPV). (a) Ultra micrografia de varredura dos poliedros de LoobMNPV ; (b) Ultramicrografia de transmissão mostrando detalhe de um poliedro de LoobMNPV, contendo múltiplos nucleocapsídeos (NE) envolto pelo envelope do poliedro (PE) (Wolff et al., 2002) (Reprodução autorizada pela editora).

1.4. Baculovírus

Segundo Rohrmann 2013, sob o ponto de vista histórico, a descoberta dos baculovírus está primeiramente relacionada à sericultura, que ocorre há mais de 5.000 anos, onde as culturas de larvas da seda apresentavam patologias, que desde então, os chineses já dispunham de métodos para combatê-las. Com o aperfeiçoamento da microscopia de luz no século XIX, foi possível observar que corpos de oclusão de formato poliédrico, denominados de poliedroses, eram um dos causadores de sintomas nos insetos afetados. No entanto, apenas a partir da década de 40, com o avanço da microscopia eletrônica, foi possível observar que haviam vírions em formato de bastão contidos nesses corpos poliédricos (Bergold 1947 apud Rohrmann 2013).

Posteriormente, dois tipos distintos de poliedroses foram descritas, as poliedroses nucleares (do inglês- *nuclear polyhedroses* – NPVs – hoje denominados nucleopoliedrovirus) e as citoplasmáticas (do inglês *cytoplasmic polyhedroses* - CPVs) (Xeros 1952 apud Rohrmann 2013). Diferentemente dos nucleocapsídeos em forma de bastão dos NPVs, que

são vírus de DNA fita dupla, os CPVs possuem capsídeos icosaedros e genomas de RNA fita dupla, sendo classificados como da família *Reoviridae* (gênero *Cypovirus*) (Rohrmann 2013).

Na classificação atual, os NPVs são baculovírus que pertencem à família *Baculoviridae* (do latim *baculum* = bastão, devido ao formato dos nucleocapsídeos), uma grande família de patógenos inseto-específicos, quem infectam as ordens Diptera, Hymenoptera, e Lepidoptera (Rohrmann 2013). Possuem DNA fita dupla, circular e super-enovelado, com genomas que variam de 80 a 180 kb, e codificam aproximadamente 90 a 180 genes. Os genomas são empacotados em nucleocapsídeos que possuem aproximadamente 230–385 nm de comprimento, e 40–60 nm de diâmetro (Akermann, 1983; Federici, 1986).

1.4.1. Classificação morfológica

Na década de 20, uma outra categoria de baculovírus além dos NPVs foi caracterizada pela presença de corpos de oclusão de aspecto granular e com formato elipsoidal, denominados granulovirus (GVs) (Paillot 1926 apud Rohrmann 2013). Portanto, a primeira divisão da família *Baculoviridae* foi dada em dois grandes grupos, de acordo com a morfologia de seus corpos de oclusão: os nucleopoliedrovirus (NPVs) (Figura 7) e os granulovirus (GVs) (Figura 8) (Vago 1974 apud Rohrmann 2013).

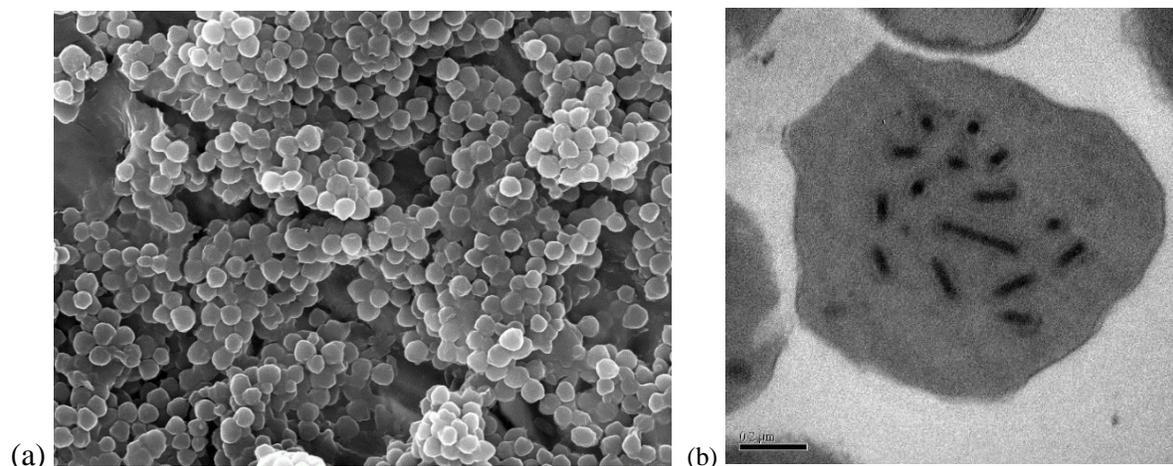


Figura 7. Ultra micrografias de corpos de oclusão de nucleopoliedrovírus (NPVs). (a) Microscopia eletrônica de varredura de corpos de oclusão (OBs); (b) Poliedro contendo nucleocapsídeos únicos (*single*). Fotos do Laboratório de Virologia da Universidade de Brasília.

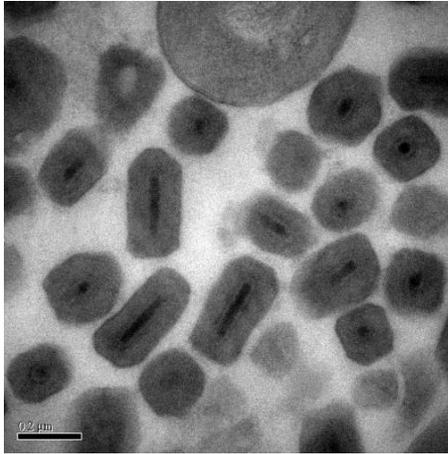


Figura 8. Ultra micrografia eletrônica de transmissão de Granulovírus (GV), mostrando grânulos contendo um vírion (*single*). Fotos do Laboratório de Virologia da Universidade de Brasília.

Além disso, os baculovírus são caracterizados por dois fenótipos de infecção, que possuem nucleocapsídeos com estruturas similares, porém divergentes quanto a origem e composição de seus envelopes, bem como no papel que desempenham no ciclo do vírus (Rohrman 2013) (Figura 9).

A primeira forma são os vírions derivados da oclusão, responsáveis pela infecção vertical via oral inseto-inseto (do inglês *occlusion-derived virions* - ODVs). Os ODVs são contidos em corpos de oclusão (do inglês *occlusion bodies* - OBs) (Figura. 9), constituídos por uma matriz proteica composta por granulina (se for GV) ou poliedrina (se for NPV) (Akermann, 1983). Os OBs são estruturas adaptadas para serem estáveis à diversas condições ambientais, inclusive às condições adversas do intestino médio de seus hospedeiros, permitindo que os vírions se mantenham estáveis e resilientes, como é o caso, por exemplo, de estudos que mostram sua tolerância ao passar pelo trato intestinal de pássaros, facilitando também sua dispersão (Entwistle et al. 1978). A segunda forma fenotípica são os vírions extracelulares ou virions brotados (do inglês *budded virions* - BVs) (Figura 9) que são responsáveis pelo espalhamento da infecção sistêmica horizontalmente, célula a célula do hospedeiro e não estão oclusos em uma matriz proteica (Keddie et al. 1989).

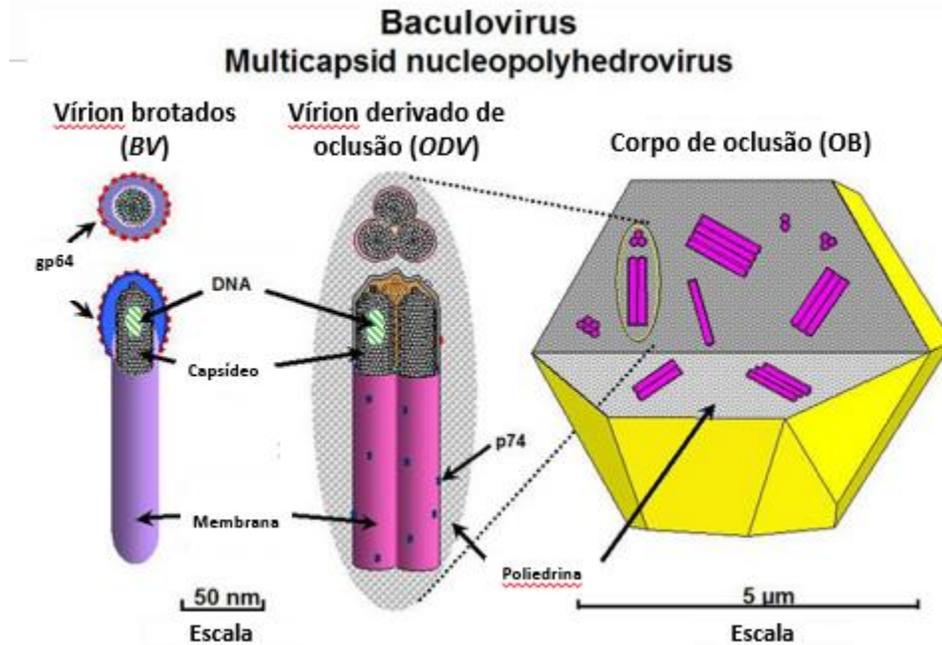


Figura 9. Diagrama esquemático da estrutura dos corpos de oclusão de baculovírus (OBs), dos vírions derivados de oclusão (ODV) e dos vírions intracelulares (BV). Os ODVs estão contidos um uma matriz cristalina composta de proteína (poliedrina, se for NPV, ou de granulina, se GV), formando o OB. No caso, a figura apresenta um OB de NPV. O envelope e nucleocapsídeos de ODV e BV contêm proteínas, dentre elas as destacadas na figura (GP64, e p74). Adaptado de (Fonte: Baculovirus In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a Enciclopédia Livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível Em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Baculovirus#mediaviewer/File:Nucleopolyhedrovirus_german.png>. Acesso Em: 28 Fev. 2015).

Uma característica peculiar dos baculovírus é a organização dos nucleocapsídeos dentro de seus envelopes, sendo únicos (do inglês *single*) ou múltiplos (do inglês *multiple*), ocluídos pela matriz cristalina (Akermann, 1983). Sugere-se que o fenótipo de múltiplos nucleopoliedrovírus (MNPV, do inglês *multiple nucleopolyhedrovirus*) acelera a habilidade do vírus em estabelecer uma infecção, uma vez que vários nucleocapsídeos podem simultaneamente infectar a mesma célula, e iniciar a replicação, enquanto outros nucleocapsídeos podem iniciar o espalhamento da infecção e estabelecer infecções secundárias. No entanto, a formação de MNPV pode ser influenciada pelo tipo de célula infectada, podendo esse fenótipo ser decorrente de uma influência fisiológica ou ambiental (Rohrman 2014). Ressalta-se que ambos fenótipos MNPV e SNPV foram encontrados em baculovírus que infectam lepidópteros, enquanto que os baculovírus infectam outras ordens

foram encontrados apenas SNPVs. Os GVs, também são categorizados como *single* e *multiple*, no entanto, GVs múltiplos são mais raros (Falcon, 1985).

1.4.2. Filogenia dos baculovírus

Uma das hipóteses para a origem dos baculovírus está relacionada à origem dos vírus de inseto de DNA fita dupla há, aproximadamente 310 milhões de anos atrás, no período Carbonífero da era Paleozóica (Thézé et al. 2011), juntamente com o surgimento dos primeiros insetos (Luque et al. 2001). À medida que os insetos proliferavam, diferentes linhagens de vírus associados progressivamente se especializaram e co-evoluíram de acordo com a ordem de seus hospedeiros, uma vez que estudos filogenéticos mostram convergência dos baculovirus com a ordem de seus insetos hospedeiros (Herniou et al. 2004).

Baseado nesses padrões de associação do vírus ao hospedeiro, num processo de evolução hospedeiro-dependente, a filogenia da família *Baculoviridae* baseada nos genes conservados de baculovírus (*core genes*) é dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, que são NPVs e infectam lepidópteras, *Betabaculovirus*, que são GVs e também infectam lepidópteras, e *Gamma* e *Deltabaculovirus*, que infectam as ordens Hymenoptera e Diptera, respectivamente (Jehle et al., 2006).

A maior divisão filogenética dentre os baculovírus foi observada em *Alphabaculovirus*, que resultou na separação de dois grandes grupos monofiléticos (grupo I e II) (Herniou et al. 2001). Esses dois grupos diferem significativamente no seu conteúdo gênico, como por exemplo, os NPVs do grupo I possuem a proteína de fusão de envelope GP64 nos BVs, enquanto os NPVs pertencentes ao grupo II não possuem a GP64, mas utilizam a proteína F como proteína de fusão de envelope (Pearson & Rhormann 2002). Sugere-se que a linhagem de grupo I foi originada quando uma variante de NPV incorporou a GP64, o que resultou na derivação desse grupo como uma linhagem distinta (Jiang et al. 2009). No entanto, apenas com o sequenciamento e deposição de mais sequências nos bancos de dados, aumentando-se a amostragem, será possível se entender por completo a evolução dos baculovirus como um todo.

1.4.3. Genômica dos baculovírus

O primeiro genoma do baculovírus a ser sequenciado foi o de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Ayres et al. 1994), o baculovírus mais estudado e caracterizado, sendo também o mais utilizado como vetor de expressão de proteínas, devido a sua plasticidade de infecção, por infectar diversas espécies e diversas linhagens de células de lepidópteros (McIntosh et al. 2005). Esse genoma apresenta 133,9 kb, 156 regiões de fase de leitura (do inglês *open reading frames* – ORFs) e conteúdo G+C de 41% (Ayres et al. 1994). Desde então, o número de novos sequenciamentos de genomas de diferentes espécies de baculovírus é cada vez maior, variando tamanhos de genomas de 817 kb (Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus (NeleNPV) (Lauzon et al. 2004) a 17,87 kb (*Xestia c-nigrum granulovirus* - XcGV) (Hayakawa et al. 1999). Com esse aumento de genomas sequenciados e publicados, é possível, cada vez mais, se inferir as relações filogenéticas dentre os baculovírus. Atualmente, 115 genomas foram sequenciados e depositados no GenBank, dentre os quais 72 são de espécies únicas de baculovírus (anexo 1).

Por meio de comparações entre os genomas de baculovirus já sequenciados, foi possível observar a existência de um conjunto de genes conservados em comum, denominados do inglês *core genes*. Os *core genes* estão envolvidos em funções biológicas como transcrição de genes, produção de proteínas estruturais dos vírions, bem como estabelecimento da infecção no intestino médio do hospedeiro (van Oers & Vlak 2007; Rohrmann 2011). A tabela 1 apresenta a função relacionada de todos os *core genes* de baculovírus. Desses genes, 37 são genes compartilhados que já foram identificados em todos os baculovírus sequenciados até o momento (Garavaglia et al. 2012; Yuan 2011).

Tabela 1. Descrição da função dos genes conservados (*core genes*) em todos os baculovírus.

Core gene	Função
lef-2	Replicação de DNA/fator associado a primase
lef-1	DNA primase
pif-2	Requerido pelo fator de infectividade <i>per os</i> (PIF-2)
p47	Subunidade da RNA polymerase
lef-8	Subunidade da RNA polymerase
ac53	Envolvida na montagem de nucleocapsídeos/Ubox/domínio similar RING
vp1054	Proteína de nucleocapsídeo

Core gene	Função
lef-9	Subunidade da RNA polimerase
Dnapol	Replicação de DNA
Desmop	Presente no nucleocapsídeo
PIF-6	Requerido pelo fator de infectividade <i>per os</i> (PIF-6)
Vlf1	Envolvida na expressão dos genes <i>p10</i> e <i>polh</i>
ac78	Função desconhecida/região transmembrana
gp41	Proteína de tegumento
ac81	Função desconhecida
p95	Proteína associada ao capsídeo viral
vp39	Proteína mais abundante do capsídeo
lef-4	Subunidade da RNA polimerase /enzima de <i>capping</i>
p33	Sulfidril oxidase
p18	Regressão dos nucleocapsídeos
odv-e25	Proteína de envelope de ODV
Helicase	Desenovelamento de DNA
PIF-4	Requerido pelo fator de infectividade <i>per os</i> (PIF-4)
38k	Requerida para a montagem de nucleocapsídeos
lef-5	Fator de iniciação de transcrição
p6.9	Proteína do nucleocapsídeo
p40	Subunidade de complexo proteico

Esses *core genes* foram provavelmente incorporados aos genomas desses vírus antes de processos de diversificação, uma vez que são encontrados em todos os quatro gêneros da família *Baculoviridae*, enquanto outros genes são encontrados em apenas alguns desses gêneros, sugerindo que essa incorporação ao genoma tenha ocorrido mais recentemente. Outros são ainda encontrados na maioria dos grupos, mas ausente em outros, podendo sugerir também deleção ou perda gênica (Miele et al. 2011). No entanto, apenas uma pequena porção do genoma viral de baculovírus codifica genes que são comuns a todos eles, uma vez que mais de 800 grupos ortólogos diferentes já foram encontrados em baculovirus (Jehle et al., 2006).

Além disso, outros elementos são comumente encontrados nos genomas de baculovírus, como as regiões homólogas (do inglês *homologous regions – hrs*). Essas regiões são elementos de DNA palindrômico e repetitivo (Kool et al. 1995), envolvidos em funções como origens de replicação (*oris*) (Pearson & Rohrmann 1995), ativadores (*enhancers*) de transcrição gênica (Kuzio et al. 1999; Pang et al. 2001), bem como sítios de recombinação

homóloga (Hayakawa et al. 1999). Essas regiões são altamente variáveis e sua homologia com diferentes vírus é muito limitada, mas no entanto, dentro do mesmo genoma há regiões de repetição similares (Rohrmann, 2011).

O gene da poliedrina de AcMNPV, também foi a primeira sequência gênica de baculovírus a ser sequenciado (Hoofst Van Iddekinge et al. 1983), e com isso, esse foi o primeiro gene a ser utilizado para se realizar análises filogenéticas (Zanotto et al. 1992). No entanto, como se trata de um gene altamente conservado, o sinal filogenético desses genes geralmente é difuso (Jehle et al. 2006), podendo refletir em diferenças reais na filogenia devido a fatores como recombinação (Herniou & Jehle, 2007). Por outro lado, análises filogenéticas realizadas com grande banco de dados, como os *core genes*, se mostra mais acurada, robusta e informativa, e por isso, análises mais recentes tem utilizado esses genes (Herniou et al. 2003).

1.4.4. Regulação da expressão gênica

A infecção dos baculovirus é um processo sequencial, dado numa cascata transcricional, onde cada fase de expressão de genes depende do sucesso da fase anterior, sendo esse processo crucial para o sucesso da replicação viral. Desse modo, a expressão de proteínas virais podem ser categorizadas pelo seu momento de expressão no contexto replicativo, e são divididas nos seguintes estágios: precoce (do inglês *early*), tardio e muito tardio (do inglês *late* e *very late*), (Miller 1997). No início de infecção, os baculovírus exploram o sistema transicional da célula hospedeira para expressar seus genes precoces, que são transcritos antes da replicação do DNA viral, utilizando a RNA polimerase II do hospedeiro (Friesen, 1997).

Na fase tardia da infecção, depois que já foi iniciada a replicação do DNA viral, os baculovírus agem independentemente utilizando sua própria maquinaria de RNA polimerase para transcrição de genes tardios (Blissard & Rohrmann 1990; Yang et al. 1991). Esse complexo de RNA polimerase viral inicia a transcrição a partir de elementos promotores localizados de 30–90 pb a montante do códon de iniciação ATG (Blissard & Rohrmann 1990; Gross et al. 1993). Como a expressão tardia de genes é necessariamente dependente da

replicação do DNA viral, estudos mostraram que quando essa replicação é inibida, a expressão tardia de genes não é observada (Friesen & Millert 1987; Rice & Miller 1986).

1.4.4. Infecção e modo de ação

O modo de infecção dos baculovírus é complexo, uma vez que, como previamente descrito, envolve dois tipos de vírions, os BVs e os ODVs. O ciclo de infecção (Figura 10) se inicia quando as larvas de insetos consomem, por via oral, alimentos contaminados com *OBs*. Vale ressaltar que a transmissão e replicação de baculovírus ocorre exclusivamente nos estágios larvais dos insetos. Uma vez ingeridos, os *OBs* percorrem o intestino anterior e adentram o intestino médio, um ambiente com suco gástrico de pH altamente alcalino (pH 10-11) e rico em enzimas digestivas (Terra & Ferreira 1994). Os baculovírus evoluíram de forma adaptativa para tolerar e explorar esse microambiente extremo, uma vez que a própria alcalinidade do intestino médio provoca a dissolução dos *OBs* e liberação dos *ODVs*.

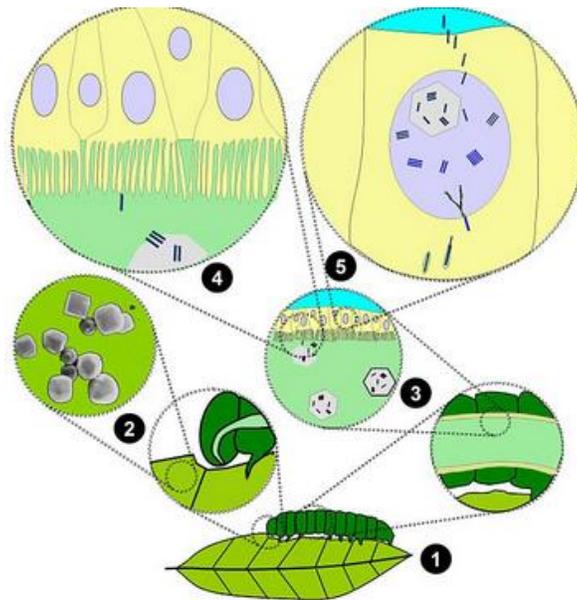


Figura 10. Ciclo de infecção de baculovírus. (1-2) o inseto se alimenta dos *OBs* presente nas folhas. (3) Lúmen do intestino médio da lagarta, com condições alcalinas. (4) *OBs* sendo dissolvidos no intestino médio, liberando os *ODVs*. (5) *ODVs* que infectam as células epiteliais com microvilosidades. (6) Replicação viral no núcleo da célula. Adaptado de (Baculovirus. In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a Enciclopédia Livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível Em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/Baculovirus#mediaviewer/File:Npv-Lebenszyklus.jpg>>. Acesso Em: 28 Fev. 2015).

Posteriormente, para infectar as células epiteliais do intestino médio, os ODVs necessitam atravessar a membrana peritrófica, uma estrutura que consiste numa matriz rica em quitina, mucopolissacarídeos e proteínas, com função de proteção mecânica inata do epitélio do intestino médio, bem como barreira contra micro-organismos (Adams e McClintock 1991; Hegedus 2009). Os ODVs rompem essa membrana por intermédio de diversos fatores virais de degradação (Derksen & Granados 1988), como metaloproteases virais (enhancinas) que clivam proteínas constituintes dessa membrana, como a mucina, uma proteína de alto peso molecular fortemente glicosilada, produzida pelas células epiteliais (Wang & Granados 1997).

Para a efetiva entrada do ODV na célula, há uma combinação de fatores que estão envolvidos, como a ligação do envelope dos vírions aos receptores celulares, ativando enzimas que permitem o acesso viral por meio de fusão com a membrana da célula hospedeira, e a liberação dos nucleocapsídeos. Dentre esses incluem-se os genes relacionados à fatores de infecção oral (P74, PIF-1, PIF-2, PIF-4, e PIF-5) (Fang 2009; Kikhno 2002; Rohrmann 2013).

Uma vez na célula, os nucleocapsídeos são transportados para a membrana nuclear, num processo que envolve a polimerização de actina (Goley, E.D., 2006), onde a replicação viral inicia-se, formando um estroma virogênico com alta produção de mRNAs e progênie viral, que posteriormente são espalhados sistemicamente em forma de BVs, estabelecendo infecções secundárias que são mediadas por proteínas de fusão de membrana como a GP64 ou a proteína F (Guarino et al. 1992; Keddie 1989)(Figura 11b e c).

O último passo da infecção viral (Figura 11c) é destinado a manter nucleocapsídeos montados no núcleo, para que se tornem oclusos. Nesse momento há uma super-expressão de genes ativados por promotores muito tardios, resultando na produção de níveis elevados de proteínas estruturais do *OB*, como a poliedrina e a P10. A poliedrina é a proteína de maior abundância do *OB*, que cristaliza e envolve os vírions numa rede (Braunagel 2007). Até 10^{10} poliedros podem ser produzidos por larva nesse momento final da infecção, representando cerca de 30% do peso seco da larva (Miller et al. 1983). A P10 é uma proteína fibrilar que está envolvida na desintegração da célula do hospedeiro e montagem dos OBs (Van Oers et al. 1994).

Após esse último estágio, duas enzimas virais são cruciais para a quebra da cutícula do hospedeiro, a *catepsina* e a *quitinase*, uma vez que elas são responsáveis por liquefazer a larva, permitindo a liberação dos poliedros produzidos, que irão infectar horizontalmente outros indivíduos (Hawtin et al., 1997).

1.4.6 Importância dos baculovírus

A importância dos baculovirus nas relações ecológicas da natureza está em seu papel de controlar as populações de insetos, uma vez que são patógenos naturais. Como exemplo, sabe-se que eles são reguladores das populações de mariposas na América do Norte, sendo responsáveis por mais de 50% da mortalidade (Podgwaite 1981).

No âmbito da agricultura, por serem patógenos específicos de insetos e não possuírem efeitos em plantas, mamíferos, peixes, aves ou outros organismos não-alvo, os baculovírus são excelentes candidatos para o uso alternativo de pesticidas, sendo utilizados como bioinseticidas no controle biológico de pragas em monoculturas. Como exemplo, o baculovirus *Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovirus* (AgMNPV) já foi amplamente utilizado no controle da lagarta da soja, em mais de 1 milhão de hectares anualmente no Brasil (Moscardi, 1999). No entanto, existem limitações em seu uso, como a demora para matar os insetos, espectro restrito de hospedeiros, bem como dificuldades técnicas e econômicas para a produção *in vitro* e comercialização, alteração da eficácia em campo devido a condições climáticas, dentre outros. (Moscardi, 1999).

Além disso, os baculovírus são amplamente utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos no qual são produzidos baculovírus recombinantes com genes codificando proteínas de interesse, que são clonados sob o comando do promotor do gene da poliedrina, uma vez que essa proteína é produzida em grandes quantidades durante a infecção (King & Possee 1992). Ainda, os baculovirus são utilizados como ferramentas de terapia gênica, uma vez que infectam somente insetos e não replicam em vertebrados, plantas ou micro-organismos, mas no entanto, com promotores adequados, são capazes de transduzir em células animais (Mäkelä et al. 2006), realizando uma entrega gênica de proteínas heterólogas de interesse (Kost et al. 2005).

1.4.7 *Lonomia obliqua multiple nucleopoliedrovirus* (LoobMNPV).

LoobMNPV foi primeiramente isolado e caracterizado por Wolff et al.(2002), e foi denominado *Lonomia obliqua multicapsid nucleopolyhedrovirus*. Esse vírus foi analisado por microscopia eletrônica sua ultraestrutura, apresentando corpos de oclusão típicos de baculovírus, de tamanho variando de 1,0 a 1,4 µm, contendo múltiplos nucleocapsídeos no mesmo envelope viral. Conforme o perfil de restrição gerado a partir da digestão do genoma por enzimas de restrição, esse vírus apresentou um tamanho de aproximadamente 95.500 pb. O gene da poliedrina desse vírus foi sequenciado, e a partir dessa sequência, uma árvore filogenética foi realizada, pela qual LoobMNPV ficou agrupado junto ao grupo INPV, sendo mais relacionado a *Amsacta albistriga* NPV.

1.5. Justificativa

Ante ao crescimento das populações de *L. obliqua* em diversas regiões do Brasil, observa-se também um conseqüente aumento relacionado aos acidentes e até óbitos causados a humanos por essas lagartas, dada sua toxicidade quando em contato com a pele humana (Moreira & Moresco 2007). Com a descoberta e identificação do baculovírus que infecta essas lagartas (Wolff et al., 2002), LoobMNPV, objeto de estudo desse trabalho, é possível analisar a viabilidade de utilizá-lo como ferramenta de controle biológico no combate ao desequilíbrio das populações desse inseto, auxiliando diretamente a medicina preventiva.

Ainda, o maior conhecimento de novos membros da família *Baculoviridae*, como é o caso de LoobMNPV, permite uma melhor análise do contexto filogenético que abrange esses vírus, possibilitando uma melhor compreensão dos processos evolutivos e biológicos aos quais estão envolvidos, e que por sua vez, podem até ser transpostos e utilizados em outras áreas do conhecimento.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi analisar e organizar o genoma do baculovírus *Lonomia obliqua multiple nucleopoliedrovirus* (LoobMNPV), e fazer correlações quanto a sua filogenia frente aos outros baculovírus, bem como analisar suas peculiaridades, com o intuito de se conhecer mais acerca desse vírus com potencial para utilização em programas de controle biológico.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

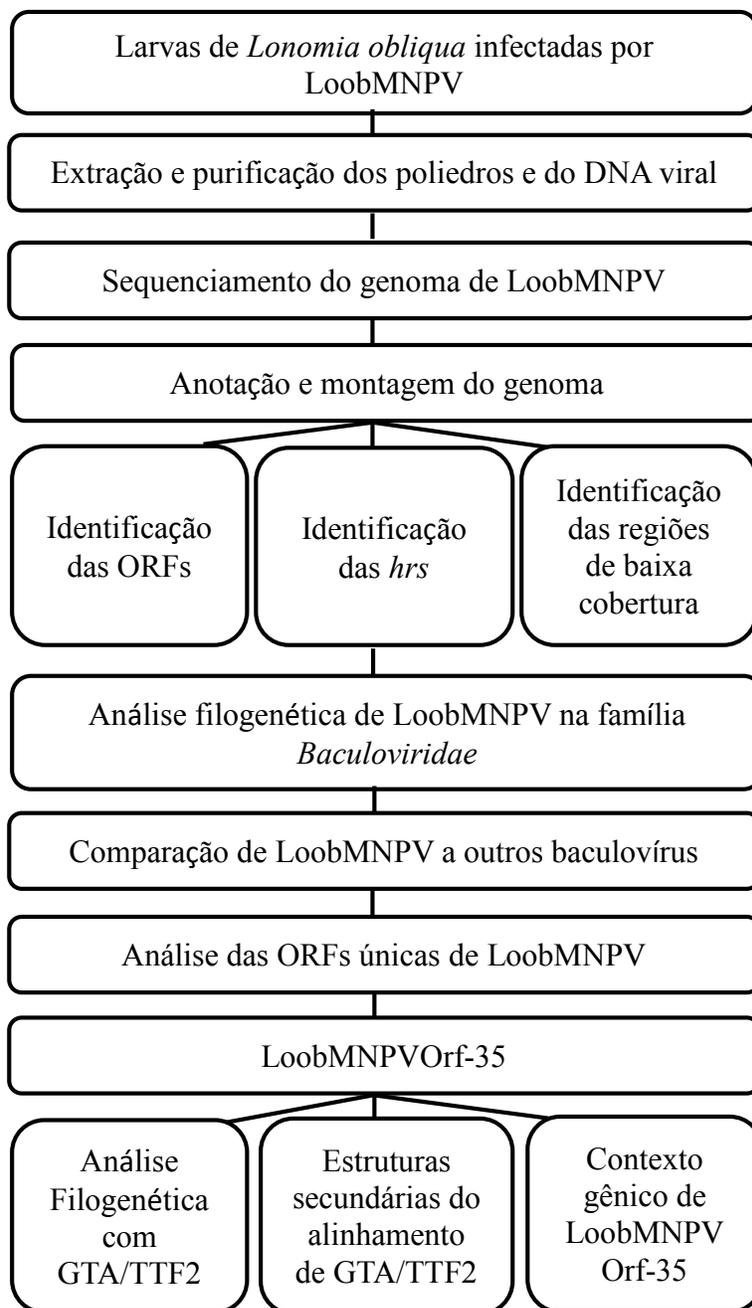
Montar o genoma do baculovírus LoobMNPV e analisar sua composição genômica e seu contexto evolutivo em relação a outros baculovírus.

1.6.2. Objetivos específicos

- Isolar o DNA viral de LoobMNPV a partir de larvas de *L. obliqua* infectadas;
- Sequenciar o DNA de LoobMNPV;
- Realizar a montagem e anotação do genoma
- Analisar composição gênica de LoobMNPV;
- Analisar a relação filogenética e contexto evolutivo de LoobMNPV comparado aos outros baculovírus;
- Analisar as peculiaridades do genoma de LoobMNPV como a presença de ORFs únicas, regiões homólogas (*hrs*) e ausência de genes encontrados em outros baculovírus;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho esquemático da metodologia



2.2. Amostra viral

O baculovírus objeto desse estudo foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff, da Universidade Presbiteriana Mackenzie, isolado a partir de extrato larvas de *Lonomia obliqua* infectadas. Essas larvas infectadas foram mantidas a uma temperatura de -10 °C, no Laboratório de Biologia Molecular e Virologia, da Universidade Presbiteriana Mackenzie e posteriormente cedidas ao laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília, que por sua vez as manteve sob as mesmas condições, até o momento de procedimentos para isolamento e purificação do DNA viral.

2.3. Isolamento do DNA viral

Os corpos de oclusão (*OBs*) foram obtidos a partir do extrato de larvas de *L. obliqua* infectadas e mortas, que foram purificadas conforme O'Reilly et al. (O'Reilly et al 1992), Primeiramente, os cadáveres foram homogeneizados com água destilada (ddH₂O- w/v). O extrato obtido foi posteriormente filtrado por três camadas de gaze para remoção dos resíduos teciduais, e submetido à centrifugação a 7,000 \times g por 10 minutos. Posteriormente, o precipitado foi novamente suspenso e lavado em SDS 0.5% (w/v) e centrifugado sob as mesmas condições descritas acima, com intuito de se obter os poliedros que ficam na porção precipitada, separando-o do DNA e debris celulares que ficam no sobrenadante, que por sua vez é descartado. Esses passos de lavagem e centrifugação foram repetidos quatro vezes até se obter o precipitado final, que por fim foi lavado em NaCl 0.5 M e suspenso em água destilada (ddH₂O).

Para obtenção e purificação dos *OBs*, um gradiente de sacarose foi realizado, colocando o material em um gradiente de sacarose a 40-65%, que por sua vez foi centrifugado a 104.000 \times g por 40 minutos a 4°C. A banda referente aos *OBs* foi coletada, e diluída em um fator de quatro em água destilada (ddH₂O) e posteriormente submetida novamente à centrifugação a 7,000 \times g por 15 minutos a 4°C. Os *OBs* foram então dissolvidos em solução alcalina e o DNA purificado conforme o protocolo descrito em O'Reilly et al. (1992). A

quantidade e a qualidade do DNA isolado obtido pelo gradiente de sacarose foram determinadas por gel de eletroforese a 0.8% em gel de agarose, bem como em equipamento NanoDrop® (Nano Drop 2000c, Thermo Cientific, Wilmington, DE, USA).

2.4. Sequenciamento do genoma de LoobMNPV

O DNA viral referente ao baculovírus LoobMNPV extraído de larvas de *Lonomia obliqua* infectadas foi sequenciado através da técnica de piro sequenciamento, realizada em sequenciador 454 Genome Sequencer (GS) FLX™ Standard, da marca comercial Roche, na Macrogen Inc, localizada no Seoul, República da Korea.

2.5. Anotação e montagem do genoma de LoobMNPV

A montagem *de novo* e anotação do genoma de LoobMNPV foi realizada com o auxílio do programa Geneious 7.1.6 (Biomatters). De acordo com os seguintes parâmetros: sensibilidade média do mapeamento da montagem/alinhamento, e interação de 25 vezes. No processo de montagem, as possíveis regiões de fase de leitura, ou ORFs (do inglês *Open Reading Frames*), foram selecionadas a partir dos seguintes parâmetros: resíduo de aminoácido metionina (ATG) como códon de iniciação de transcrição, sobreposição mínima de ORFs adjacentes e ORFs com no mínimo 150 pares de base (50 aminoácidos). As ORFs nessas condições foram selecionadas para análises posteriores.

A análise de similaridade das possíveis ORFs foi realizada utilizando a plataforma BlastP (Altschul et al. 1990), com o intuito de identificar homologia e identidade proteica das ORFs encontradas no genoma de LoobMNPV em comparação à outras sequencias encontradas em outros organismos, especialmente em outros baculovírus.

Realizou-se ainda, a busca por motivos conservados no genoma de LoobMNPV, dentro da região de 200 pb a montante de cada ORF única de LoobMNPV.

Com o intuito de confirmar a montagem, uma digestão *in silico* foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI e *Pst*I. O perfil de digestão desse resultado foi comparado ao perfil previamente apresentado no trabalho de identificação do vírus LoobMNPV (Wolff et al. 2002).

2.6. Confirmação das regiões de baixa cobertura

Durante a montagem do genoma, foi observada uma região de baixa cobertura (na posição 54,268 a 54,957 do genoma), uma vez que se apresentou fora dos parâmetros estabelecidos no programa Geneious 7.1.6. (Biomatters), onde apenas regiões com mais de 50 reads gerados pelo sequenciamento foram consideradas. Desse modo, afim de confirmar a montagem do genoma e em especial dessa região, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores citados na tabela 2, e conforme o procedimento estequiométrico apresentado na tabela 3 e programa de PCR apresentado na tabela 4. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

Tabela 2. Iniciadores para amplificação da região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV.

Nome do iniciador	Sequencia
LoobMNPV baixa cobertura Primer F	GTGCCCTACAAGAAATATTCGCA
LoobMNPV baixa cobertura Primer R	GCGCCAACAATTTAATGGTAGC

Tabela 3. Procedimento da reação de PCR, de volume final de 50 µl, utilizada para a amplificação da região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV. A enzima Taq DNA polimerase e o tampão utilizado são da marca pht (Photoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.), e o dNTP é da marca Promega.

Reagentes	Volume (µl)	Concentração final
Primer F (10µmol)	1	0,2 µmol
Primer R (10µmol)	1	0,2 µmol
dNTP mix (10mM)	1	0,2mM
Tampão 10X	5	1X
MgCl ₂ (50mM)	1,5	1,5mM
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5	2,5 U
DNA viral (LoobMNPV) (50ng/µl)	1	1ng
Água ultrapura (Milli-Q)	39	-

Tabela 4. Programa utilizado na amplificação da região de baixa cobertura de LoobMNPV.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	1:00 minuto	-
Desnaturação	94	1:00 minuto	35
Anelamento	55	0:20 segundos	35
Extensão	72	1:30 minuto	35
Extensão final	72	7:00	-
Resfriamento	12	∞	-

2.7. Análise e confirmação das regiões homólogas (*hrs*)

Para detectar as regiões homólogas (*hrs*- do inglês *homologous regions*) presentes no genoma de LoobMNPV, buscas computacionais por DOTPLOT pelo programa Geneious 7.1.6. (Biomatters) e pela plataforma *Tandem Repeat Finder* (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (Benson 1999) foram realizadas, afim de se analisar a composição e localização dessas regiões repetitivas e *in tandem*. A partir dessas sequencias encontradas, um alinhamento da unidade de repetição de cada *hr* foi realizada utilizando MAFFT (Kato et al. 2002).

Posteriormente, após detectar as *hrs*, com o intuito de se confirmar o tamanho e a posição no genoma de LoobMNPV, PCRs foram realizados com as 7 regiões homólogas encontradas no genoma com os iniciadores citados na tabela 5, conforme a reação de PCR da tabela 6, bem como com o programa utilizado na reação de PCR conforme tabela 7. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

Tabela 5. Iniciadores utilizados na amplificação das *hrs* de LoobMNPV.

Nome do iniciador	Sequência (5'>3')	Posição inicial do iniciador no genoma (pb)
hr1-F	AGAGTTGGAAATTTTCGCGCTC	5,267
hr1-R	GTTTTTACTCTGTCCGCGCG	6,150
hr2-F	CCCGCTAATGAACCGTGTGA	21,586
hr2-R	AACCGTTTTAAATCCTTCGTGT	22,316
hr3-F	GCTGGAGTAAATTGTTCAATCGC	32,413
hr3-R	TTCCATAACGGGGTGCCAA	33,627
hr4-F	TAGGGCACAATAGCAGCAGC	54,972
hr4-R	ACGTGCCAAGTCGAATCTGA	55,927
hr5-F	CTGCGTTTGTTCGACCCAAT	72,093
hr5-R	CTGAAACGCGACAACAGTCC	72,952

hr6-F	CGCATAACCTTTAGCGTGACT	91,455
hr6-R	TCATGTCTGGCCAATGAGGAC	91,995
hr7-F	AATGCGCAAAAAGAACGGGTC	100,516
hr7-R	AACAACCTAACTGCGCCCCA	101,532

Tabela 6. Procedimento da reação de PCR, de volume final de 50 μ l, utilizada para a amplificação das sete *hrs* do genoma de LoobMNPV. A enzima Taq DNA polimerase e o tampão utilizado são da marca Ludwig biotech e o dNTP é da marca Promega.

Reagentes	Volume (μ l)	Concentração final
Primer F (10 μ mol)	1	0,2 μ mol
Primer R (10 μ mol)	1	0,2 μ mol
dNTP mix (10mM)	1	0,2mM
Tampão 10X	5	1X
MgCl ₂ (50mM)	1,5	1,5mM
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5	2,5 U
DNA viral (LoobMNPV) (50ng/ μ l)	1	1ng
Água ultrapura (Milli-Q)	39	-

Tabela 7. Programa utilizado na amplificação das *hrs* de LoobMNPV.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)								Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94								2:00 minuto	-
Desnaturação	94								0:45 segundos	35
Anelamento	hr1	hr2	hr3	hr4	hr5	hr6	hr7	0:30 segundos	35	
	68	65	60	65	63	63	68			
Extensão	72								1:00 minuto	35
Extensão final	72								10:00	-
Resfriamento	12								∞	-

2.8. Análise filogenética

2.8.1. Análise filogenética de LoobMNPV em relação à família *Baculoviridae*

Para analisar a posição filogenética de LoobMNPV em relação à família *Baculoviridae* um alinhamento realizado por MAFFT (Kato et al. 2002) foi realizado, utilizando sequências de aminoácido concatenadas contendo os 37 genes conservados (*core genes*) (tabela 1) encontrados em todos os 72 genomas de baculovirus (um isolado de cada espécie de baculovírus) atualmente disponíveis no banco de dados do GenBank (anexo 1).

Através do programa jMmodelTest (Posada 2003), foi realizada a predição do modelo de evolução da árvore. Desse modo, com base nos resultados apresentados por esse programa, a árvore referente à família *Baculoviridae* foi construída pelo método estatístico de Máxima Verossimilhança (ML- do inglês *Maximum Likelihood*) (Chor & Tuller 2005) realizado por intermédio do programa de probabilidade filogenética PhyML 2.2.0 (Guindon 2003) na plataforma do pacote Geneious 7.1.6 (Biomatters). O suporte dos ramos foi calculado pelo método de *bootstrap* (100 repetições de *bootstrap* não-paramétrico) (Felsenstein 1985). A mesma árvore também foi realizada pelos programas RAxML (Stamatakis 2006) e FastTree (Price et al. 2009), que usa o método SH-like (Shimodaira & Hasegawa 1999) para calcular o suporte do ramo. O modelo de evolução de DNA utilizada foi o GTR (do inglês *Generalised time-reversible*) (Tavaré 1986), utilizando o parâmetro de distribuição gama (Stacy, 1962) para calcular as taxas de variação entre os nucleotídeos. A edição de cada árvore filogenética construída foi realizada utilizando o software FigTree v1.4.0 (Rambaut).

2.8.2. Análise filogenética de ORF de LoobMNPV

Uma ORF de LoobMNPV (LoobNPVOrf-35) e os genes *Global Transactivator - GTA* e *Transcription terminator factor 2- TTF2* foram alinhados por MAFFT (Kato et al. 2002), utilizando sequências de aminoácidos concatenadas a partir de um conjunto de dados constituído pelos genes GTA encontrados em *Alphabaculovirus*, bem como pelos genes TTF2 de maior similaridade à LoobNPVOrf-35, conforme anexo 2. O método utilizado também foi ML através do algoritmo PhyML 2.2.0 (Guindon 2003), com modelo de substituição de aminoácidos JTT (Jones et al. 1992) e 100 repetições de *bootstrap* não

paramétrico (Felsenstein 1985) através da plataforma Geneious 7.1.6 (Biomatters). A edição da árvore filogenética construída também foi realizada utilizando o software FigTree v1.4.0 (Rambaut).

Com o intuito de demonstrar evidência estatística em relação a melhor hipótese da posição de LoobNPVOrf-35 na árvore GTA/TTF2, se agrupado à GTA ou à TTF2, o programa *Bayes factor estimator* (Baele et al. 2013), do programa MrBayes (Ronquist et al. 2012) foi utilizado, comparando a probabilidade marginal das duas hipóteses distintas, utilizando estatística *Bayesiana*, que requer conhecimento do espaço paramétrico representado pela sua distribuição *a posteriori* dos dados.

2.9. Comparação de LoobMNPV a outros baculovírus

O genoma de LoobMNPV foi analisado utilizando o programa CGView Comparison Tool (Grant & Stothard 2008), com o objetivo de comparar o conteúdo gênico de LoobMNPV com os seguintes baculovírus mais relacionados a ele: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Ayres et al. 1994) (NCBI n°: L22858), *Atheraea pernyi nucleopolyhedrovirus* (AnpeNPV) (Nie et al. 2007) (NCBI n°: DQ486030), *Dendrolimus kikuchii nucleopolyhedrovirus* (DekiNPV) (NCBI n°: JX193905) , *Maruca vitrata multiple nucleopolyhedrovirus* (MaviMNPV) (Yun-Ru Chen et al. 2008) (NCBI n°: EF125867), e *Thysanoplusia orichalcea multiple nucleopolyhedrovirus* (ThorMNPV)(Cheng & Carner 2000) (NCBI n°: JX467702).

Os dados gerados foram analisados no programa Circos (Krzywinski et al. 2009), permitindo a plotagem de um gráfico comparativo de acordo com o grau de identidade de LoobMNPV em relação aos outros baculovírus supracitados, bem como suas posições e conteúdo dos nucleotídeos C+G. Ainda, com esses dados, foi efetuado também um gráfico comparativo em forma de fitas, permitindo comparação da sintenia dos genomas acima relacionados em relação à LoobMNPV, possibilitando a visualização de inversões, rearranjos genômicos e inserções gênicas.

2.10. Análise da estrutura secundária de alinhamento

Um alinhamento com a sequência de aminoácidos de uma ORF de LoobMNPV (Orf-35) foi realizado por meio da plataforma T-coffee (Notredame et al. 2000). Esse alinhamento foi posteriormente submetido à uma outra plataforma denominada ESPript 3 (Robert & Gouet 2014), que prevê estruturas secundárias de sequências de aminoácidos. Portanto, com esse intuito de se analisar as conformações estruturais secundárias presentes nos domínios dessas sequências alinhadas, utilizou-se como base os dois cristais previamente descritos na literatura mais similares a sequência dessa ORF (PDB ID: 3mwy (Hauk et al. 2010) e PDB ID: 1z63 (Durr et al. 2005)), que foram extraídos do *Protein Data Bank*. Esses cristais foram alinhados com os genes de GTA de AnpeMNPV e EppoMPV, bem como com os genes de TTF2 de *Danaus plexippus*, *Bombyx mori*, *Chelonia mydas* e *Pterotopus alecto* e a sequência de LoobNPVOrf-35

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da sequência genômica de LoobMNPV

O genoma de LoobMNPV (GenBank nº KP763670) possui 120.023 pb (figura 11), conforme a anotação realizada com 10,003 *reads*, que resultou em uma cobertura média do genoma de 20.5 vezes, com desvio padrão de 7.8. O tamanho do genoma foi superior ao previamente analisado por Wolff et al. (2002), de 95,000 pb, que obteve essa estimativa de tamanho a partir de análises por enzimas de restrição. Esse mesmo perfil de restrição foi realizado *in silico* com os dados obtidos a partir da montagem do genoma de LoobMNPV, que apresentou um perfil similar ao previamente descrito. De acordo com uma convenção pré-estabelecida (Ayres et al. 1994), o primeiro nucleotídeo do genoma é a Adenina do códon de iniciação ATG do gene da poliedrina (*polh*). Desse modo, todas as 134 regiões de fase de leitura (ORFs) encontradas no genoma de LoobMNPV foram numeradas sucessivamente de acordo com a direção desse gene. Foi observado, portanto, que 72 dessas ORFs possuem a mesma orientação que o gene *polh*, enquanto as outras 62 ORFs encontram-se na orientação reversa.

Todas as ORFs encontradas no genoma de LoobMNPV foram analisadas utilizando o programa Blast do banco de dados do NCBI (Altschul et al. 1997), e apenas sequencias com um valor de *E-value* abaixo de ($E < 10^{-3}$) foram consideradas. Esse valor foi dado como corte visto que sequencias que compartilham um alto grau de similaridade apresentam em geral uma ancestralidade compartilhada recente, com alinhamentos contendo diversos resíduos idênticos, poucas substituições e *gaps* e baixo valor de *E-values* (Kerfeld & Scott 2011).

O genoma de LoobMNPV possui 35.7% de conteúdo G+C, que é representado pelo gráfico interno da figura 11. As ORFs LoobNPVOrf-2 (*ORF 1629*), LoobNPVOrf-10 (*p74*), LoobNPVOrf-20 (*odv-e56*), LoobNPVOrf-41 (*pif-1*), LoobNPVOrf-46 (*p40*), LoobNPVOrf-52 (*odv-e25*), LoobNPVOrf-65 (*gp41*), LoobNPVOrf-72 (*iap-2*), LoobNPVOrf-101 (*odv-e66*), e LoobNPVOrf-114 (*sod*) e LoobNPVOrf-123 (*pif-2*) apresentaram altos picos de conteúdo G+C.

3.1.1. Análise de região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV

Com o intuito de confirmar uma região de baixa cobertura de *reads* (sequências de fragmentos oriundos do sequenciamento) na montagem do genoma de LoobMNPV (cobertura < 50 *reads*), localizada em uma região do genoma que abrange o gene *cg30* (LoobMNPVOrf-58) e LoobMNPVOrf-59 (figura 12a), os iniciadores “LoobMNPV baixa cobertura Primer F” e “LoobMNPV baixa cobertura Primer R” foram confeccionados (tabela 2), para amplificação por PCR e confirmação dessa região. Como resultado da reação realizada, obteve-se uma sequência de aproximadamente 750 pares de base, conforme demonstrado no gel de agarose 0,8% representado pela figura 12b. O resultado foi de acordo com o esperado, segundo predição feita no programa Geneious 7.1.6. (Biomatters), confirmando que apesar de possuir baixa cobertura nessa região, a montagem ainda assim foi dada de forma correta.

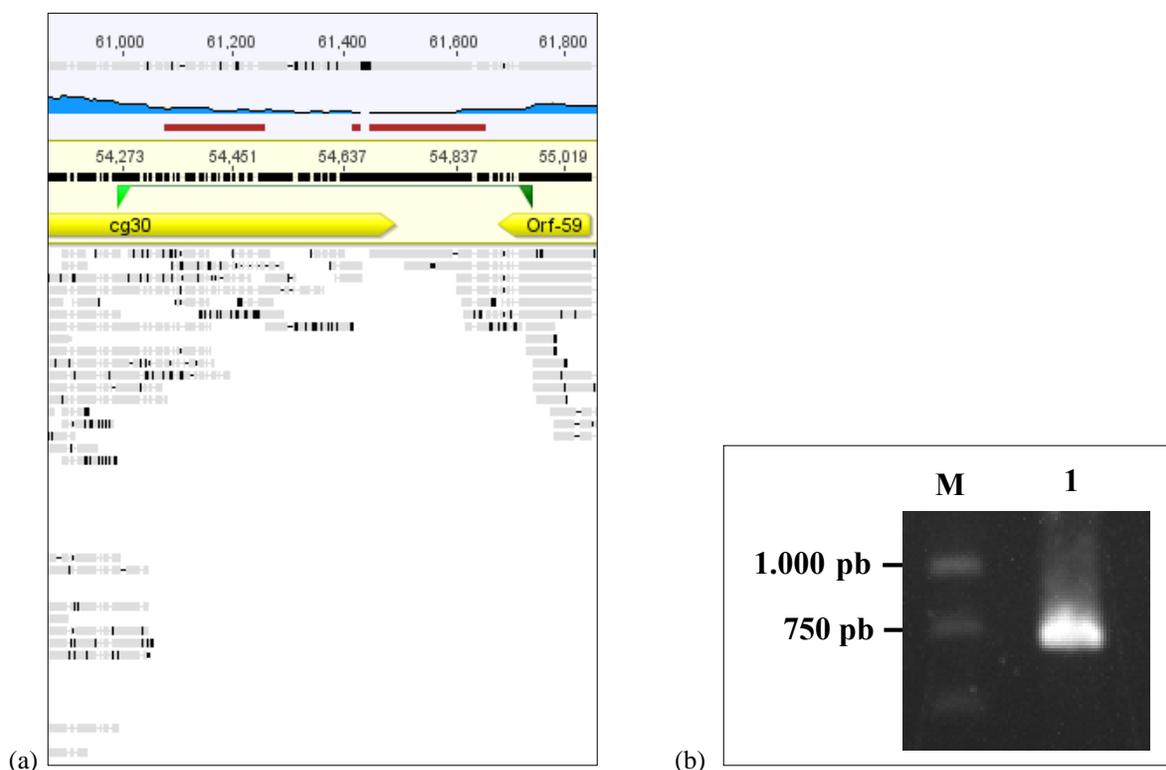


Figura 12. Região de baixa cobertura na montagem do genoma de LoobMNPV. (a) Localização da região de baixa cobertura no contexto genômico, entre o gene *cg30* (LoobMNPVOrf-58) e LoobMNPVOrf-59 (em amarelo). A baixa cobertura é indicada pelo baixo número de *reads* (retângulos pretos e cinzas), conforme ilustra o gráfico em azul, destacando as regiões de menor cobertura em vermelho. Os iniciadores confeccionados para amplificar essa região estão em verde, indicando toda região de amplificação. (b) Gel de agarose 0,8% apresentando amplificação de região de baixa cobertura do genoma de LoobMNPV (1) de 743 pb. M representa o marcador da marca Promega 1kb Ladder.

3.2. Análise das regiões homólogas (*hrs*)

Sete regiões homólogas (*hrs*) foram encontradas no genoma de LoobMNPV. Essas regiões repetitivas de DNA palindrômico estão em geral espalhadas pelos genomas de diversos baculovírus, com número variável, podendo ter de três *hrs* (em CrleGV) (Lange & Jehle 2003) a até dezessete *hrs* (em SpltNPV) (Pang et al. 2001). As *hrs* estão envolvidas em funções como origens de replicação (*oris*) (Pearson & Rohrmann 1995), ativadores (*enhancers*) de transcrição (Kuzio et al. 1999; Pang et al. 2001), bem como sítios de recombinação homóloga (Hayakawa et al. 1999). As sete *hrs* encontradas no genoma de LoobMNPV possuem os seguintes tamanhos conforme tabela 8. Essas regiões estão localizadas no genoma conforme representa a figura 11.

Baseado na montagem do genoma, cada *hr* teve seus respectivos tamanhos confirmados por meio de amplificação por PCR conforme gel de agarose 0,8% (figura 14), que apresenta as bandas de cada *hr* com seus respectivos tamanhos esperados, conforme tabela 8 a seguir. Cada oligonucleotídeo iniciador foi desenhado de modo a anelar-se a aproximadamente 100 pares de base a montante e a jusante de cada terminação das *hrs*.

Tabela 8. Tamanho das *hrs* de LoobMNPV e seus respectivos fragmentos de amplificação.

<i>Hr</i>	Tamanho da <i>hr</i>	Tamanho do amplicon
1	684 pb	884 pb
2	541 pb	749 pb
3	1037 pb	1237 pb
4	713 pb	975 pb
5	679 pb	879 pb
6	361 pb	561 pb
7	836 pb	1036 pb

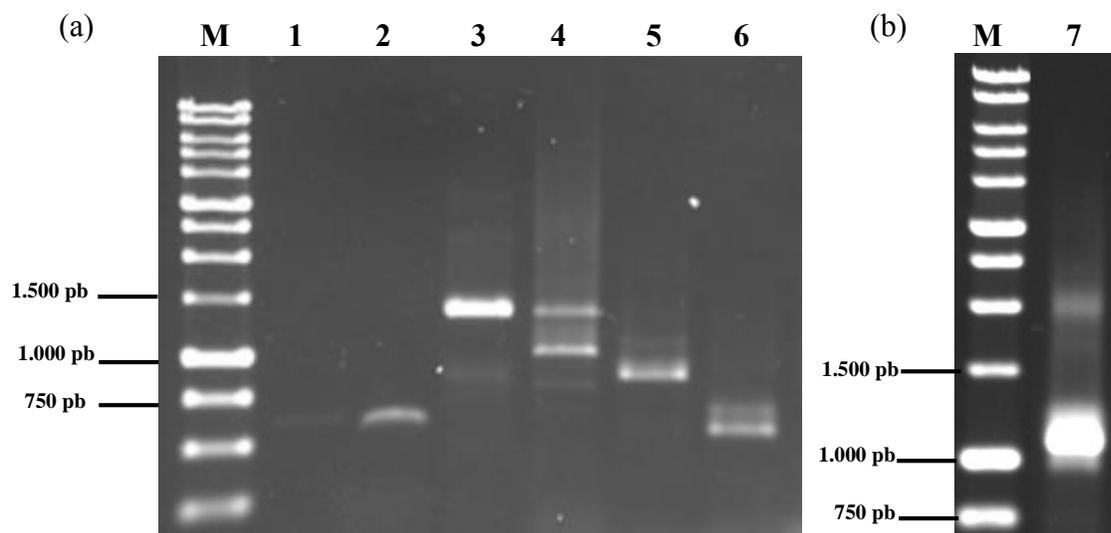


Figura 13. Géis de agarose 0,8% contendo amplificação por PCR das 7 regiões homólogas encontradas em LoobMNPV, com fragmentos de tamanhos esperados, conforme tabela 8. (a) 1- fragmento esperado da *hr1* de 884 pb, 2- fragmento da *hr2* com 749 pb, 3-fragmento da *hr3* com 1237 pb, 4- fragmento da *hr4* com 975 pb, 5- fragmento da *hr5* com 879 pb, 6- fragmento da *hr 6* com 561 pb e (b) 7- fragmento da *hr 7* com 1036 pb. M representa o marcador da marca Promega 1kb Ladder.

A *hr1*, no entanto, amplificou uma banda de aproximadamente 750 pares de base, divergindo dos esperados 884 pb. Para confirmar a *hr1* quanto a essa divergência de tamanho, novos oligonucleotídeos serão desenhados, a fim de se amplificar uma região maior do genoma que abrange essa *hr* (mais 100 pb a jusante e a montante), e posteriormente sequenciar a esperada amplificação, a fim de verificar a montagem nessa região. No entanto, sabe-se que *hrs* são compostas por regiões repetitivas, e uma dessas regiões pode ter sido anotada a mais, ou a menos. Ademais, deve ser levado em consideração que a amostra isolada possa ter diferentes populações virais, podendo levar também a essa divergência.

Todas as *hrs* apresentaram cópias de uma repetição de um palíndromo imperfeito em comum (*hr1a*, *hr2a*, *hr3a*, *hr3b*, *hr4a*, *hr5a*, *hr5b*, *hr6a*, *hr6b* e *hr7a*). A figura 14 apresenta um alinhamento da região mais conservada, de 38 pb, dessa repetição em todas as *hrs*. O *consensus* desse alinhamento (figura 14b) é mostrado por um empilhamento de nucleotídeos, no qual quanto maior for o tamanho de fonte do nucleotídeo, maior será seu grau de conservação na sequência, coincidindo com a área sombreada em vermelho do alinhamento, que corresponde a identidade estrita de pares de base.

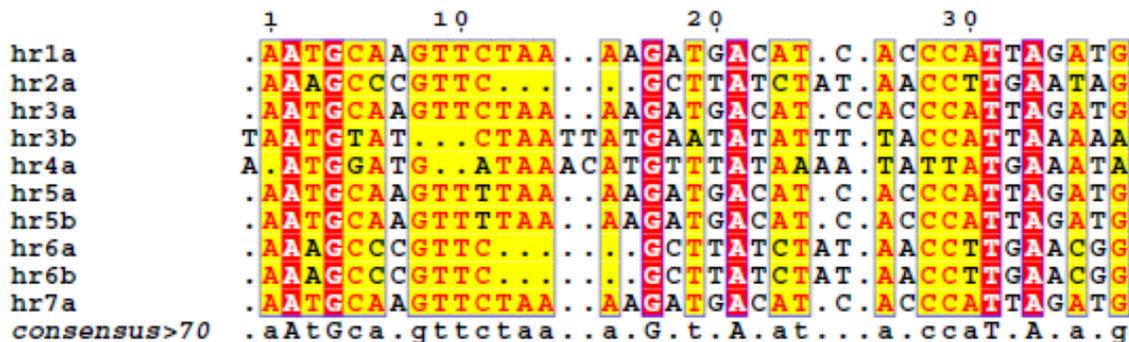


Figura 14. Região repetitiva comum das *hrs* de LoobMNPV. Alinhamento de DNA da unidade repetitiva de 38 pb comum à todas as *hrs* LoobMNPV, numeradas sequencialmente, onde as letras indicam a unidade repetitiva dentro da mesma *hr*. Nucleotídeos que não apresentam identidade estrita estão representados nas áreas de sombreado em vermelho. As áreas sombreadas em amarelo indicam conservação de nucleotídeos com a maioria do grupo alinhado (identidade não estrita). As letras em vermelho indicam nucleotídeos similares no mesmo grupo. A sequência *consensus* referente ao alinhamento está também representado na figura, com conservação de >70%.

Buscas no Blast (Altschul et al. 1997) foram realizadas para todas as *hrs*, no entanto, apenas as *hrs* 3, 5, 6 e 7 demonstraram correspondência com outras *hrs* de baculovírus (*Orgyia lecostigma* NPV, *Adoxophyes orana* GV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV e *Piearis rapae* GV, respectivamente).

As *hrs* são também são ricas em conteúdo A+T (Guarino & Summers 1986), que também pode ser observado no gráfico G+C da figura 11. Esse dado corrobora com o dado previamente citado, que as *hrs* estão envolvidas em funções como origens de replicação (*oris*) (Pearson & Rohrmann 1995), uma vez que origens de replicação de diversas espécies possuem em comum uma alto conteúdo A+T, o que facilita o acesso da maquinaria de replicação ao DNA fita-simples, por essa interação ser mais fraca que as outras (Lodish 2000).

As *hrs* de Baculovírus podem interagir com outros genes, como é o caso da proteína IE-1, que regula a expressão precoce de genes baculovirais em transcrição, e liga-se a *hr5* de AcMNPV, promovendo ativação (*enhancement*) da transcrição. Esse dado sugere que as *hrs* possivelmente co-evoluem com as proteínas que a elas se associam (Guarino & Summers 1986; Rodems & Friesen 1995).

3.3 Análises do contexto filogenético de LoobMNPV na família *Baculoviridae*

A filogenia de todos os 72 genomas de baculovírus sequenciados até a presente data (um isolado de cada espécie de baculovírus) (anexo 1) foi inferida conforme a árvore filogenética mostrada na figura 15. Os dados utilizados para fazer essa árvore foram baseados num conjunto de sequências de aminoácidos concatenados referente aos 37 genes conservados (*core genes*) presente em todos esses baculovírus. Os *core genes* (tabela 1) geralmente assumem funções básicas relacionadas às funções biológicas essenciais (Miele et al. 2011), pois podem ser componentes estruturais pertencentes ao processo de infecção, bem como podem participar no processo de transcrição ou replicação viral (Yun-Ru Chen et al. 2008).

Devido ao tamanho desse conjunto de dados gerados, a referida árvore filogenética apresenta uma alta resolução, uma vez que possui um bom suporte de ramo referente à localização no contexto dessa árvore. Além disso, a árvore foi inferida por três algoritmos distintos, o que respalda sua configuração e congruência no resultado. Ressalta-se que a raiz da árvore foi dada no genoma de CuniNPV, o mais basal dos genomas de baculovírus (Afonso et al. 2001).

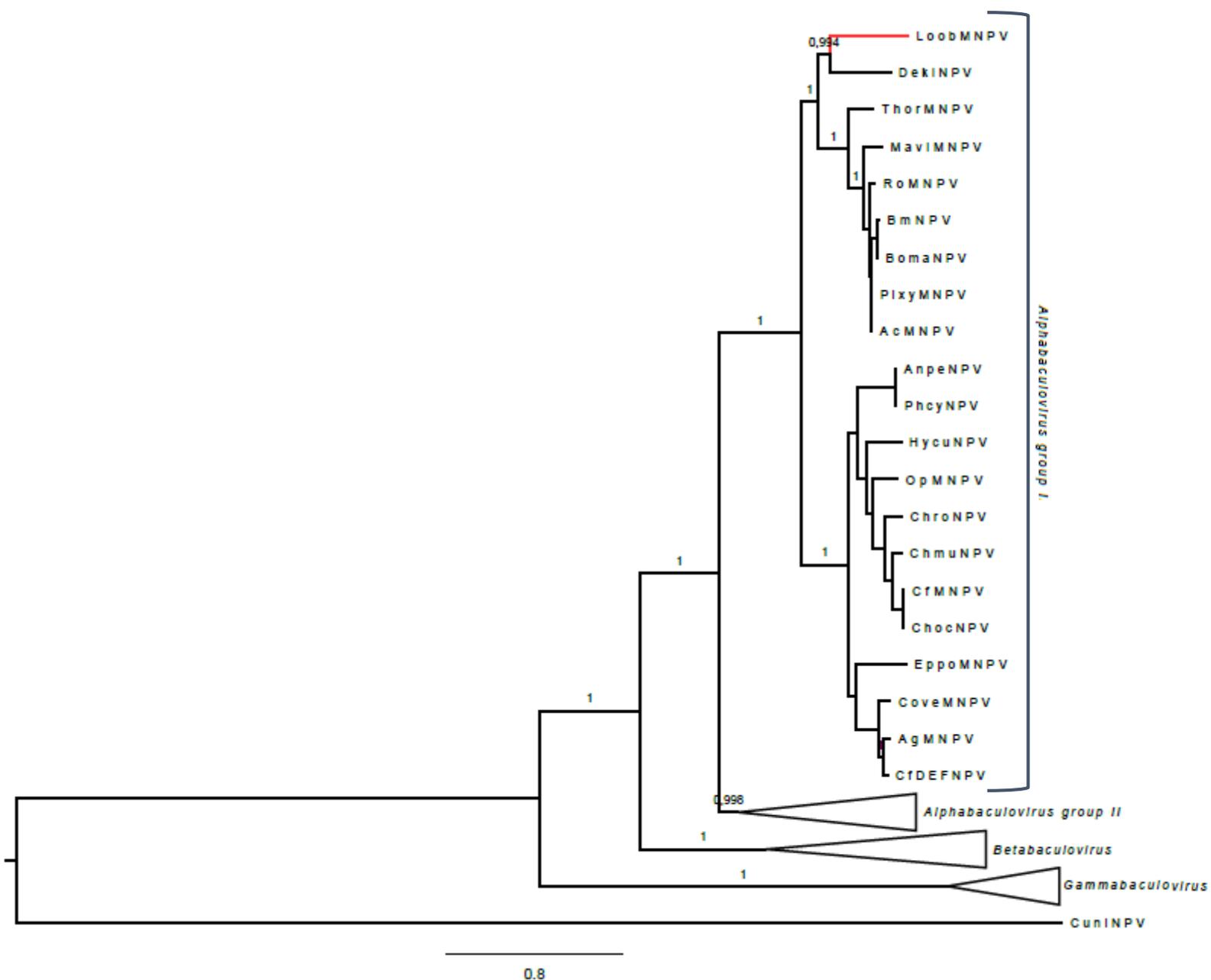


Figura 15. Filogenia da família Baculoviridae baseada nas 37 proteínas ortólogas (core genes) encontradas em todos os 72 genomas de espécies únicas de baculovirus. O número nos ramos representa o valor de suporte do ramo. O baculovirus CuniNPV (*Deltabaculovirus*) é o grupo externo. Os gêneros *Alphabaculovirus* grupo II, *Beta* e *Gammabaculovirus* estão colapsados. LoobMNPV (vermelho) é pertencente à *Alphabaculovirus* grupo I, agrupado junto a DekiNPV e localizado como um clado irmão ao grupo dos vírus similares à AcMNPV.

Conforme referenciado em estudos anteriores (Herniou & Jehle 2007), a árvore da família *Baculoviridae* gerada nesse estudo possui quatro grandes gêneros: *Alphabaculovirus* (dividido em grupo I e II), *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus* e *Gammabaculovirus*.

Herniou e Jehle (2007) descreveram ainda que o gênero *Alphabaculovirus* (NPV)

grupo I pode ser dividido em dois clados monofiléticos : clado IA, que conforme análises realizadas, inclui os baculovirus similares a AcMNPV (AcMNPV, RaouMNPV, BmNPV, ThorNPV, BomaNPV e PlxyMNPV), que em geral infectam insetos membros das famílias Noctuidae, Bombycidae e Plutellidae; e o clado IB, que engloba hospedeiros lepidópteros das famílias Noctuidae, Saturniidae, Arctiidae, Lymantriidae e Tortricidae, sendo representado pelos baculovirus AgMNPV, AnpeNPV, PhcyMNPV, HycuNPV, OpMNPV, ChroNPV, ChmuNPV, CfDEFMNPV, ChorcmNPV, CoveMNPV e EppoNPV. Por conseguinte, dado que cada vez mais genomas de baculovirus vem sendo sequenciados e a quantidade de dados informativos está consequentemente aumentando, as relações evolutivas entre baculovirus tendem a ficar cada vez mais claras e respaldadas, permitindo que se faça inferências mais precisas e interpretações mais efetivas acerca da biologia, ecologia e do contexto evolutivo de baculovirus.

A configuração dessa árvore se assemelha àquela descrita pelo primeiro trabalho sobre LoobMNPV (Wolff et al., 2002), onde LoobMNPV também encontrava-se pertencente ao grupo I de Alphabaculovirus, porém, o agrupamento dos vírus pertencentes a esse grupo é divergente, e LoobMNPV agrupou-se com AmalNPV, um vírus que ainda não possui seu genoma completo disponível.

3.4. Comparações de LoobMNPV a outros *Alphabaculovirus*

Com o propósito de analisar a composição gênica, localização e a identidade das ORFs de LoobMNPV em relação aos *Alphabaculovirus* do grupo I, a tabela encontrada no anexo 3 foi construída, comparando todas as 134 ORFs de LoobMNPV aos genes ortólogos encontrados nos baculovirus mais filogeneticamente relacionados à LoobMNPV: *Autographa californica nucleopoliedrovirus* (AcMNPV), *Antheraea Pernyi nucleopoliedrovirus* (AnpeNPV), *Maruca vitrata nucleopoliedrovirus* (MaviNPV), *Dendrolimus kikuchii nucleopoliedrovirus* (DekiNPV) e *Thysanoplusia orichalcea nucleopoliedrovirus* (ThorNPV).

Das ORFs de LoobMNPV, 12 não apresentaram nenhuma similaridade à nenhuma ORF de baculovirus e foram consideradas únicas (LoobNPVOrf-4, LoobNPVOrf-6, LoobNPVOrf-12, LoobNPVOrf-35, LoobNPVOrf-38, LoobNPVOrf-55, LoobNPV Orf-59,

LoobNPVOrf-60, LoobNPVOrf-61, LoobNPVOrf-71, LoobNPVOrf-84, e LoobNPVOrf-97). No entanto, a maior parte, ou seja, 122 ORFs, apresentaram maior identidade a outras previamente descritas em outros baculovírus, e dentre essas, apenas três genes (LoobMNPVOrf-78, LoobMNPVOrf-102 (*he65*) e LoobMNPVOrf113) apresentaram maior identidade com ortólogos dos granulovírus *Pieris rapae granulovirus* (PrGV), *Agrotis segetum granulovirus* (AgseGV) e *Xestia c-nigrum granulovirus* (XcGV), respectivamente. Cabe ressaltar que na tabela do anexo 3, essas ORFs supracitadas não apresentam similaridade a nenhum dos genomas comparados, mas no entanto não são ORFs únicas, uma vez que apresentarem maior similaridade aos referidos granulovírus.

Igualmente, um mapa comparativo (figura 16) de LoobMNPV com os mesmos genomas da tabela do anexo 3 foi elaborado, com o intuito de ilustrar graficamente a localização e o grau de similaridade (dado em termos de percentual de identidade, considerando $E\text{-values} < 10^{-3}$) das ORFs de LoobMNPV em relação aos referidos genomas de comparação.

Nesse mapa comparativo, é possível perceber quais ORFs são mais conservadas entre os genomas, ou seja, com alto grau de similaridade, como é o caso dos genes *polh* (LoobMNPVOrf-1), *p74* (LoobMNPVOrf-10), *p49* (LoobMNPVOrf-14), *pif-1* (LoobMNPVOrf-41), *vlf-1* (LoobMNPVOrf-67), *lef-9* (LoobMNPVOrf-80), *lef-8* (LoobMNPVOrf-93), *gp64* (LoobMNPVOrf-28), *p33* (LoobMNPVOrf-54), *p47* (LoobMNPVOrf-105) e *pif-2* (LoobMNPVOrf-123). Por outro lado, é possível notar também ORFs mais variáveis, com menor similaridade, como os genes *ORF 1629* (LoobMNPVOrf-2), *ie-2* (LoobMNPVOrf-5), *ie-1* (LoobMNPVOrf-19), *vp80* (LoobMNPVOrf-43), *desmop* (LoobMNPVOrf-75), *f_protein* (LoobMNPVOrf-122), *arif-1* (LoobMNPVOrf-124), *lef-6* (LoobMNPVOrf-117) e *bv/odv-e26* (LoobMNPVOrf-128). Nota-se também as ORFs que não apresentam nenhum grau de similaridade com nenhuma das ORFs comparadas, sendo essas consideradas exclusivas de LoobMNPV, e novas dentre os baculovírus, conforme previamente citadas.

Do mesmo modo que é possível se observar na tabela anexa 3, nessa figura também observa-se que LoobMNPVOrf-78, LoobMNPVOrf-113 e *p6.9* (LoobMNPVOrf-47) não

apresentam similaridade aos genomas comparados, mas no entanto não são ORFs únicas, uma vez que elas são similares a outros baculovírus.



Figura 16. Mapa comparativo do genoma de LoobMNPV (o mais externo em cinza) em relação aos genomas AcMNPV, ThorMNPV, MaviMNPV, DekiNPV e AnpeNPV (respectivamente nessa ordem de dentro para fora). Conforme a legenda no canto inferior, quanto mais escuro o tom de azul, maior é a similaridade, baseada na identidade correspondente a ORF de LoobMNPV. As ORFs únicas de LoobMNPV estão representadas em vermelho no genoma de LoobMNPV, e as hrs em preto, no aro abaixo ao genoma de LoobMNPV. As posições dos nucleotídeos do genoma de LoobMNPV estão destacados na parte mais interna do círculo, em pares de bases.

Não obstante, foi realizada uma comparação capaz de se analisar a sintenia, bem como inversões e rearranjos genômicos no genoma de LoobMNPV quando comparado aos baculovírus AnpeNPV, MaviMNPV, ThorMNPV, AcMNPV e DekiNPV. A figura 17a ilustra um diagrama circular que apresenta essa relação, onde os referidos genomas de comparação se sobrepõem a LoobMNPV, de maneira que as linhas que saem de cada vírus (denominadas, do inglês *ribbons*) representam a posição, o tamanho e a orientação das ORFs nos elementos genômicos em relação à LoobMNPV.

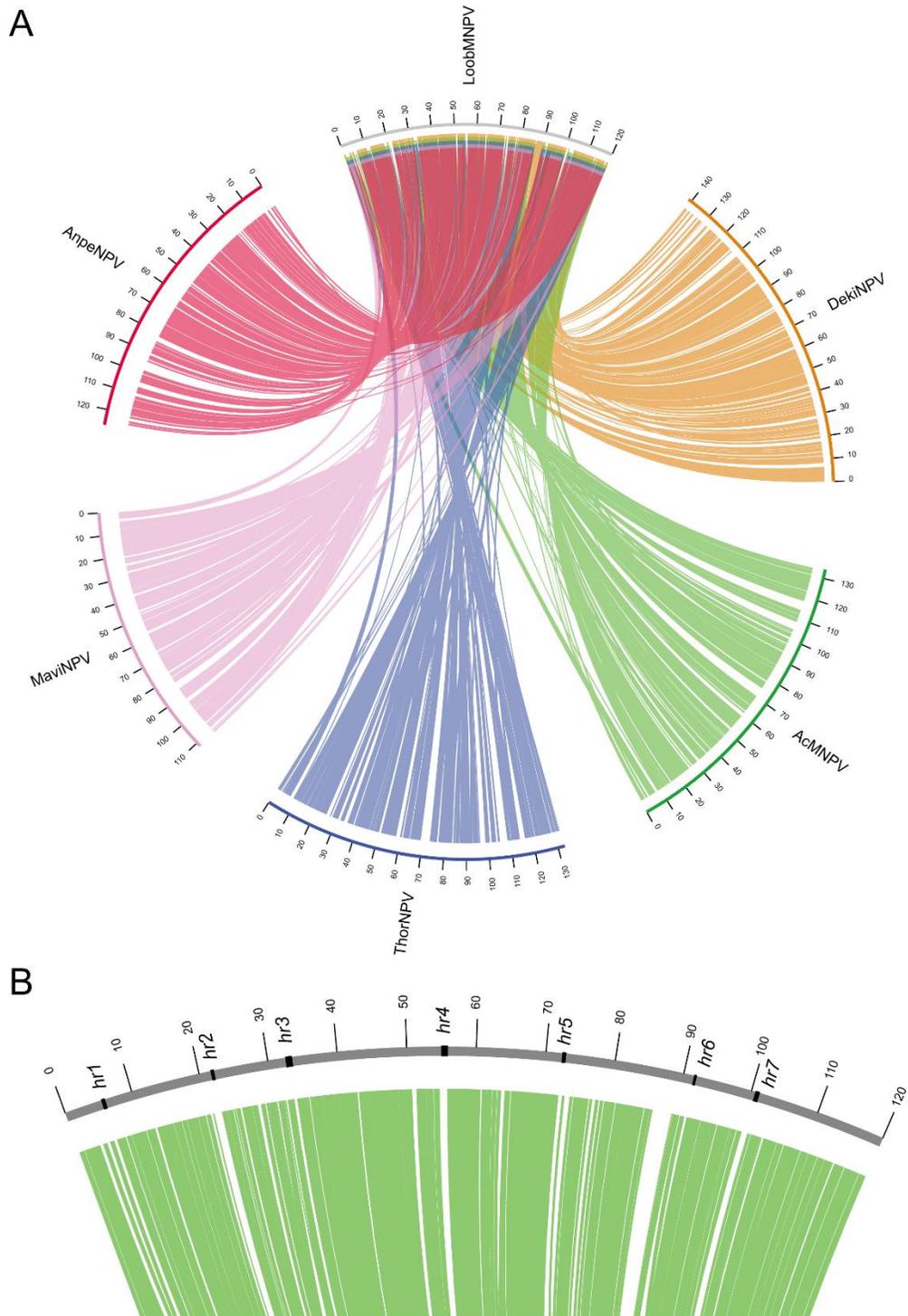


Figura 17. (a) Sintenia genômica de LoobMNPV em relação aos baculovirus AnpeNPV, MaviNPV, ThorMNPV, AcMNPV e DekiNPV), mostrando inversões e rearranjos gênicos de LoobMNPV em relação aos outros genomas (exceto DekiNPV) na porção central dos genomas, mantendo-se o bloco inicial constante. (b) Ampliação da região em que todos os genomas se sobrepõem, mostrando a localização das 7 hrs de LoobMNPV, que encontram-se próximas as ORFs únicas de LoobMNPV, indicando que hrs são possíveis sítios de inserção gênica.

Na figura 17a, é interessante observar que, apesar da grande colinearidade entre os genomas, LoobMNPV e DekiNPV possuem inversões genômicas em relação a AnpeNPV, MaviMNPV, ThorMNPV e AcMNPV. Essas inversões são caracterizadas pela manutenção constante das porções inicial dos genomas de LoobMNPV e DekiNPV, enquanto um bloco central apresenta uma grande inversão. Essa configuração corrobora com a filogenia previamente observada na figura 15, uma vez que LoobMNPV e DekiNPV possuem alto grau de sintenia e pertencem ao mesmo clado, sendo desse os únicos genomas. Portanto, é plausível supor que LoobMNPV e a DekiNPV possuem o mesmo ancestral comum e que essa inversão tenha ocorrido em alguma linhagem comum ao ancestral. Assim, essa inversão de DekiNPV e LoobMNPV pode ser considerada uma autapomorfia em relação ao grupo similar a AcMNPV (clado I), uma vez que é uma característica derivada (nova) que está presente exclusivamente nesse único clado terminal.

Estudos prévios relataram que tais rearranjos como esse refletem a história evolutiva em baculovírus, onde vírus com maior grau de ancestralidade possuem consequentemente um maior grau de colinearidade (Hu et al. 1998).

A fim de se observar a região de sobreposição de todos os genomas da figura 17a, uma ampliação desse local foi realizada (figura 17b). Os espaços brancos nessa região representam as ORFs de LoobMNPV que não possuem nenhuma correspondência com os genomas de comparação, ou seja, são exclusivas de LoobMNPV (ORFs únicas).

É interessante notar na figura 17b que essas ORFs únicas estão adjacentes ou estão sobrepostas a regiões de *hr*, e conforme relatado em estudos anteriores (Thumbi et al. 2013), rearranjos e aquisições gênicas são de comum ocorrência nas proximidades de *hrs* em alguns baculovírus. Isso possibilita a transferência e aquisição de novos genes entre vírus por meio de recombinação homóloga (Eveleigh et al. 2007; De Jong et al. 2005), que também é facilitada por fatores como múltiplas infecções no mesmo hospedeiro por diferentes patógenos (Eveleigh et al. 2007), bem como a infecções concomitantes em populações de campo (Kemp 2011).

3.5 . Análise das ORFs únicas encontradas em LoobMNPV

Das ORFs encontradas no genoma de LoobMNPV, 11 foram consideradas únicas, uma vez que, quando realizada as comparações por Blastp (Altschul et al. 1997), não apresentaram similaridade significativa a outras sequências, dentro dos parâmetros estabelecidos citados previamente ($E\text{-value} < 10^{-3}$). Conforme já mencionadas, essas ORFs são: LoobNPVOrf-4, LoobNPVOrf-6, LoobNPVOrf-12, LoobNPVOrf-35, LoobNPVOrf-38, LoobMNPVOrf-55, LoobMNPVOrf-59, LoobNPVOrf-61, LoobNPVOrf-71, LoobNPVOrf-84 e LoobMNPVOrf-97.

Essas ORFs podem ter sido adquiridas por três mecanismos distintos de aquisição de genes: grande divergência de sequência, que poderia empurrar genes homólogos para limiares de similaridade inferiores aos comparados; recombinação entre os genes, que produz novas proteínas; e transferência horizontal de genes (do inglês *horizontal gene transfer – HGT*), que é detectada por similaridade de genes a partir de espécies filogeneticamente distintas (Mclysaght, Baldi e Gaut 2003).

Motivos de promotores conhecidos foram também procurados para cada uma dessas ORFs únicas, a partir de 200 pb a montante do códon de iniciação de cada ORF. Promotores precoces, incluindo as sequências TATA *box* canônicas (Kogan et al. 1995), seguidas da sequência iniciadora CAGT localizada de 20–40 nucleotídeos a jusante (Blissard et al. 1992; Pullen e Friesen 1995) foram encontradas em LoobNPVOrf-4, 12, 35, 71 e 97. LoobNPVOrf-60 possui apenas a sequência iniciadora CAGT. O promotor tardio TAAG, que é necessário para transcrição tardia pela RNA polimerase viral (Garrity et al. 1997), e foi encontrado em LoobNPVOrf-4, 12, 30, 38, 55, e 71. No entanto, mais experimentos são necessários para determinar se essas ORFs são expressas em diferentes fases de expressão viral e se codificam proteínas genuínas.

Além disso, buscas por motivos proteicos conservados foram realizadas, e LoobNPVOrf-4, 6, 12, 38, 55, 61 e 71 não apresentaram similaridade a nenhum domínio previamente predito.

3.5.1. ORFs únicas que contêm peptídeos sinal e região transmembrana

LoobNPVOrf-59 codifica uma proteína que provavelmente é secretada pois contém peptídeo sinal. Em geral, proteínas virais que possuem esses domínios são sintetizadas no retículo endoplasmático (ER), sofrendo diversas modificações pós-traducionais. Essas proteínas estão envolvidas em ligação a receptores do hospedeiro, mediação de fusão de membrana e penetração na célula, direcionamento da morfogênese viral até o sítio de brotamento (no caso de vírus envelopados como os baculovirus), atuação como antígenos que neutralizam anticorpos, e até mesmo com atividade de transporte, agindo como canal iônico (Doms et al. 1993).

LoobNPVOrf-84 apresenta regiões transmembrana, e pode estar envolvida na interação do vírus com a superfície da membrana plasmática do hospedeiro, mediando o acoplamento do vírus ao receptor do hospedeiro, ou até mesmo permitindo uma fusão celular pH-dependente mediada por glicoproteínas de fusão celular e endocitose (Romanowski & Matsuura, 1985)

3.5.2. ORF única relacionada ao sistema imune

LoobNPVOrf-60 possui um domínio que corresponde a um similar de imunoglobulina (do inglês *Ig-like* ou *Immunoglobulin-like molecules*). Outras proteínas de inseto com esse domínio já foram relatadas na literatura, como a *hemolina*, um componente da hemolinfa que participa de processos como ligação à superfície de bactérias e formação de complexos proteicos que iniciam respostas imunes do hospedeiro (Zingemagel et al. 1990). A *hemolina* também foi encontrada em transcritos obtidos a partir das cerdas de *L. obliqua* (Carrijo-Carvalho & Chudzinski-Tavassi 2007).

Diversos imuno-moduladores codificados por vírus já foram descritos (Spriggs 1996), e podem estar envolvidos na regulação do sistema imune, protegendo células infectadas pelo vírus contra o ataque de outras células do sistema imune (Barnes e Grundy 1992; Beersma et al. 1993).

Para vírus, a expressão de proteínas relacionadas ao sistema imune pode indicar uma susceptibilidade direcionada em infecções por múltiplos patógenos, como uma maneira de

proteger o hospedeiro contra patógenos oportunistas, reduzindo a competição e consequentemente beneficiando a propagação viral (Ardisson-Araujo et al. 2015).

3.5.3. ORF única relacionada a fator de terminação de transcrição

LoobNPVOrf-35 apresentou uma interessante e alta similaridade com um fator de transcrição de eucarioto (do inglês *transcription terminator factor 2 – TTF2*) da lepidóptera *Danaus plexippus* (GenBank: EBJ68439.1), revelando 44% de identidade e um *E-value* de $3e10^{-11}$. No entanto, após filtrar esse resultado focando apenas na família *Baculoviridae*, o referido gene apresentou alta similaridade ao gene trans-ativador global (do inglês *Global Transactivator-GTA*) do baculovírus AnpeNPV, com de 66% identidade e um *E-value* de $1e10^{-6}$.

Primeiramente, é interessante que se compreenda o significado dos valores gerados pelo Blastp, conforme o próprio NCBI (Geer et al. 2010). O *E-value*, (do inglês *Expectation value*) representa o valor estatístico baseado na probabilidade calculada a partir da qualidade do alinhamento (*score*) e o tamanho do banco de dados. Vale lembrar que *score* é a nota atribuída pelo algoritmo do alinhamento, com base nas nos pareamentos perfeitos (*matches*) e nos imperfeitos (*mismatches*) entre a sequência de entrada e a sequência do banco de dados. Ou seja, quanto menor for o valor de *E-value*, mais significativo é o *score* e o alinhamento. Por outro lado, quanto ao valor de identidade também observado nos resultados gerados acima, esse refere-se ao percentual em que as sequencias comparadas possuem os mesmos resíduos de amino ácidos (ou nucleotídeos) na mesma posição do alinhamento.

Nesse sentido, observou-se que o *E-value* do alinhamento de LoobNPVOrf-35 e do TTF2 de *Danaus plexippus* possui um valor menor, ou seja, mais significativo que o *E-value* do alinhamento de LoobNPVOrf-35 e o GTA de AnpeNPV, enquanto o valor de identidade foi o oposto, melhor para o alinhamento de LoobMNPVOrf-36 com GTA de AnpeNPV, do que com TTF2 de *Danaus plexippus*.

Dessa forma, decidiu-se aprofundar a busca, no sentido de se discutir qual seria a origem de LoobNPVOrf-35, se oriunda do hospedeiro lepidóptero, a partir de HGT, ou se é uma variação do gene já existente em baculovírus.

Para contextualizar, fatores de transcrição (do inglês *transcription factors -Tfs*) em geral são fundamentais em um amplo conjunto de processos de desenvolvimento, devido a

sua habilidade de causar diversas mudanças no padrão de expressão de genes a jusante (Weatherbee et al. 1999). Mais especificamente, o Fator de Terminação de Transcrição 2 (do inglês *Transcription Terminator Factor 2*), está envolvido em liberar os transcritos de RNA do complexo de alongação da RNA polimerase II (Liu, Xie, & Price 1998), consequentemente funcionando como um regulador negativo de transcrição, uma vez que ele faz com que os complexos de alongação sejam terminados mais cedo (Xie & Price 1997).

Os genes GTA estão presentes em membros do grupo I de *Alphabaculovirus*, e conforme estudos prévios (Hughes & Friedman 2003), o GTA possui um papel importante na ativação transcricional de genes virais e provavelmente foi originado do hospedeiro, por HGT, a partir do ancestral comum ao clado que inclui os baculovirus AcMNPV, BmMNPV, OpMNPV, e EpMNPV. Katsuma et al. (2008) propuseram que um homólogo a GTA de BmMNPV age como um fator de virulência em larvas de inseto, e pode ser requerido para a ativação de genes do hospedeiro e/ou e genes virais, acelerando assim, o tempo de morte das lagartas hospedeiras.

Baseado em análises do domínio, foi analisado nesse trabalho que LoobNPVOrf-35 os genes TTF2 e os genes GTA são todos membros da família SNF2. Essa família contém proteínas com sequências similares às aquelas encontradas em muitas famílias de proteínas de DNA e RNA helicase, e também em diversas proteínas envolvidas em processos celulares como regulação da transcrição, recombinação de DNA, desenovelamento de cromatina e vários outros tipos de reparo de DNA (Eisen, Sweder & Hanawalt 1995).

Nesse sentido, é possível que a aquisição de LoobNPVOrf-35 no contexto genômico do vírus possa estar relacionada com a interferência causada por esse gene na maquinaria transcricional do hospedeiro, levando a um consequente benefício da própria transcrição viral, por mecanismos de indução da transcrição viral, ou até mesmo inibição da transcrição do hospedeiro.

Entretanto, sabe-se que baculovírus possuem longos transcritos de mRNA (Chen et al. 2013), e outra hipótese seria a de que a possível aquisição dessa ORF poderia estar relacionada a inibição desses longos transcritos, através da terminação precoce dos complexos de alongação de mRNA, com o propósito de acelerar a infecção e também atuar em outros genes do hospedeiro no início da infecção viral

3.5.3.1. Análise Filogenética de LoobMNPVOrf-35, e genes TTF2 e GTA

Para verificar se a LoobNPVOrf-35 foi independentemente adquirida pelo vírus a partir do hospedeiro, por meio de HGT, ou se essa ORF é uma variação divergente do gene GTA presente em *Alphabaculovirus* do grupo I, com o mesmo ancestral comum, análises filogenéticas foram realizada (figura 18). Uma árvore filogenética foi construída a partir de um conjunto de dados composto por todos os genes TTF2 que atingiram os melhores valores de identidade e *E-value* de organismos eucariotos (incluindo Insecta, que demonstrou ter os melhores valores), bem como todos os genes de GTA presentes em vírus do *Alphabaculovirus* grupo I (anexo 2).

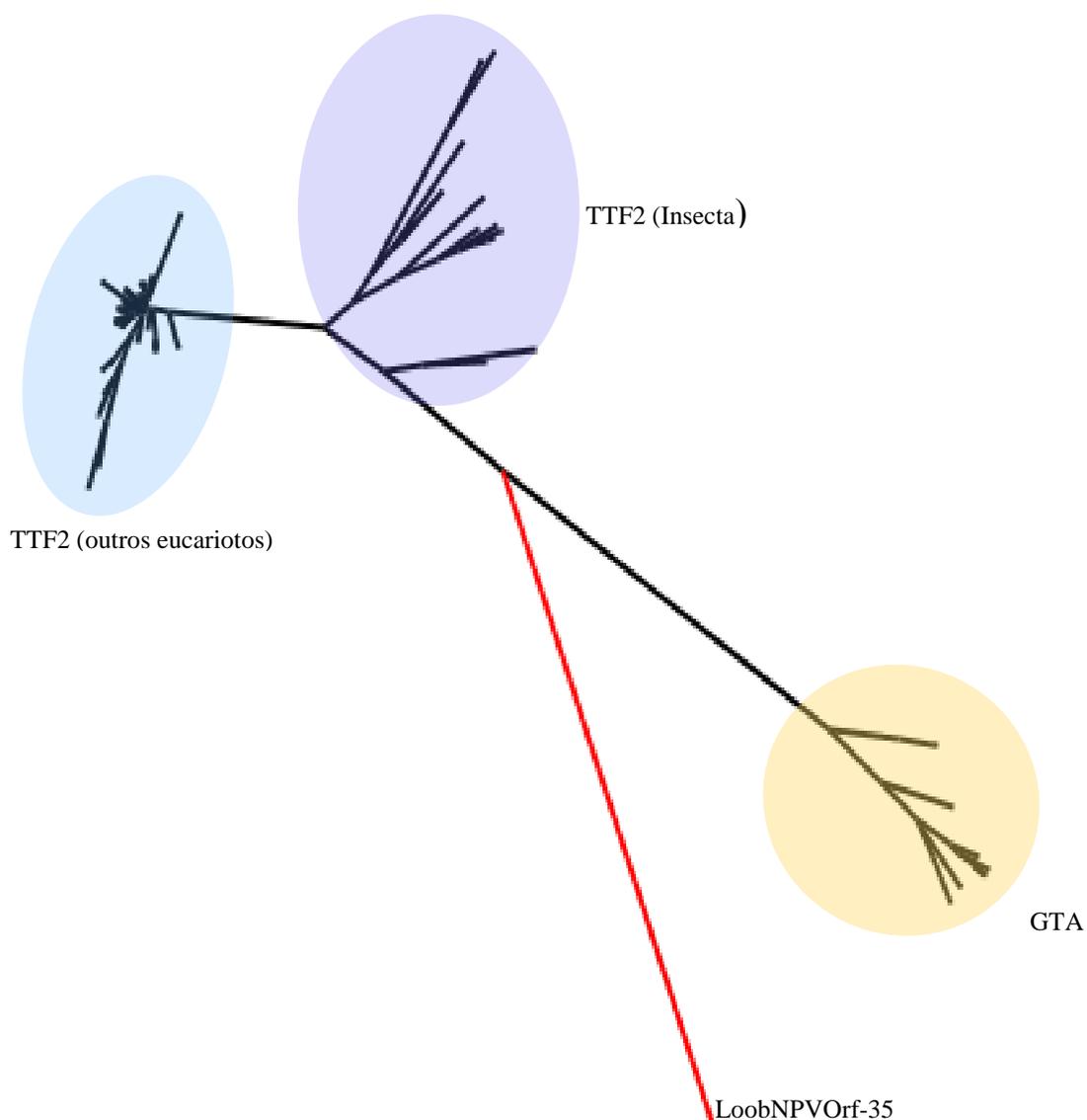


Figura 18. Filogenia por máxima verossimilhança de LoobNPVOrf-35 com os genes TTF2 e GTA, conforme banco de dados do anexo 2. Os genes TTF2 da classe Insecta estão sombreados em azul escuro, os genes TTF2

de outros eucariotos estão sombreados em azul claro e os genes GTA estão sombreados em bege. LoobNPVOrf-35 está destacado com o ramo vermelho.

Conforme a árvore acima apresentada, LoobMNPVOrf-35 possui um longo tamanho de ramo, que indica que essa sequência é divergente das outras sequências a ele comparadas. Isso pode significar que esse gene tenha acumulado diversas mutações únicas ao longo de sua sequência, por influência de deriva genética ou por seleção divergente atuante nesse gene.

Essa característica de longo ramo descrita acima pode estar relacionada a natureza da sequência, que teve que evoluir rapidamente para que continuasse mantida no contexto evolutivo do vírus, sendo resultado de seleção positiva. Seleção positiva, é por sua vez, um evento evolutivo influenciado por novos mutantes produzidos, que possuem maior valor adaptativo (*fitness*) que a média da população, com tendências a se ter elevação das frequências nas futuras gerações (Suzuki & Gojobori 1999).

Não obstante, Nickel et al. (2008) observaram que, em geral, TFs estão bem representados dentre os genes que são preditos a se submeterem a seleção positiva, evidência que corrobora com esse cenário.

Por outro lado, uma segunda hipótese à essa filogenia apresentada seria um problema filogenético denominado “atração de ramificações longa” (do inglês *Long Branch Attraction*) (Gribaldo & Philippe 2002), que é um artefato que ocorre devido à alta e rápida frequência de mudanças independentes naquele ramo, afetando o verdadeiro sinal filogenético e fazendo com que a relação filogenética pareça ser mais próxima do que ela realmente.

No entanto, cabe ressaltar que a árvore foi realizada pelo método de Máxima Verossimilhança, que é um dos melhores para se desenhar filogenias corretas e com suporte estatístico mais robusto, quando comparado aos métodos de parcimônia, que geralmente são os mais afetados pelo efeito de atração de ramificações longa (Zvelebi & Baum 2008).

3.5.3.2. Teste de hipótese para a origem de LoobMNPVOrf-35

Em vista às distintas possibilidades da origem do gene LoobNPVOrf-35 analisadas na árvore filogenética observada na figura 18, buscou-se embasamento estatístico que pudesse levar a uma hipótese mais conclusiva sobre o fato observado. Assim, utilizou-se um método estatístico alternativo ao teste de hipóteses clássico, que utiliza a estatística Bayesiana

por meio do Fator de Bayes (Goodman & Bayes, 1999; Kass et al. 2007) , que é baseado na seguinte fórmula:

$$\text{Probabilidade a priori da hipótese nula} \times \text{Fator de Bayes} = \text{Probabilidade posterior da hipótese nula}$$

$$\text{Onde Fator de Bayes} = \frac{\text{Probabilidade (dado da hipótese nula)}}{\text{Probabilidade (dado da hipótese alternativa)}}$$

Sabe-se que se o fator de Bayes entre 1-3, significa que a força da evidência contra a hipótese nula é fraca, enquanto que quando é entre 3-20 a força da evidência contra a hipótese nula é moderada, e entre 20-150 a força da evidência contra hipótese nula é forte, e quando é maior que 150, a força da evidência contra a hipótese nula é muito forte (Goodman e Bayes 1999).

Desse modo, para se analisar a quais restrições (*constraints*) de melhor significância LoobNPVOrf-35 ficaria submetido, se junto aos genes GTA ou aos genes TTF2, considerou-se o *constraint* de GTA como hipótese alternativa 1 (H1), o *constraint* de TTF2 hipótese alternativa 2 (H2) e a hipótese nula (H0) sem nenhum *constraint*.

Obteve-se um resultado dado em valores de probabilidade marginal, onde para o *constraint* com GTA o valor foi de -14940.61, enquanto que com TTF2 foi de lnL= -1455.06, e a hipótese nula foi de lnL= -14953.00. Com esses valores, calculou-se o Fator de Bayes de acordo com a fórmula acima para H1(GTA), que foi de 12,39, ou seja, moderado contra a hipótese nula; e para H2 (TTF2), que foi de 2,06 (fraco contra a hipótese nula). Com base nesses resultados, observou-se que é mais provável que LoobNPVOrf-35 esteja mais próximo ao grupo oriundo de TTF2, e que portanto, essa ORF foi adquirida por HGT.

3.5.1.3. Análise da estrutura secundária do alinhamento de LoobMNPVOrf-35, TTF2 e GTA.

A visualização de sequências por meio de alinhamentos permite uma análise mais pontual quanto aos detalhes relacionados às regiões conservadas, regiões não-conservadas, mutações, inserções, dentre outras peculiaridades.

Dessa forma, um alinhamento múltiplo apresentando estruturas secundárias foi realizado conforme a figura 19, contendo LoobNPVORF-35 e genes GTA e TTF2. A

predição das estruturas secundárias foi realizada com base em cristais previamente descritos que possuíam a maior similaridade com LoobNPVOrf-35, que também fizeram parte do alinhamento. Esses cristais Chd1 (código do Protein Data Bank : 3mwy (Hauk et al.2010)) e SWI2/SNF2 (código do Protein Data Bank: 1z63(Durr et al. 2005)) estão envolvidos no remodelamento da cromatina, regulando esse processo que é dependente da atividade da enzima ATPase.

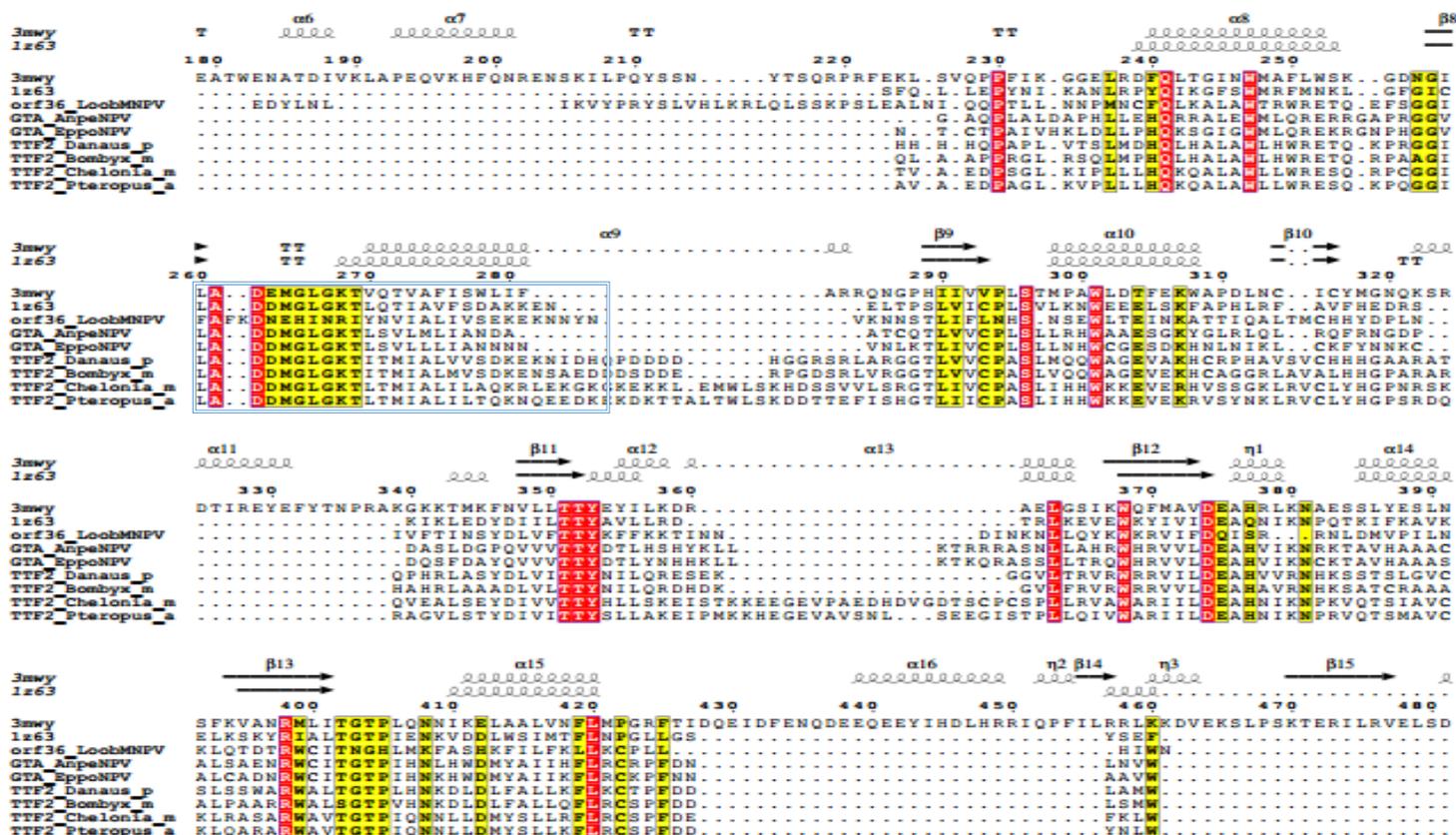


Figura 19. Alinhamento múltiplo feito com sequencias de aminoácidos, apresentando estrutura secundária de LoobNPVOrf-35 com base nos dois cristais mais semelhantes a essa ORF (3mwy (Hauk et al.2010) e 1z63(Durr et al.r 2005)), alinhados a genes de GTA de AnpeNPV e EppoMPV e os genes TTF2 de *Danaus plexippus*, *Bombyx mori*, *Chelonia mydas* e *Pterotopus alecto*. O destaque do retângulo azul indica região de alinhamento conservada dentre todas as sequencias, mas que demonstra que LoobNPVOrf-35, apesar de possuir o mesmo domínio SNF2 que GTA e TTF2, ainda assim é bem divergente. As cores representam regiões de maior nível de similaridade proteica, sendo vermelho identidade estrita, e amarelo similaridade. Diversas estruturas secundárias em alfa hélice (α) e folha beta (β) demonstram-se conservadas no alinhamento.

Assim, com base nas análises do alinhamento acima apresentado, é interessante notar que existem diversas estruturas secundárias de folha beta e alfa hélice conservadas e em comum à todas as sequencias, indicando similaridade dessas sequencias devido a presença do mesmo domínio conservado SNF2 comum a todas elas. No entanto, em relação a região

destacada no retângulo azul, uma região de alta conservação entre as sequências, é notável que LoobNPVOrf-35 muito diverge das outras sequências alinhadas, o que torna provável que essa ORF de LoobMNPV esteja associado a outra origem.

Além disso, com base em uma reconstrução da relação de evolução entre genes que foram potencialmente adquiridos por HGT, comparados a uma filogenia da família *Baculoviridae*, Hughes & Friedman (2003) relataram que baculovírus que possuem genes da família SNF2, possuem também ortólogos em organismos celulares e agrupam-se próximo a insetos (*Drosophila*), corroborando com a possível hipótese que LoobNPVOrf-35 foi originado por HGT, a partir de um gene que codifica uma proteína oriunda do inseto hospedeiro desse vírus.

3.5.1.4. Análise do contexto gênico de LoobMNPVOrf-35 em relação à *Alphabaculovirus* grupo I

Em relação ao contexto gênico ao qual está inserido o gene GTA (figura 20), que por sua vez é encontrado em membros pertencentes ao grupo I de *Alphabaculovirus* (exceto em MaviNPV, LoobMNPV e DekiNPV), foi analisado que sua localização é bem conservada dentro desse grupo, estando sempre localizada entre os genes *lef-12* e *odv-e66*. Cabe ressaltar que todos esses que não contêm o GTA estão filogeneticamente próximos, conforme observa-se na árvore filogenética (figura 20).

Em LoobMNPV, o gene localizado entre esses dois genes é LoobNPVOrf-105, que corresponde a *Ac-like* Orf-44. Por outro lado, LoobNPVOrf-35 está inserido em um contexto gênico completamente diferente, localizado entre LoobNPVOrf-34 (*Ac-like* Orf-110) e LoobNPVOrf-36 (*Ac-like* Orf-111). Essa análise nos permite inferir que LoobNPVOrf-35 possui uma origem diferente, não relacionada ao gene GTA, ou que houve algum rearranjo que alterou a sintenia desse bloco gênico.

Foi observado também que o gene da *p47* é bem conservado em sua posição, e está presente em todos os genomas de *Alphabaculovirus* grupo I, uma vez que é um *core gene*. No entanto, as ORFs similares a *Ac-like* Orf 43, *Ac-like* Orf 44 (em LoobMNPV, ORFs 103 e 102, respectivamente) e *Ac-like* Orf 45 são bem variáveis quanto a sua posição nos genomas, estando presente em alguns e ausente em outros. Ainda, a orientação de GTA

acompanha a orientação de *lef-12* e *Ac-like* Orf 43, *Ac-like* Orf 44 e *odv-e56* (se presente).

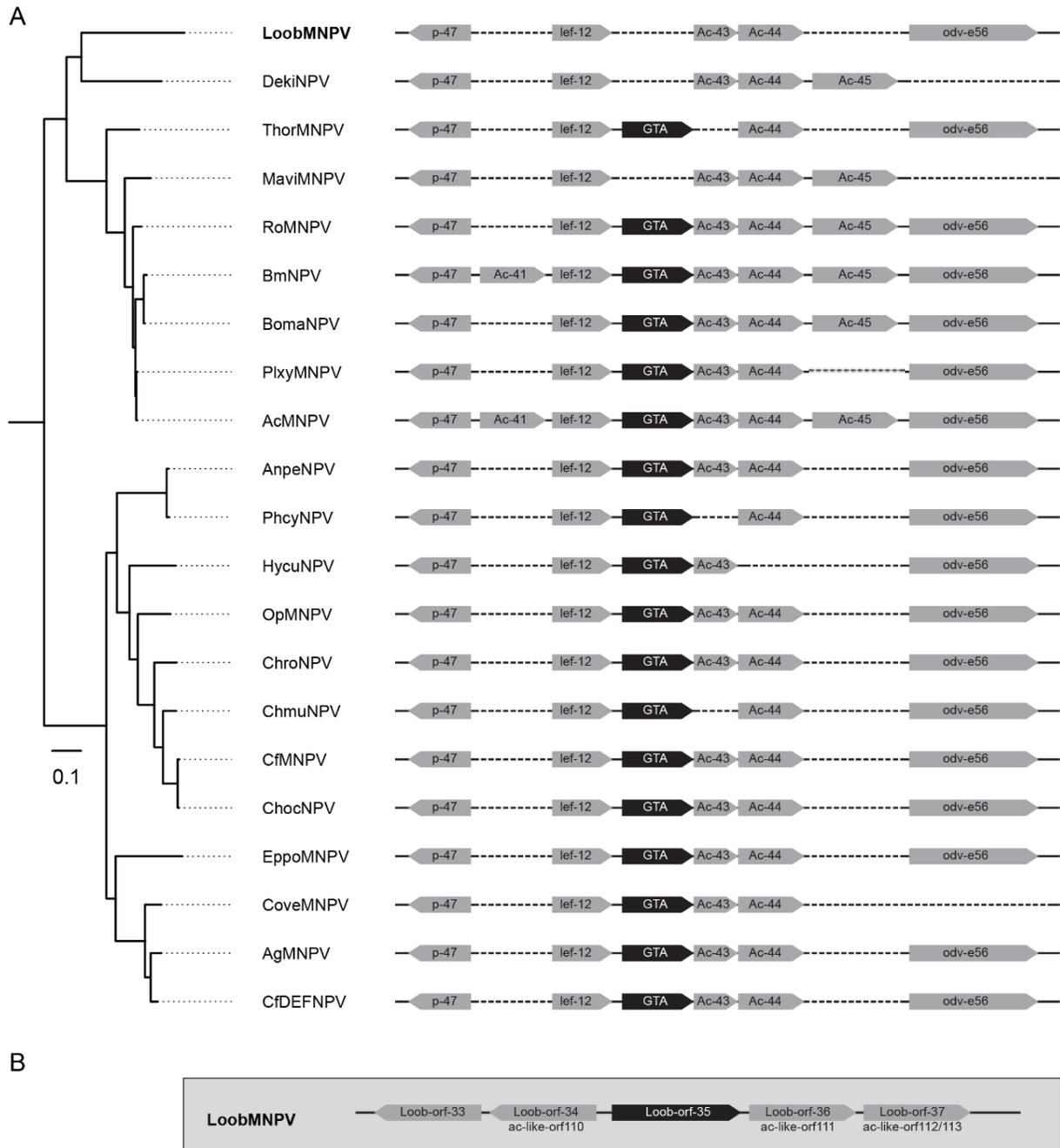


Figura 20. Contexto gênico do gene GTA presente nos membros de *Alphabaculovirus* grupo I, alinhado à filogenia previamente apresentada na figura 15, comparado ao contexto gênico de LoobNPVOrf-35. (a) Os contextos gênicos de AcMNPV, AgMNPV, AnpeNPV, BmNPV, BomaNPV, CfMNPV, ChoocMNPV, ChmuNPV, ChronPV, DekiNPV, EppoNPV, HycuNPV, LoobMNPV, MaviMNPV, OpMNPV, PhycyMNPV, PlxyMNPV, RoMNPV e ThorMNPV possuem o gene GTA sempre entre *p-47*, *lef-12* e *odv-e56*, com a presença ou ausência de algumas ORFs como *Ac-like* Orf 41, *Ac-like* Orf 43, *Ac-like* Orf 44 e *Ac-like* Orf 45. LoobMNPV, DekiNPV e MaviNPV são os únicos que não possuem o gene GTA. As linhas tracejadas indicam

a ausência de ORF. (b) Posição de LoobNPVOrf-35 no contexto do genoma de LoobMNPV, localizada entre LoobNPVOrf-34 (*Ac-like* Orf-110) e LoobNPVOrf-36 (*Ac-like* Orf-111).

3.5.1.5. Conclusões sobre LoobMNPVOrf-35

Diante o exposto, sugere-se duas hipóteses para a origem de LoobMNPVOrf-35: a primeira que ele tenha sofrido pressões seletivas que levaram a uma variação do gene GTA; ou pode-se se tratar de uma aquisição independente a partir do hospedeiro, mecanismo já conhecido, como é o caso de genes como a *interleucina-10*, que foi capturada do hospedeiro de forma independente por diferentes vírus de DNA, em pelo menos três eventos evolutivos diferentes (Hughes & Friedman 2003).

Pelas análises realizadas nesse trabalho, LoobMNPVOrf-35 mostrou-se provavelmente ter sido adquirido a partir da segunda hipótese, ou seja, por transferência horizontal de genes do hospedeiro para o vírus. No entanto, em ambos os casos, para que se possa investigar mais precisamente a origem desse gene, seria necessário a realização de sequenciamentos de novos genomas de baculovirus pertencentes ao grupo I de *Alphabaculovirus*, buscando uma maior amostragem nesse grupo, com uma posterior reconstrução dessa filogenia, com intuito de entender quantos e quais eventos evolutivos originam esses novos genes.

Adicionalmente, visado analisar a função e o envolvimento dessa ORF no contexto viral, experimentos *in vitro* e *in vivo* são também necessários. Entretanto, um fator restritivo quanto a realização dessas análises está relacionada à ausência de uma cultura de células de inseto capaz de propagar esse vírus *in vitro*, assim como seu cultivo *in vivo* é também limitante, uma vez que essas lagartas são sensíveis às condições laboratoriais. Portanto, sistemas alternativos ainda devem ser explorados, para que nova linhagem viral possa ser analisada.

3.6. Peculiaridades do Genoma LoobMNPV

3.6.1. Ausência dos genes da *cathepsina* e *quitinase* no genoma de LoobMNPV

Curiosamente, LoobMNPV não codifica dois genes comumente encontrados em baculovírus, que são responsáveis pela melanização e liquefação do hospedeiro nas fases tardias da infecção: os genes codificadores das enzimas *cathepsina* e *quitinase* (Hawtin et al. 1997). Além do envolvimento desses genes no espalhamento horizontal de vírus no campo (Cory et al. 2013), foi também observado que a *cathepsina* e a *quitinase* interagem diretamente uma com a outra, apresentando uma interdependência na promoção da liquefação do hospedeiro em ambos os níveis temporal e espacial, e, portanto, em geral os seus genes são adquiridos e perdidos juntos (Hodgson, Arif, & Krell 2011).

É provável que os baculovírus que possuem esses genes o tenham obtido a partir do hospedeiro, como é o caso da *quitinase*, que participa na degradação de um componente do exoesqueleto de insetos, a quitina, uma estrutura rígida que é periodicamente reconstruída para possibilitar o crescimento de larvas de inseto (Hawtin et al. 1997). Os genes da *quitinase* estão presentes nos baculovírus pertencentes aos NPVs dos Grupos I e II, bem como em vários genomas de GV. Em análises filogenéticas, a *quitinase* de vírus como AcMNPV (Ac Orf 126) e BmNPV (Bm Orf 103), são filogeneticamente agrupadas a várias *quitinases* oriundas de lepidópteros, como por exemplo, apresentando mais de 60% de identidade com a *quitinase* de *B. mori* (Fukamizo et al. 2011). Entretanto, dentre os *Alphabaculovirus* do grupo I, apenas LoobMNPV, *Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovírus* (AgMNPV) (Oliveira et al., 2006) e *Philosamia Cynthia nucleopoliedrovírus* (PhcyNPV) (Qian et al., 2013) não possuem os genes da *cathepsina* e *quitinase*. Para AgMNPV, entretanto, estudos demonstraram que a introdução recombinante do gene da *cathepsina* (*v-cath*) e *quitinase* (*chiA*) em seu genoma resulta em uma melhora de sua atividade inseticida no combate à larvas de *A. gemmatalis*, resgatando a liquefação com consequente aumento da dispersão viral (Lima et al. 2013).

Por conseguinte, conforme Lemaire (2002), é geralmente observado o hábito gregário, caracterizado pela aglomeração de centenas de indivíduos, formando manchas escuras em troncos ou galhos de árvores frutíferas, em lagartas da família Saturniidae, como *L. obliqua* e *P. cynthia*, bem como em lagartas da família Noctuidae, como *A. gemmatalis*,

que no entanto, são consideradas um estágio transitório da evolução de polifenismo de fase, uma vez que suas agregações variam de acordo com a densidade de suas populações (Silva et al. 2013).

Portanto, supõe-se que a ausência desses genes pode estar relacionada gregários, caracterizado por apresentarem alterações de características fenotípicas, incluindo cor, morfologia, ontogenia, comportamento e até resistência a patógenos (Lee, Simpson, & Raubenheimer 2004; Reeson 2001). Desse modo, uma vez que lagartas gregárias permanecem em aglomerados, o vírus pode ser facilmente espalhado entre elas, sem a necessidade de nenhum mecanismo para alavancar seu espalhamento, o que poderia gerar a consequente perda desses genes no contexto desse vírus.

Essas observações nos permitem concluir que ambos os genes são provavelmente não essenciais para a persistência dos baculovírus no ambiente, uma vez que outros mecanismos de persistência baseados nos hábitos do hospedeiro também já foram previamente observados (Ardisson-Araújo et al. 2014).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse é o primeiro trabalho que descreve o genoma completo de um baculovírus, isolado a partir de uma lagarta de interesse médico. Baseado na análise genômica e filogenética realizada, o vírus LoobMNPV, objeto de estudo dessa pesquisa, encontra-se localizado em *Alphabaculovirus* grupo I. Esse dado encontra-se em concordância a estudos prévios de caracterização desse vírus (Wolff et al. 2002) em relação ao grupo, mas não é condizente quanto a sua localização no clado, uma vez que LoobMNPV é um clado irmão ao clado dos genomas similares a AcMNPV. Nesse contexto, esse genoma apresentou-se muito divergente, com diversas inversões e rearranjos genômicos quando comparado aos outros genomas desse grupo, provavelmente devido à grande escala de fluxo gênico que ele foi submetido.

Ademais, algumas ORFs de LoobMNPV foram possivelmente adquiridas por meio de transferência horizontal de genes (HGT), como LoobMNPVOrf-35, que revelou ser um fator terminador de transcrição possivelmente envolvido na interferência da maquinaria transcricional do hospedeiro, ou envolvido em interferir no DNA do próprio vírus,

promovendo a transcrição a fim de beneficiar tradução viral e conseqüentemente, a sua propagação no interior da célula.

LoobMNPV apresentou ausência dos genes da *cathepsina* e *quitinase*, que por sua vez estão presentes em quase todos os genomas de *Alphabaculovirus* do grupo I. Essa perda é provavelmente devido a aspectos relacionados ao comportamento gregário observado em lagartas de *L. obliqua*, que faz com que o vírus não necessite de estratégias e mecanismos para se espalhar no ambiente, uma vez que as lagartas já estão agrupadas.

Dessa forma, a elucidação do genoma completo de LoobMNPV poderá beneficiar estudos relacionados ao controle biológico das crescentes populações da larva *L. obliqua*, conseqüentemente evitando acidentes em humanos, bem como proporcionará mais dados a serem utilizados nos estudos sobre a evolução e a biologia de baculovirus como um todo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(“Baculovirus”. In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a Enciclopédia Livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível Em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/Baculovirus#mediaviewer/File:Npv-Lebenszyklus.jpg>>. Acesso Em: 28 Fev. 2015). (n.d.).

(Lonomia obliqua. In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lonomia-obliqua-citsc-2.jpg?uselang=pt-br>>. Acesso em: 28 fev. 2015. (n.d.).

Abella, H.B, M.G.B. Marques, K.R.L.M. Silva, M.G. Rossoni, J. B. T. (2006). Acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* registrados no Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul no período de 1997 a 2005. In A. Nicolella (Ed.), *Toxicovigilância – toxicologia clínica: dados e indicadores selecionados*. (pp. 29–34). Porto Alegre.

Abella, H.B., Ramos, C.J, Marques, M.G., Boff, G.J., Torres, J.B., Nicolella, A. D. R. (1999). Acidentes por larvas de lepidópteros do gênero *Lonomia* no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Toxicol.*, 2, 81–173.

Adams, J. R., and McClintock, J. T. (1991). Baculoviridae, nuclear polyhedrosis viruses Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In J. R. A. and J. R. Bonami (Ed.), *Atlas of Invertebrate Viruses* (pp. Chapter 6, 87–180). CRC Press, Boca Raton.

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. a, Moser, B. a, Becnel, J. J., ... Kutish, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology*, 75(22), 11157–11165. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11157>
- Akermann, H.-W. and W. A. S. (1983). A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, (41), 269–280.61–88.
- Alexander, J. O. (1984). *Arthropods and Human Skin* (pp. 177–97). Berlin: Springer Verlag-Heidelberg.
- Altschul, S. F., Gish, W., Pennsylvania, T., & Park, U. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, (215), 403–410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, a a, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–402. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Alvarez-Flores, M.P., Fritzen, M., Reis, C.V., Chudzinski-Tavassi, A. M. (2006). Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (343), 1216–1223.
- Ana, S., Miele, B., Garavaglia, J., Nicol, M., & Ghiringhelli, P. D. (2011). Baculovirus : Molecular Insights on Their Diversity and Conservation, 2011. <http://doi.org/10.4061/2011/379424>
- Aran, R. H. B., & Hanseok, K. O. (2008). Detecting Horizontally Transferred and Essential Genes Based on Dinucleotide Relative Abundance. *DNA Research*, (15), 267–276.
- Ardisson-Araújo, D. M. P., de Melo, F. L., Andrade, M. D. S., Sihler, W., Bão, S. N., Ribeiro, B. M., & de Souza, M. L. (2014). Genome sequence of *Erinnyis ello* granulovirus (ErelGV), a natural cassava hornworm pesticide and the first sequenced sphingid-infecting betabaculovirus. *BMC Genomics*, 15, 856. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-856>
- Ardisson-Araujo, D. M. P., Rohrmann, G. F., Ribeiro, B. M., & Clem, R. (2015). Functional characterization of hesp018, a baculovirus-encoded serpin gene. *The Journal of General Virology*. <http://doi.org/10.1099/vir.0.000041>
- AROCHA-PIÑANGO, C. (1967). Fibrinolisis producida por contacto con orugas comunicacion preliminar. *Acta Cient. Venezolana*, (18), 136–139.

- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., & Possee, R. D. (1994). The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202(2), 586–605. <http://doi.org/10.1006/viro.1994.1380>
- Baculovirus. In: WIKIMEDIA COMMONS, WIKIPÉDIA, a Enciclopédia Livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível Em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Baculovirus#mediaviewer/File:Nucleopolyhedro_virus_german.png>. Acesso Em: 28 Fev. 2015). (n.d.).
- Baele, G., Lemey, P., & Vansteelandt, S. (2013). Make the most of your samples : Bayes factor estimators for high-dimensional models of sequence evolution. *BMC Genomics*, 14(85), 1–18.
- Barnes, P. D., & Grundy, J. E. (1992). Down-regulation of the class I HLA heterodimer and fl2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus, 2395–2403.
- Beersma, M.F., Bijlmakers, M.J., and Ploegh, H. L. (1993). Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J. Immunol.*, (151), 4455–4464.
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 573–580.
- Bergold, G. H. (1947). Die isolierung des polyeder-virus and die natur der polyeder. *Naturforsch*, 122– 143.
- Biomatters. (n.d.). Geneious version (7.1.6). Retrieved from <http://www.geneious.com/??>
- Blissard, G. W., & Rohrmann, G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*, 35(67), 127–55. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001015>
- Blissard, Gary W, Kogan, P. H., & Rohrmann, F. (1992). A Synthetic Early Promoter from a Baculovirus : Roles of the TATA Box and Conserved Start Site CAGT Sequence in Basal Levels of Transcription, 793, 783–793.
- Braunagel, S. C. and M. D. S. (2007). Molecular Biology of the Baculovirus Occlusion-Derived Virus Envelope. *Curr Drug Targets*,, 8, 1084–1095.
- Caovilla, J.J., Barros, E. J. (2004). Efficacy of two different doses of antilonomic serum in the resolution of hemorrhagic syndrome resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars: a randomized controlled trial. *Toxicon*, (43), 811–818.
- Cardoso, A. E. C., Haddad-Junior, V. (2005). Acidentes por Lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudo dos aspectos epidemiológicos , clínicos e terapêuticos *, 80(6), 571–578.

- Carrijo-Carvalho, L. C., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2007). The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(6), 741–57. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.033>
- Catarina, C. C. de I. T. de S. (2008). *Base de dados Estatística-Plataforma Epi-info*. 2008. Florianópolis.
- Chen, Y.-R., Wu, C.-Y., Lee, S.-T., Wu, Y.-J., Lo, C.-F., Tsai, M.-F., & Wang, C.-H. (2008). Genomic and host range studies of *Maruca vitrata* nucleopolyhedrovirus. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 9), 2315–30. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001412-0>
- Chen, Y.-R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J. Z., Zhang, S., & Blissard, G. W. (2013). The Transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Cells. *Journal of Virology*, 87(11), 6391–6405. <http://doi.org/10.1128/JVI.00194-13>
- Cheng, X. W., & Carner, G. R. (2000). Characterization of a single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Thysanoplusia orichalcea* L. (Lepidoptera: Noctuidae) from Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(4), 279–87. <http://doi.org/10.1006/jipa.2000.4933>
- Chor, B., & Tuller, T. (2005). Maximum likelihood of evolutionary trees: hardness and approximation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21 Suppl 1, i97–106. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>
- Cory, J. S., Myers, J. H., Myers, H., & Coryl, S. (2013). THE ECOLOGY AND EVOLUTION OF INSECT BACULOVIRUSES. *Annual Review of Ecology*, 34(2003), 239–272. <http://doi.org/10.1146/132402>
- Costa, R. (1994). Acidentes por Lagartas Venenosas. In *Venenos animais: uma visão integrada* (pp. 327–338). Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas.
- CRUZ, I. (2002). Manejo de lepidópteras-praga integrado de pragas. In *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores* (pp. 320–328). São Paulo: Manole.
- Derksen, A. C. G., and Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, (167), 242–250.
- DIDHAM, R.K., GHAZOUL, J., STORK, N.E. & DAVIS, A. J. (1996). Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends Ecol. Evol.*, 11(6), 255– 260. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)20047-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(96)20047-3)
- Donato, J.L., Moreno, R.A., Hyslop, S., Duarte, A., Antunes, E., Le Bonniec, B., & F., Rendu, F., de Nucci, G. (1998). *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human

- blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thromb. Haemost.*, (79), 539–542.
- Duarte, AC, Caovilla, J, Lorini, I, Lorini, D, Mantovani, G, S., & J, Manfre, PC, Ssilveira, RC, Moura, S. (1990). Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, (12), 184–186.
- Durr, H., Korner, C., Muller, M., Hickmann, V., Hopfner, K. P. (2005). X-ray structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF20052 ATPase core and its complex with DNA. *Cell(Cambridge, Mass.)*, 121, 363–373.
- Eisen, J. a, Sweder, K. S., & Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2715–23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=307096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Entwistle, P.F., P.H. Adams, and H. F. E. (1978). Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): the rate of passage of infective virus through the gut of birds during cage tests. *J Invertebr Pathol*, 31(3), 307–12.
- Falcon, L. A. and R. T. H. (1985). Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 45, 356–359.
- Fang, M., et al. (2009). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene ac96 encodes a per Os infectivity factor (PIF-4). *J Virol*, 83(23), 12569– 78.
- Federici, B. A. (1986). Ultrastructure of baculoviruses. In R. R. G. and B. A. Federici (Ed.), *The biology of baculoviruses* (pp. 61–88). CRC Press: Boca Raton.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, (39), 783–791.
- Freitas, A.V.L., Francini, R.B. & Brown, K. . (2003). Insetos como indicadores ambientais. (L. Cullen, R. Rudran & C. Valladares-Padua, orgs.). In *Métodos de estudo em Biologia da conservação e manejo da vida silvestre* (L. Cullen, R. Rudran & C. Valladares-Padua, orgs.) (pp. p.125–151.). UFPR.
- Friesen, P. D. (1997). Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. In *The Baculoviruses* (pp. 41–170). New York and London: Press, Plenum.
- Friesen, P. D., & Millert, L. K. (1987). Divergent Transcription of Early 35- and 94-Kilodalton Protein Genes Encoded by the HindIII K Genome Fragment of the *Baculovirus Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virust. *J Virol*, (July), 2264–2272.

- Fukamizo, T., Sato, H., Mizuhara, M., Ohnuma, T., Gotoh, T., Hiwatashi, K., & Takahashi, S. (2011). Chitinase from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus: rapid purification from Sf-9 medium and mode of action. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(9), 1763–9. <http://doi.org/10.1271/bbb.110300>
- Gamborgi, G.P., Metcalf, E.B., Barros, E. J. G. (2006). Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. *Toxicon*, (47), 68–74.
- Garavaglia, M. J., Miele, S. A. B., Iserte, J. A., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2012). The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. *Journal of Virology*, 86(22), 12069–79. <http://doi.org/10.1128/JVI.01873-12>
- Garrity, D. B., Chang, M., & Blissard, G. W. (1997). Late Promoter Selection in the Baculovirus gp64 Envelope Fusion Protein Gene, *181*(231), 167–181.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., ... Bryant, S. H. (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D492–6. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp858>
- Goley, E.D., et al. (2006). Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 314(5798), 464–7.
- Goodman, S. N., & Bayes, I. (1999). Toward Evidence-Based Medical Statistics. 2: The Bayes Factor. *Ann Intern Med*, 12(130), 1019–1021.
- Grant, J. R., & Stothard, P. (2008). The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W181–4. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn179>
- Gribaldo, S., & Philippe, H. (2002). Ancient Phylogenetic Relationships. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 391–408. <http://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1593>
- Guarino, L. A., Dong, W. E. N., Xu, B. I. N., Broussard, D. R., Davis, R. W., & Jarvis, D. L. (1992). Baculovirus Phosphoprotein pp31 Is Associated with Virogenic Stroma. *J Virol*, 66(12), 7113–7120.
- Guarino, L. A., & Summers, M. D. (1986). Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *J Virol*, 60(1), 215.
- Guindon S., G. O. (2003). PhyML: “A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.” *Systematic Biology*, 52(5), 696–704.

- Haddad Jr V, C. J., & Cardoso JLC, Wen FH, França FOS, M. C. (2003). Erucismo e Lepidopterismo. In *Animais peçonhentos no Brasil* (pp. 220–3). São Paulo: Sarvier.
- Hauk, G., McKnight, J.N., Nodelman, I.M., Bowman, G. D. (2010). The chromodomains of the Chd1 chromatin remodeler regulate DNA access to the ATPase motor. *Mol. Cell*, 39, 711–723.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. a, ... Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 238(2), 243–53. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8816>
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C., & Maeda, S. (1999). Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*, 262(2), 277–297.
- Hegedus, D., et al. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol*, (54), 285–302.
- Henrique, R., & Moraes, P. (2002). *Identificação dos inimigos naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) e possíveis fatores determinantes do aumento da sua população*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ-USP.
- HEPPNER, J. B. (1991). Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. *Trop. Lepid.*, 2(1), 1–85.
- Herniou, E. a, & Jehle, J. a. (2007). Baculovirus phylogeny and evolution. *Current Drug Targets*, 8(10), 1043–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979664>
- Herniou, E. a, Luque, T., Chen, X., Vlak, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S., & O'Reilly, D. R. (2001). Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology*, 75(17), 8117–8126. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.17.8117>
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., Reilly, D. R. O., & Cory, J. S. (2004). Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts, 78(7). <http://doi.org/10.1128/JVI.78.7.3244>
- Hodgson, J. J., Arif, B. M., & Krell, P. J. (2011). Interaction of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus cathepsin protease progenitor (proV-CATH) with insect baculovirus chitinase as a mechanism for proV-CATH cellular retention. *Journal of Virology*, 85(8), 3918–29. <http://doi.org/10.1128/JVI.02165-10>
- Hughes, A. L., & Friedman, R. (2003). Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculoviruses. *Molecular Biology and Evolution*, 20(6), 979–87. <http://doi.org/10.1093/molbev/msg107>

- Jehle, J. a, Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. a, Rohrmann, G. F., ... Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–66. <http://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Jiang, Y., et al. (2009). Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. *Virus Res*, 1-2(142), 85–91.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3), 275–282.
- Jorg ME. (1933). Nota prévia sobre el principio ativo urticante de Hylesia Nigricans (Lepidoptera, Hemileueidae) y las dermatitis provocadas por el miemo. *Reun Soc Argent Patol*, (8), 482–95.
- K Katoh, K Misawa, K Kuma, T. M. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30 (14), 3059–3066.
- Kass, R. E., & Raftery, A. E. (2007). Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association*,, 90(430), 773–795.
- Katsuma, S., Fujii, T., Kawaoka, S., & Shimada, T. (2008). Bombyx mori nucleopolyhedrovirus SNF2 global transactivator homologue (Bm33) enhances viral pathogenicity in B . mori larvae. *J Gen Virol*, 89, 3039–3046. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004887-0>
- Keddie, B. A., G. W. Aponte, and L. E. Volkman. 1989. The pathway of infection of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243: (n.d.), (243).
- Kelen EMA, Picarelli ZP, D. A. (1995). Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus Lonomia (Saturniidae, Hemileucinae). *J. Toxic - Toxin Rev.*, (14), 283–308.
- Kerfeld, C. a, & Scott, K. M. (2011). Using BLAST to teach “E-value-tionary” concepts. *PLoS Biology*, 9(2), e1001014. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001014>
- Kikhno, I., et al. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus. *J. Gen Virol.*, (83), 3013– 3022.
- King, L. A. & Possee, R. D. (1992). *The Baculovirus Expression Vector System: a Laboratory Guide*. (C. & Hall., Ed.). London.

- Kogan, P. H., Chen, X., & Blissard, G. W. (1995). Overlapping TATA-Dependent and TATA-Independent Early Promoter Activities in the Baculovirus gp64 envelope fusion protein Gene. *J Virol*, *69*(3), 1452–1461.
- Kost, T. A., Condreay, J. P. , Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, *23*, 567–575.
- Kowacs, P.A., Cardoso, J., Entres, M., Novak, E.M., Werneck, L. C. (2006). Fatal intracerebral hemorrhage secondary to *Lonomia obliqua* caterpillar envenoming, a case report. *Arq. Neuropsiquiatr.*, (. 64), 1030–1032.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., ... Marra, M. A. (2009). Circos : An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.*, *19*, 1639–1645. <http://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
- Kuzio, J., Pearson, M. N., Harwood, S. H., Funk, C. J., Evans, J. T., Slavicek, J. M., & Rohrmann, G. F. (1999). Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*, *253*(1), 17–34.
- Lange, M., & Jehle, J. a. (2003). The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. *Virology*, *317*(2), 220–236. [http://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00515-4](http://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00515-4)
- Lee, K. P., Simpson, S. J., & Raubenheimer, D. (2004). A comparison of nutrient regulation between solitary and gregarious phases of the specialist caterpillar, *Spodoptera exempta* (Walker). *Journal of Insect Physiology*, *50*(12), 1171–80. <http://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.10.009>
- Lemaire, C. (1972). Révision du genre *Lonomia* Walker (Lep. Attacidae). *Annaes de La Societe Entomologique Du France (N.S.)*, *8*(4), 767–861.
- LEMAIRE, C. (2002). The Saturniidae of America - Hemileucinae. (p. 1388p). Keltern, Goecke & Evers.
- Lima, A. A., Aragão, C. W. S., de Castro, M. E. B., Oliveira, J. V. D. C., Sosa Gómez, D. R., & Ribeiro, B. M. (2013). A recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV harboring *chiA* and *v-cath* genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity. *PLoS One*, *8*(9), e74592. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074592>
- Liu, M., Xie, Z., & Price, D. H. (1998). A Human RNA Polymerase II Transcription Termination Factor Is a SWI2/SNF2 Family Member. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(40), 25541–25544. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25541>
- Lodish HF. (2000). *Molecular cell biology* (4th ed.). New York: W.H. Freeman.

- Lorini, L. (1999). *A taturana - Aspectos Biológicos e Morfológicos da Lonomia obliqua*. EDIUPF - Passo Fundo- RS.
- LORINI, L. M. (2005). *Criação, Comportamento Sexual e Inimigos Naturais de Lonomia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae)*. Universidade Federal do Paraná.
- Lorini, L. M., Zarbin, P. H. G., & Tedesco, C. D. (2007). Biology of Laboratory-Reared Lonomia Obliqua (Lepidoptera: Saturniidae). *Florida Entomologist*, 90(4), 770–771. [http://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[770:BOLL0L\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[770:BOLL0L]2.0.CO;2)
- Lu, A., Miller, L. K. (1997). Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In L. K. Miller (Ed.), *In The Baculoviruses* (pp. 193–216). New York: Plenum.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R., & Winstanley, D. (2001). The complete sequence of the Cydia pomonella granulovirus genome. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 10), 2531–2547.
- Mäkelä, A. R., Matilainen, H., White, D. J., Ruoslahti, E., & Oker-Blom, C. (2006). Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *Journal of Virology*, 80(13), 6603–11. <http://doi.org/10.1128/JVI.00528-06>
- McClysgaht, A., Baldi, P. F., & Gaut, B. S. (2003). Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *PNAS*, 100(26).
- Miller, L.K., Lingg, A.J., Bulla, L. A. J. (1983). Bacterial viral and fungal insecticides. *Science*, (219), 715 – 721.
- Mitchell, D. (2007). GC content and genome length in Chargaff compliant genomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(1), 207–10. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.008>
- Moraes, R. (2003). Lepidópteros de Importância Médica. In *Animais Peçonhentos* (pp. 211–219). São Paulo: Savier/FAPESP.
- Moraes, R. H. P. (2002). *Identificação dos Inimigos Naturais de Lonomia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) e possíveis fatos determinantes do aumento de sua população*. Escola Superior “Luiz Queiroz Filho”- ESALQ.
- Moreira, C., & Moresco, I. (2007). Ocorrência de acidentes provocados por Lonomia obliqua Walker, no Estado do Paraná, no período de 1989 a 2001 Occurrence of accidents caused by Lonomia obliqua Walker, in the State of Paraná between 1989 and 2001. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2), 242–246.
- Moscardi, F. (1999a). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu Rev Entomo*, (44), 257–289.

- Moscardi, F. (1999b). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu Rev Entomol*, 44, 257–289.
- Nickel, G. C., Tefft, D. L., Goglin, K., & Adams, M. D. (2008). An empirical test for branch-specific positive selection. *Genetics*, 179(4), 2183–93. <http://doi.org/10.1534/genetics.108.090548>
- Nie, Z.-M., Zhang, Z.-F., Wang, D., He, P.-A., Jiang, C.-Y., Song, L., ... Zhang, Y.-Z. (2007). Complete sequence and organization of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus, a dr-rich baculovirus. *BMC Genomics*, 8, 248. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-248>
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–17. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- O'Reilly D, Miller LK, L. V. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual*. (F. and Company., Ed.) (p. 347 p.). New York.
- Oliveira, J. V. D. C., Wolff, J. L. C., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E. B., de Souza, M. L., ... Zanotto, P. M. D. A. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 11), 3233–50. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82161-0>
- Oliver, J. L., & Marín, A. (1996). A Relationship Between GC Content and Coding-Sequence Length. *Journal of Molecular Evolution*, 216–223.
- Paillot, A. (1926). Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. *Compt. Rend*, (182), 180–2.
- Pang, Y., Yu, J., Wang, L., Hu, X., Bao, W., Li, G., ... Yang, H. (2001). Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*, 287(2), 391–404. <http://doi.org/10.1006/viro.2001.1056>
- Pearson, M. N. and G. F. R. (2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *J. Virol.*, (76), 5301–5304.
- Pearson, M. N., & Rohrmann, G. F. (1995). *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions : characterization of their ability to function as replication origins . *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus Homologous Regions : Characterization of Their Ability To Function as Repli. *J Virol*, 69(1).
- PESCE, H, DELGADO, A. (1971). Poisoning from adult moths and caterpillars. In *Venomous Animals and their Venoms*. (p. 3: 120–156). New York: Academic Press.

- Pinto, A.F.M., Berger, M., Reck- Jr., J., Terra, R.M., Guimarães, J. A. (2010). *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrom. *Toxicon*, 56(7), 1103–1112.
- Pinto, A.F.M., Dobrovolski, R., Veiga, A.B.G., Guimaraães, J. A. (2004). Lono-fibrase, a novel a-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.*, (113.), 147–154.
- Podgwaite, J. D. (1981). *Natural disease within dense gypsy moth populations*, in *The Gypsy Moth: Research Towards Integrated Pest Management D.C.* (C. C. D. and M. L. McManus, Ed.). Washington: U.S. Dept. of Agriculture.
- Posada, D. (2003). jModelTest : Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 2001–2004. <http://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), 1641–50. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp077>
- Pullen, S. S., & Friesen, P. D. (1995). The CAGT Motif Functions as an Initiator Element during Early Transcription of the Baculovirus Transregulator ie-1, 69(6), 3575–3583.
- Qian, H., Zhang, Y., Wu, Y., Sun, P., Zhu, S., Guo, X., ... Wang, W. (2013). Analysis of the genomic sequence of *Philosamia cynthia* nucleopolyhedrin virus and comparison with *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrin virus. *BMC Genomics*, 14(1), 115. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-115>
- Rambaut, A. (n.d.). FigTree. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reeson, A. F. (2001). Melanism and disease resistance in insects, 637–649.
- Rice, C., & Miller, L. K. (1986). Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells *. *Virus Res.*, 6, 155–172.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W320–4. <http://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rodems, S. M., & Friesen, P. D. (1995). Transcriptional Enhancer Activity of hr 5 Requires Dual- Palindrome Half Sites That Mediate Binding of a Dimeric Form of the Baculovirus Transregulator IE1, 69(9), 5368–5375.
- Rohrmann, G. F. (2014). Baculovirus nucleocapsid aggregation (MNPV vs SNPV): an evolutionary strategy, or a product of replication conditions? *Virus Genes*, 49(3), 351–7. <http://doi.org/10.1007/s11262-014-1113-5>

- Rohrman GF. (2013). *Baculovirus Molecular Biology* (Third Edit). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500>
- Romanowski V., Matsuura Y., B. D. H. L. (1985). Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Res.*, *1*, 101–114.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–42. <http://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rubio, G. B. G. (2001). Vigilância epidemiológica da distribuição da lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855, no Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública.*, *17*(4), 1036.
- Sambrook J, F. E. and M. T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saúde, O. P.-A. da, & Brasil, R. no. (1996). *MANUAL DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTOXICOS*.
- Seibert, C.S., Tanaka-Azevedo, A.M., Santoro, M.L., Mackessy, S. P., & Torquato, R.J.S., Lebrun, I., Tanaka, A.S., Sano-Martins, I. S. (2006). Purification of a phospholipase A2 from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *(342)*, 1027–1033.
- Shimodaira, H., & Hasegawa, M. (1989). Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution*, 1114–1116.
- Silva, D. D. A., Claudia, A. N. A., Goncalves, L. R. C., Sousa-e-silva, M. C. C., & Higashi, H. G. (1996). DEVELOPMENT OF AN ANTIVENOM AGAINST TOXINS OF *LONOMIA OBLIQUA* CATERPILLARS, *34*(9), 1045–1049.
- Silva, F. W. S., Viol, D. L., Faria, S. V, Lima, E., Valicente, F. H., & Elliot, S. L. (2013). Two's a crowd: phenotypic adjustments and prophylaxis in *Anticarsia gemmatalis* larvae are triggered by the presence of conspecifics. *PloS One*, *8*(4), e61582. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061582>
- Spriggs, M. . (1996). One step ahead of the game: viral immuno-modulatory molecules. *Annu. Reg. Immunol.*, *(14)*, 101–130.
- Stacy, E. W. . (1962). A generalization of the Gamma Distribution. *The Annals of Mathematical Statistics*, *33*(3), 1187–1192. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>

- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(21), 2688–90. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- STEHR, F. (1987). Order Lepidoptera. In *Immature Insects* (pp. 288 – 596). Dubuque, Yowa: Kendal/Hunt.
- Suzuki, Y., & Gojobori, T. (1999). A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Molecular Biology and Evolution*, 16(10), 1315–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563013>
- Tavare´ S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In M. RM (Ed.), *Some mathematical questions in biology—DNA sequence analysis*. (pp. 57–86). Providence (RI): American Mathematical Society.
- Terra, W. R., and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Com. Biochem. Physiol*, (109), 1–62.
- Thézé, J., Bézier, A., Periquet, G., Drezen, J.-M., & Herniou, E. a. (2011). Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 15931–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1105580108>
- Toxicológicas, C. de I. (1999). *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por Lonomia .ed.rev.Centro de Informação Toxicológica. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por .ed.rev.(org.HudsonBarretoAbella,etall)PortoAlegre, 1999,20p. 1. Lagarta urticante.2. .3.Animais Peç. (et all HudsonBarretoAbella, Ed.) (ed.rev.). PortoAlegre.*
- Vago, C., et al. (1974). Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses. *J Invertebr Pathol*, 23(2), 133–4.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M., Reusken, C.B.E.M., V., & J.M. (1994). Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, (200), 513 – 23.
- Veiga, A. B. G., Pinto, A. F. ., & Guimarães, J. a. (2003). Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research*, 111(1-2), 95–101. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.08.020>
- Veiga, A.B.G., Blochtein, B., Guimaraes, J. A. (2001). Structures involved production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, saturniidae). *Toxicon*, 39, 1343–1351.

- Vulinec, K. (1990). Collective security: aggregation by insects as a defense. In J. . Evans, D.L., Schmidt (Ed.), *Insect Defenses - Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. (pp. 251–288). New York: State University of New York.
- Wang, P., and Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*(13), 6977–6982.
- WIKIMEDIA COMMONS. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lonomia-obliqua-citsc-1.jpg>>. Acesso em: 28 fev. 2015. (n.d.).
- Wilson, E. O. (2003). *Biodiversity*. Washington: National Academy Press.
- Wolff, J. L. C., Moraes, R. H. P., Kitajima, E., de Souza Leal, E., & de A Zanotto, P. M. (2002). Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *79*(3), 137–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133702>
- Xeros, N. (1952). Cytoplasmic polyhedral virus diseases. *Nature*, (170), 1073.
- Xie, Z., & Price, D. (1997). Drosophila Factor 2, an RNA Polymerase II Transcript Release Factor, Has DNA-dependent ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(50), 31902–31907. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31902>
- Yang, C. L., Stetler, D. A., & Weaver, R. F. (1991). Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. *Virus Research*, *20*, 251–264.
- Yuan, M., et al. (2011). Identification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids. *J Virol*, *85*(22), 11664–74.
- Zannin, M., Lourenço, D.M., Motta, G., Costa, L.R.D., Grando, M., Gamborgi, G., & P., Noguti, M.A., Chudzinski-Tavassi, A. M. (2003). Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. *Thromb. Haemost.*, *89*, 355–364.
- Zingemagel, R. M., White, J., Roberts, J. L., Sharrow, S., Med, J. E., Murphy, K. M., ... Schmidt, O. (1990). Hemolin : An Insect-Immune Protein Belonging to the Immunoglobulin Superfamily, *174*(1988).
- Zvelebil, M., Baum, J. O. (2008). *Understanding bioinformatics*. (D. Holdsworth, Ed.). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

6. ANEXOS

Anexo 1. Baculovirus utilizados na construção da árvore filogenética referente a família *Baculoviridae*.

<i>Nome do vírus</i>	<i>Nome da sequencia</i>	Tamanho do genoma (pb)	Número de acesso
<i>Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus</i>	AdhoNPV	113220	AP006270
<i>Adoxophyes orana granulovirus</i>	AdorGV	99657	AF547984
<i>Adoxophyes orana nucleopolyhedrovirus</i>	AdorNPV	111724	EU591746
<i>Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus</i>	AgipMNPV_Strain_Illinois	155122	EU839994
<i>Agrotis segetum granulovirus</i>	AgseGV	131680	AY522332
<i>Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus</i>	AsNPV	147544	DQ123841
<i>Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus</i>	AnpeMNPV	126629	DQ486030
<i>Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus</i>	AgMNPV	132239	DQ813662
<i>Apocheima cinerarium nucleopolyhedrovirus</i>	ApciNPV	123876	FJ914221
<i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus</i>	AcMNPV	133894	L22858
<i>Bombyx mandarina nucleopolyhedrovirus</i>	BomaNPV-S1	126770	FJ882854
<i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>	BmNPV-C1	127901	KF306215
<i>Buzura suppressaria nucleopolyhedrovirus</i>	BusuNPV	120420	KF611977
<i>Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus</i>	CfDEFNPV	131160	AY327402
<i>Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus</i>	CfMNPV	129593	AF512031
<i>Choristoneura murinana MNPV</i>	ChmuMNPV	124688	KF894742
<i>Choristoneura occidentalis granulovirus</i>	ChocGV	104710	DQ333351
<i>Choristoneura occidentalis nucleopolyhedrovirus</i>	ChocNPV	128446	KC961303
<i>Choristoneura rosaceana alphabaculovirus</i>	ChroNPV	129052	KC961304
<i>Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus</i>	ChchNPV	149622	AY864330
<i>Clanis bilineata nucleopolyhedrovirus</i>	ClbiNPV_IDZ1	135454	DQ504428
<i>Clostera anachoreta granulovirus</i>	ClanGV-HBHN	101487	HQ116624

<i>Clostera anastomosis (L.) granulovirus</i>	CaLGV	101818	KC179184
<i>Nome do vírus</i>	<i>Nome da sequencia</i>	Tamanho do genoma (pb)	Número de acesso
<i>Condylorrhiza vestigialis multiplenucleopolyhedrovirus</i>	CoveMNPV	125767	EU919397
<i>Cryptophlebia leucotreta granulovirus</i>	CrleGV_CV3	110907	AY229987
<i>Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus</i>	CuniNPV	108252	AF403738
<i>Cydia pomonella granulovirus</i>	CpGV	123500	U53466
<i>Dendrolimus kikuchii nucleopolyhedrovirus</i>	DekiNPV_YN	141454	JX193905
<i>Diatraea saccharalis granulovirus</i>	DisaGV		
<i>Ectropis obliqua nucleopolyhedrovirus</i>	EcobNPV_Strain_A1	131204	DQ837165
<i>Epinotia aporema granulovirus</i>	EpapGV	119082	JN408834
<i>Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus</i>	EppoMNPV	118584	AY043265
<i>Erinnyis ello granulovirus</i>	EeGV	119082	KJ406702
<i>Euproctis pseudoconspersa nucleopolyhedrovirus</i>	EupsNPV_Strain_Hangzhou	141291	FJ227128
<i>Helicoverpa armigera granulovirus</i>	HaGV	169794	EU255577
<i>Helicoverpa armigeranucleopolyhedrovirus</i>	HaNPV_G4	130759	AF271059
<i>Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus</i>	HaMNPV	154196	EU730893
<i>Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus</i>	HzSNPV	130869	AF334030
<i>Hemileuca sp. Nucleopolyhedrovirus</i>	HespNPV	140633	KF158713
<i>Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus</i>	HycuNPV	132959	AP009046
<i>Leucania separata nucleopolyhedrovirus</i>	LeseNPV_Strain_AH1	168041	AY394490
<i>Lonomia obliqua multiple nucleopolyhedrovirus</i>	LoobMNPV	120023	KP763670
<i>Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus</i>	LdMNPV	161046	AF081810
<i>Lymantria xyliina multiple nucleopolyhedrovirus</i>	LyxyMNPV-5	156344	GQ202541
<i>Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus</i>	MabrMNPV_K1	152710	JQ798165
<i>Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus</i>	MacoNPV-A_90/2	155060	U59461

<i>Maruca vitrata multiple nucleopolyhedrovirus</i>	MaviMNPV	111953	EF125867
<i>Nome do vírus</i>	<i>Nome da sequencia</i>	Tamanho do genoma (pb)	Número de acesso
<i>Neodiprion abietis nucleopolyhedrovirus</i>	NeabNPV	84264	DQ317692
<i>Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus</i>	NeleNPV	81755	AY349019
<i>Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus</i>	NeseNPV	86462	AY430810
<i>Orgyia leucostigma nucleopolyhedrovirus</i>	OrleNPV_I_CFS-77	156179	EU309041
<i>Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus</i>	OpMNPV	131995	U75930
<i>Philosamia cynthia ricini nucleopolyhedrovirus virus</i>	PhcyNPV	125376	JX404026
<i>Phthorimaea operculella granulovirus</i>	PoGV	119217	AF499596
<i>Pieris rapae granulovirus</i>	PrGV	108592	GQ884143
<i>Plutella xylostella granulovirus</i>	PlxyGV	100999	AF270937
<i>Plutella xylostella multiple nucleopolyhedrovirus</i>	PlxyMNPV_CL3	134417	DQ457003
<i>Pseudaletia unipuncta granulovirus</i>	PsunGV_Stain_Hawaiiin	176677	EU678671
<i>Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus</i>	PsinSNPV-IE	139132	KC136318
<i>Rachiplusia ou multiple nucleopolyhedrovirus</i>	RoMNPV	131526	AY145471
<i>Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus</i>	SeMNPV	135611	AF169823
<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i>	SfMNPV_I_3AP2	131331	EF035042
<i>Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus</i>	SIMNPV_AN1956	137998	JX454574
<i>Spodoptera litura granulovirus</i>	SpliGV_SLGV-K1	124121	DQ288858
<i>Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus</i>	SINPV_II	148634	EU780426
<i>Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus</i>	SpliNPV_G2	139342	AF325155
<i>Sucra jujuba nucleopolyhedrovirus</i>	SujuNPV	135952	KJ676450
<i>Thyanoplusia orichalcea nucleopolyhedrovirus</i>	ThorMNPV	132978	JX467702
<i>Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus</i>	TnNPV	134394	DQ017380
<i>Xestia c-nigrum granulovirus</i>	XcGV	178733	AF162221

Anexo 2. Conjunto de seqüências utilizado para a geração da árvore filogenética contendo os genes GTA, TTF2 e LoobNPVOrf-35.

Nome da sequencia	Gene	Organismo	Tamanho (aa)
TTF2_Odobenus r.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	280
TTF2_Condylura c.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Condylura cristata</i>	277
TTF2_Chinchilla l.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Chinchilla lanigera</i>	277
TTF2_Ailuropoda m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	280
TTF2_Vicugna p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Vicugna pacos</i>	259
TTF2_Tursiops t.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Tursiops truncatus</i>	278
TTF2_Trichechus m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Trichechus manatus latirostris</i>	275
TTF2_Takifugu r.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Takifugu rubripes</i>	269
TTF2_Sus s.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Sus scrofa</i>	278
TTF2_Sorex a.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Sorex araneus</i>	278
TTF2_Sarcophilus h.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Sarcophilus harrisii</i>	277
TTF2_Saimiri b.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Saimiri boliviensis</i>	278
TTF2_Rattus n.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Rattus norvegicus</i>	278
TTF2_Pteropus a.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Pteropus alecto</i>	278
TTF2_Pongo a.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Pongo abelii</i>	278
TTF2_Papio a.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Papio anubis</i>	278
TTF2_Pantholops h.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Pantholops hodgsonii</i>	275
TTF2_Pan t.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Pan troglodytes</i>	278
TTF2_Pan p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Pan paniscus</i>	278
TTF2_Otolemur g.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Otolemur garnettii</i>	278

Nome da sequencia	Gene	Organismo	Tamanho (aa)
TTF2_Orcinus o.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Orcinus orca</i>	278
TTF2_Octodon d.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Octodon degus</i>	277
TTF2_Ochotona p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Ochotona princeps</i>	278
TTF2_Nomascus l.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Nomascus leucogenys</i>	278
TTF2_Nasonia v.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Nasonia vitripennis</i>	264
TTF2_Myotis l.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Myotis lucifugus</i>	278
TTF2_Myotis d.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Myotis davidii</i>	278
TTF2_Myotis b.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Myotis brandtii</i>	278
TTF2_Mustela p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Mustela putorius furo</i>	280
TTF2_Musca d.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Musca domestica</i>	270
TTF2_Monodelphis d.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Monodelphis domestica</i>	277
TTF2_Microtus o.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Microtus ochrogaster</i>	278
TTF2_Megachile r.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Megachile rotundata</i>	258
TTF2_Macaca m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Macaca mulatta</i>	278
TTF2_Macaca f.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Macaca fascicularis</i>	278
TTF2_Jaculus j.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Jaculus</i>	279
TTF2_Homo s.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Homo sapiens</i>	278
TTF2_Heterocephalus g.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>PHeterocephalus glaber</i>	277
TTF2_Gorilla g.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Gorilla</i>	278
TTF2_Echinops t.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Echinops telfairi</i>	277

Nome da sequencia	Gene	Organismo	Tamanho (aa)
TTF2_Dasyopus n.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	277
TTF2_Danio r.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Danio rerio</i>	272
TTF2_Danaus p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Danaus plexippus</i>	255
TTF2_Culex q.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Culex quinquefasciatus</i>	269
TTF2_Chrysemys p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Chrysemys picta bellii</i>	280
TTF2_Chelonia m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Chelonia mydas</i>	280
TTF2_Ceratotherium s.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Ceratotherium simum</i>	238
TTF2_Ceratitidis c.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Ceratitidis capitata</i>	266
TTF2_Cavia p.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Cavia porcellus</i>	277
TTF2_Capra h.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Capra hircus</i>	275
TTF2_Canis l.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	278
TTF2_Camelus f.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Camelus ferus</i>	278
TTF2_Callithrix j.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Callithrix jacchus</i>	278
TTF2_Bos t.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Bos taurus</i>	275
TTF2_Bombyx m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Bombyx mori</i>	254
TTF2_Bombus t.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Bombus terrestris</i>	259
TTF2_Bombus i.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Bombus impatiens</i>	259
TTF2_Apis m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Apis mellifera</i>	261
TTF2_Apis d.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Apis dorsata</i>	260
TTF2_Alligator s.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Alligator sinensis</i>	280
TTF2_Aliigator m.	Fator de terminação de transcrição 2	<i>Alligator mississippiensis</i>	280

TTF2_Acyrthosiphon p. 2		Fator de terminação de transcrição 2	<i>Acyrthosiphon pisum</i>	262
Nome da sequencia	Gene	Organismo	Tamanho (aa)	
	Fator de terminação de transcrição 2			
TTF2_Acromyrmex e.		<i>Acromyrmex echinaior</i>	255	
GTA_RaouMNPV	Transativador Global	<i>Rachiplusia ou MNPV</i>	236	
GTA_PlxyMNPV		<i>Plutella xylostella multiple nucleopolyhedrovirus</i>	236	
GTA_PhcyNPV	Transativador Global	<i>Philosamia cynthia ricini nucleopolyhedrovirus virus</i>	234	
GTA_OrpsMNPV	Transativador Global	<i>Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus</i>	235	
GTA_HycuNPV	Transativador Global	<i>Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus</i>	232	
GTA_EppoNPV	Transativador Global	<i>Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus</i>	237	
GTA_ChroNPV	Transativador Global	<i>Choristoneura rosaceana alphabaculovirus</i>	236	
GTA_ChocNPV	Transativador Global	<i>Choristoneura occidentalis alphabaculovirus</i>	234	
GTA_ChMU	Transativador Global	<i>Choristoneura murinana alphabaculovirus</i>	234	
GTA_ChfuMNPV 2	Transativador Global	<i>Choristoneura fumiferana DEF multiple nucleopolyhedrovirus</i>	235	
GTA_ChfuMNPV 1	Transativador Global	<i>Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus</i>	234	
GTA_AnpeNPV 2	Transativador Global	<i>Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus</i>	234	
GTA_AnpeNPV 1	Transativador Global	<i>Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus</i>	234	
GTA_AgMNPV	Transativador Global	<i>Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus</i>	234	
GTA_AcMNPV	Transativador Global	<i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus</i>	236	

Anexo 3. Posição, orientação e tamanhos das 134 ORFs identificadas no genoma de LoobMNPV, em comparação a ORFs ortólogas dos baculovírus AcMNPV, AnpeNPV, MaviMNPV e DekiNPV, apresentando percentual de identidade de amino ácidos.

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	AcMNPV		AnpeNPV		MaviMNPV		DekiNPV		ThorNPV	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
1	Polh	1→750	250	Ac-PH	84,02	polyhedrin	91,8	polh	90,57	polh	91,36	ph	90,57
2	ORF 1629	823←2454	544	Ac-ORF1629	45,3	1629-capsid	26,55	orf1629	45,3			pp78/83	36,71
3	pk-1	2465→3274	269	pk-1	71,43	pk-1	58,96	pk-1	71,64	pk-1	62,69	pk-1	70,57
4	LoobNPVOrf-4	3271←3573	101										
5	ie-2	3728←4375	215	pe-38	30,61	ie-2	25	ie-2	20,99	ie-2	26,53	ie-2	40
6	LoobNPVOrf-6	4812→5456	214										
7	alk-exo	5893→7239	449	alk-exo	55,79	alk-exo	45,21	alk-exo	53,77	alk-exo	52,55	alk-exo	53,88
8	p26	7392→8168	258	Ac-p26	54,1	p26	45,7	p26	54,1	p26	46,22	p26	48,94
9	p10	8227→8487	87	Ac-p10	58,57	p10	60,81	p10	59,15	p10	61,43	p10	57,75
10	p74	8488←10437	650	p74	82,69	p74	75,27	p74	78,05	p74	76,31	p74	81,76
11	me 53	10540←11835	432	me53	44,98	me 53	36,27	me53	44,06			me53	41,15
12	LoobNPVOrf-12	11893←12063	57										
13	ie-0	12149→12967	272	ie-0	46,44	ie-0	47,35	ie-0	46,44	ie-0	47,1	ie-0	45,26
14	p49(49k)	12980→14422	480	p49(49k)	82,77	p49(49k)	68,41	p49(49k)	81,7	me53	70,37	p49(49k)	82,77
15	odv-e18	14419→14691	91	odv-e18	75,86	odv-e18	62,5	odv-e18	72,53	odv-e18	63,04	odv-e18	79,37
16	odv-e27	14738→15599	286	odv-e27	72,6	odv-e27	62,02	odv-e27	72,76	odv-ec27	65,17	odv-ec27	72,82
17	LoobNPVOrf-17	15613→15897	95	AcOrf-145	74,03	Anpe-ORF136	65	Mv-ORF115	73,81	Deki-ORF10	75	Thor-ORF136	71,43
18	LoobNPVOrf-18	15969←16682	237	AcOrf-146	67,96	Anpe-ORF137	47,57	Mv-ORF114	65,05	Deki-ORF9	58,45	Thor-ORF137	63,9
19	ie-1	16738→18405	556	ie-1	46,26	ie-1	35,74	ie-1	47,12	ie-1	50,21	ie-1	45,56
20	odve-56	18463←19590	376	odve-56	72,7	odve-56	67,29	odv-e56	68,65			odv-e56	73,56
21	pe38	19719←20363	214	pe38	28,42	pe38	33,64	pe38	29,73	pe38	34,81	pe38	28,49
22	LoobNPVOrf-22	20706←20921	71	AcOrf-152	60,47			Mv-ORF120	65,12			Thor-ORF143	64,29
23	LoobNPVOrf-23*	20958→21680	240										
24	LoobNPVOrf-24	22071←22862	263	AcOrf-132	35,62	Anpe-ORF123	33,79	Mv-ORF101	33,94	Deki-ORF20	28,68	Thor-ORF125	29,75
25	calyx/pep	22895←23765	289	calyx/pep	52,57	calyx/pep	67,47	calyx/pep	52,01	calyx/pep	67,46	calyx/pep	56,35
26	gp16	23887←24147	87	Ac-gp16	80,49	gp16	64,63	gp16	81,71	gp16	50	gp16	79,27

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	<u>AcMNPV</u>		<u>AnpeNPV</u>		<u>MaviMNPV</u>		<u>DekiNPV</u>		<u>ThorNPV</u>	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
27	p24	24240←24854	204	p24	67,54	p24	55,73	p24	60,94	p24	62,24	p24	59,39
28	gp64	25121→26653	510	gp64	72,92	gp64	67,85	gp64	73,82	gp64	73,32	gp64	73,76
29	LoobNPVOrf-29	26702←27514	270	AcOrf-124	36,4	Anpe-ORF114	25	Mv-ORF93	37,39	Deki-ORF35	35,71	Thor-ORF117	36,84
30	LoobNPVOrf-30	27660→27926	88							Deki-ORF33	33,82	Thor-ORF117	36,76
31	LoobNPVOrf-31	27986→28634	215	AcOrf-106	78,57	Anpe-ORF99	71,71	Mv-ORF83	79,23	Deki-ORF47	75	Thor-ORF101	79,72
32	LoobNPVOrf-32	28810←29062	84	AcOrf-108	55,56	Anpe-ORF100	46,15	Mv-ORF84	57,41	Deki-ORF46	52,73	Thor-ORF102	61,11
33	odv-ec43	29084←30229	381	AcOrf-109	75,7	Anpe-ORF101	63,17	Mv-ORF85	76,55	Deki-ORF45	71,68	Thor-ORF103	74,94
34	LoobNPVOrf-34	30258←30425	55	AcOrf-110	81,48	Anpe-ORF103	74,07	Mv-ORF86	79,63	Deki-ORF49	83,64	Thor-ORF104	79,63
35	LoobNPVOrf-35	30630→31538	302	Ac-GTA	28,11	transactivator	24,65			Deki-ORF138	46,88	Thor-ORF117	50
36	LoobNPVOrf-36	31581←31784	67	AcOrf-111	73,13	Anpe-ORF104	56,92	Mv-ORF87	65,62	Deki-ORF42	74,63	Thor-ORF105	74,63
37	LoobNPVOrf-37	32024→33028	334	AcOrf-113	47,93							Thor-ORF106	53,23
38	LoobNPVOrf-38	33038←33391	117										
39	LoobNPVOrf-39	33445←34579	378	AcOrf-114	40,48	Anpe-ORF106	33,97	Mv-ORF88	38,13	Deki-ORF40	30,95	Thor-ORF109	40,94
40	pif-3	34585←35238	218	AcOrf-115	62,63	Anpe-ORF107	63,19	pif-3	63,16	pif-3	58,03	pif-3	63,16
41	pif-1	35367→36968	533	AcOrf-119	74,67	pif-1	70,16	pif-1	73,5	pif-1	67,89	pif-1	73,92
42	LoobNPVOrf-42	36984→37235	83	AcOrf-120	53,75	Anpe-ORF112	32,5	Mv-ORF92	53,09	Deki-ORF32	50	Thor-ORF114	55
43	vp80	37262←39775	837	vp80	50,99	p87	52,47	vp80	47,23	p87	47,22	vp80	49,02
44	p48	39802→40974	391	p48	78,72	p48	66,92	p45	76,92	p45	74,68	p48	78,52
45	p12	40955→41311	118	AcOrf-102	59,04	p12	48,31	p12	54,26	p12	44,35	p12	50,83
46	p40	41317→42456	380	p40	67,02	p40	52,53	p40	65,96	p40	61,92	bv/odv-c42	66,14
47	p6.9*	42521→42694	57										

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	AcMNPV		AnpeNPV		MaviMNPV		DekiNPV		ThorNPV	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
48	lef- 5	42691←43500	270	lef- 5	65,04	lef- 5	53,05	lef-5	64,79	lef-5	62,18	lef-5	63,91
49	38k	43435→44391	319	38k	65,09	38k	54,84	38k	63,84	38k	56,83	38k	63,86
50	pif-4	44413←44922	170	AcOrf-96	76,92	Anpe- ORF88	69,28	19kDa protein	69,05	odv-e28	73,49	pif-4	75,9
51	DNA helicase	44924→48642	1,239	DNA helicase	59,86	DNA helicase	50,72	DNA helicase	58,24	DNA helicase	61,97	DNA helicase	59,58
52	odv e-25	48673←49389	229	odv e-25	55,17	odv e-25	57,14	odv e-25	55,6	odv e-25	73,68	odv e-25	59,48
53	p18	49370←49861	163	AcOrf-93	75,46	p18	65,62	Mv-ORF70	74,38	p18	77,3	p18	74,69
54	p33	49860→50621	253	AcOrf-92	84,11	p33	73,52	p33	83,53	p33	78,93	Sox	84,11
55	LoobNPVOrf-55	50660←51235	191										
56	lef- 4	51257←52723	488	Ac-lef4	60,21	lef- 4	48,77	lef-4	60,21	lef-4	55,44	lef-4	57,32
57	vp39	52750→53802	351	vp39	63,71	vp39	70,48	vp39	64,81	vp39	69,82	vp39	67,09
58	cg30	53869→54729	287	cg30	44,13	cg30	32,53			cg30	49,81	cg30	46,26
59	LoobNPVOrf-59	54907←55065	53										
60	LoobNPVOrf-60	55080→55277	65										
61	LoobNPVOrf-61	55374→55547	57										
62	p95	55871←58378	835	p95	61,9	vp91	54,33	p95	59,84	vp91/p9	56,58	vp91	60,54
63	tlp	58347→58949	200	Ac-TLP	40	Telokin	24,63	tlp20	38,12	Deki-ORF72	38,61	tlp	43,08
64	LoobNPVOrf-64	58765→59487	241	AcOrf-81	75,58	Anpe-ORF77	69,31	Mv-ORF64	72,84	Deki-ORF73	89,71	Thor-ORF76	75,22
65	gp41	59493→60818	441	gp41	64,83	gp41	64,82	gp41	63,64	gp41	73,75	gp41	64,46
66	LoobNPVOrf-66	61010→61367	118	AcOrf-78	59,46	Anpe-ORF74	52,83	Mv-RF61	60,71	Deki-ORF76	51,22	Thor-ORF73	57,66
67	vlf-1	61385→62554	389	vlf-1	89,94	vlf-1	80,18	vlf-1	87,64	vlf-1	86,78	vlf-1	82,17
68	LoobNPVOrf-68	62603→62857	84	AcOrf-76	78,57	Anpe-ORF72	73,81	Mv-ORF59	76,19	Deki-ORF78	75,29	Thor-ORF71	78,57
69	LoobNPVOrf-69	62875→63276	134	AcOrf-75	53,38	Anpe-ORF70	43,85	Mv-ORF58	53,38	Deki-ORF79	53,38	Thor- ORF106	51,88
70	LoobNPVOrf-70	63344→63886	180	AcOrf-74	46,67	Anpe-ORF69	44,58	Mv-ORF57	46,43	Deki-ORF80	49,12	Thor-ORF70	46,06
71	LoobNPVOrf-71	63886→64155	90										
72	iap-2	64413←65264	283	iap-2	53,31	iap-2	41,28	iap-2	54,41	iap-2	48,35	iap-2	54,41
73	pif-6	65392←65796	135	AcOrf -68	70,69	Anpe-ORF64	67,35	Mv-ORF52	69,83	Deki-ORF85	65,35	Thor-ORF63	73,74
74	lef-3	65798→67063	421	lef-3	54,36	lef-3	38,46	lef-3	51,8	Deki-ORF86	50,92	lef-3	55,26
75	desmop	67058←69421	787	AcOrf-66	37,5	Desmop	64,58	desmop	37,62	Deki-ORF87	31,64	Thor-ORF61	36,6
76	DNA pol	69431→72454	1,007	Ac-DNA- pol	68,06	DNA polymerase	56,49	DNA pol	67,89	dnapol	68,27	DNA pol	67,7
77	LoobNPVOrf-77	72980→73369	129	AcOrf-96	33,33					Deki-ORF89	36,15	pif-4	33,33

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	AcMNPV		AnpeNPV		MaviMNPV		DekiNPV		ThorNPV	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
78	LoobNPVOrf-78*	73445←73942	165										
79	LoobNPVOrf-79	74119←74604	162	AcOrf-63	37,01			Mv-ORF47	33,77	Deki-ORF91	34,19	Thor-ORF58	36,18
80	lef-9	74707←76365	493	lef-9	82,52	lef-9	71,98	lef-9	83,13	lef-9	82,93	lef-9	83,13
81	fp-25k	76319→76954	211	fp-25k	75,12	fp-25k	68,68	fp-25k	80,22	fp-25k	76,22	fp-25k	73,17
82	ChaB-like	77113→77367	85	AcOrf-60	70	fp	60	Mv-ORF44	70	Deki-ORF94	70,49	ChaB-like	71,67
83	ChaB-like	77370→77522	50	AcOrf-59	78	ChaB-like	52	Mv-ORF43	70	Deki-ORF95	76	ChaB-like	76
84	LoobNPVOrf-84	77598→77987	129										
85	LoobNPVOrf-85	77973←78464	163	AcOrf-57	60,49	Anpe-ORF55	46,63			Deki-ORF96	62,96	Thor-ORF53	59,88
86	LoobNPVOrf-86	78676←78981	102	AcOrf-56	46,53			Mv-ORF42	45,54	Deki-ORF97	45,76	Thor-ORF52	47,52
87	LoobNPVOrf-87	78984←79202	72	AcOrf-55	52,63	Anpe-ORF54	52,63	Mv-ORF41	50	Deki-ORF98	52,63	Thor-ORF51	55
88	vp1054	79334←80437	367	AcOrf-54	70,33	vp1054	53,26	vp1054	69,23	vp1054	59,02	Thor-ORF50	71,15
89	lef-10	80295←80534	79	lef-10	62,82	lef-10	52,54	lef-10	58,97			lef-10	63,89
90	LoobNPVOrf-90	80531←80962	143	AcOrf-53	78,68	Anpe-ORF51	58,09	Mv-ORF38	76,47	Deki-ORF100	73,57	Thor-ORF48	77,94
91	LoobNPVOrf-91	81076→81606	177	AcOrf-52	47,78			Mv-ORF37	41,24	Deki-ORF101	44,69	Thor-ORF47	40,91
92	LoobNPVOrf-92	81619←82611	331	AcOrf-51	38,94	Anpe-ORF50	28,48	Mv-ORF36	37,93	Deki-ORF102	32,17	Thor-ORF46	38,94
93	lef-8	82635→85298	887	lef-8	72,67	lef-8	64,61	lef-8	72,67	lef-8	69,45	lef-8	71,96
94	pcna	85435→86253	273	pcna	50,2	Pcna	26,82			Deki-ORF104	47,43	pcna	48,44
95	LoobNPVOrf-95	86299→86643	115	AcOrf-48	38,39	Etm	32,94						
96	vef	86646→88940	764							vef-2	36,72		
97	LoobNPVOrf-97	88846→89403	186										
98	ctl-1	89519←89680	53	ctl-1	60,38	ctl-1	60,38			ctl-1	58,49	ctl-1	60,38
99	bro-a	89729←90688	319	Ac-bro	42,47	bro-b	44,86			dk-bro-2	72,36	bro-b	61,18
100	he65**	90814←91473	220	he65	36,77	he65	29,18	he65	37,58			he65	28,95
101	odv-e66	91820←93916	698	Ac-odv-e66	79,02	odv-e66	69,57			odv-e66	33,05	odv-e66	76,49
102	LoobNPVOrf-102	93976←94365	130	AcOrf-44	52,89	Anpe-ORF44	36,04	Mv-ORF32	49,61	Deki-ORF107	52,63	Thor-ORF41	54,46
103	LoobNPVOrf-103	94352←94588	78	AcOrf-43	60,78	Anpe-ORF43	43,14	Mv-ORF31	59,57	Deki-ORF108	63,46		
104	lef-12	94616←95215	199	AcOrf-41	55	lef-12	36,9	lef-12	52,75	lef-12	43,85	lef-12	51,65
105	p47	95187→96422	402	Ac-p47	72,89	p47	64,27	p47	72,14	p47	69,31	p47	72,46

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	AcMNPV		AnpeNPV		MaviMNPV		DekiNPV		ThorNPV	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
106	LoobNPVOrf-106	96554→97240	228	AcOrf-38	74,13	Anpe-ORF22	66,67	Mv-ORF27	72,6	Deki- ORF113	67,49	nudix protein	73,5
107	lef-11	97212→97574	120	Ac-lef11	47,06	lef-11	50	lef-11	49,45	lef-11	55,43	lef-11	50
108	39k/pp31	97564→98475	304	39k/pp31	55,23	39k/pp31	41,09	39k/pp31	55,04	39k/pp31	48,51	39k/pp31	53,43
109	v_ubi	98515←98751	79	v-ubi	94,74	v-ubi	89,47	v-ubi	89,47	v-ubi	92,21	v-ubi	92,31
110	LoobNPVOrf-110	98782→99414	211	AcOrf-34	50,94	Anpe-ORF26	45,86	Mv-ORF23	49,07	Deki- ORF117	46,67	Thor-ORF32	46,15
111	fgf	99555→100106	183	fgf	47,19	Fgf	35,58			fgf	39,23	fgf	42,94
112	ctl-2	100097→100285	62	ctl-2	41,51	ctl-2	61,54			ctl-1	39,62	ctl-2	41,51
113	LoobNPVOrf-113*	100228←100617	130										
114	sod	101182→101655	158	Ac-sod	75,51	Sod	79,05	sod	74,15	sod	69,74		
115	LoobNPVOrf-115	101752→103195	481	AcOrf-30	49,45	Anpe-ORF33	37,89	Mv-ORF21	46,59			Thor-ORF28	46,61
116	LoobNPVOrf-116	103234→103437	68	AcOrf-29	39,39	Anpe-ORF34	40,3	Mv-ORF20	55,22			Thor-ORF27	42,03
117	lef-6	103695←104354	219	lef-6	33,64	lef-6	36,17	lef-6	36,4	lef-6	41,09	lef-6	34,33
118	iap-1	104376←105308	310	iap-1	52,77	iap-1	44,81	iap-1	55,63	iap-1	49,7	iap-2	23,57
119	LoobNPVOrf-119	105320←105751	143	AcOrf-26	56,56	Anpe-ORF37	53,66	Mv-ORF17	52,46	Deki- ORF123	51,64	Thor-ORF24	56,25
120	dbp	105828→106793	321	AcOrf-25	44,3	Dbp	40,83	dbp	44,37	dbp	62,89	dbp	44,01
121	pkip	106907→107419	170	Ac-pkip	44,64	Pkip	37,5	pkip	41,92	Deki- ORF127	36,61	pkip	43,2
122	f_protein	107414←109483	689	Ac-env- prot	32,63	envelope	31,41	efp/lid130	31,04	Deki- ORF128	36,36	f	34,41
123	pif-2	109590←110735	381	AcOrf-22	77,17	pif-2	72,97	pif-2	77,43	pif-2	73,49	pif-2	76,38
124	arif	110789→111808	339	AcOrf-21	33,33	arif-1	27,79	arif-1	30,71	arif-1	28,61	arif-1	32,69
125	LoobNPVOrf-125	111815←112129	104	AcOrf-19	42,2	Anpe-ORF18	39,8	Mv-ORF11	43,64	Deki- ORF132	49,02	Thor-ORF18	42,59
126	LoobNPVOrf-126	112228→113277	350	AcOrf-18	39,17	Anpe-ORF17	34,02	Mv-ORF10	38,76	Deki- ORF133	40,42	Thor-ORF17	39,64
127	LoobNPVOrf-127	113337←113972	211	AcOrf-17	56	Anpe-ORF16	41,71	Mv-ORF9	46,4			Thor-ORF16	50,72
128	bv/odv-e26	113941←114663	241	AcOrf-16	43,58	odv-e26	28,98	Mv-ORF8	40	bv/odv-e26	37,66	bv/odv-e26	43,53
129	egt	114891←116435	514	Ac-egt	63,69	truncated EGT	48,65	egt	61,4	egt	62,17	egt	60,95
130	lef-1	116540→117244	234	lef-1	67,53	lef-1	50,65	lef-1	67,25	lef-1	64,35	lef-1	64,07
131	LoobNPVOrf-130	117237→118286	349	AcOrf-13	46,5	38.7K	31,05	38.7kDa	46,5	Deki- ORF137	37,58	Thor- ORF125	43,26

LoobMPV ORFs	Nome	Posição(pb)	Tamanho (aa)	<u>AcMNPV</u>		<u>AnpeNPV</u>		<u>MaviMNPV</u>		<u>DekiNPV</u>		<u>ThorNPV</u>	
				ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %	ORF	Ident %
132	ptp-1	118304→118819	171	ptp-1	62,72	ptp-1	54,12	ptp-1	56,55			ptp-1	60,95
133	LoobNPVOrf-132	118906→119277	124	AcOrf-5	40,16	Anpe-ORF5	48,08	ORF125	39,68	Deki-ORF144	29,91	Thor-ORF5	35,77
134	lef-2	119258→119920	220	lef-2	65,24	lef-2	45,93	lef-2	62,86	lef-2	57,35	lef-2	62,38

* ORFs que não únicas, mas que possuem correspondência com outros baculovírus (LoobNPVOrf-23 possui maior similaridade com AgMNPV (gp147), p6.9 possui maior similaridade com PespNPV (ac57-like), LoobNPVOrf-78 possui maior similaridade com PrGV (orf 101) e LoobNPVOrf-113 possui maior similaridade com XcGV (orf 127)

**LoobNPVOrf-100 (*he65*) possui maior identidade primeiramente com AgseGV (orf132).