

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

**Caracterização Molecular de Mutantes Gerados pela
Passagem Serial do Baculovírus *Anticarsia gemmatalis*
MNPV em Cultura de Células**

Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende

**Brasília, DF
2008**



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

**Caracterização Molecular de Mutantes Gerados pela
Passagem Serial do Baculovírus *Anticarsia gemmatalis*
MNPV em Cultura de Células**

Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Marlinda Lobo de Souza

Co-Orientadora: Dra. Maria Elita Batista de Castro

**Brasília, DF
2008**

Trabalho realizado no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), com suporte financeiro da EMBRAPA e CNPq-UnB.

Orientadora: Dra. Marlinda Lobo de Souza
Co-Orientadora: Dra. Maria Elita Batista de Castro

Banca Examinadora:

Dra. Marlinda Lobo de Souza (Orientadora) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Dr. Bergmann Morais Ribeiro - Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Elida Geralda Campos - Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Tatsuya Nagata - Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini - Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Membro Suplente:

Dr. Francisco José Rivera Pinedo - Faculdade JK

“Valeu a pena? Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
mas nele é que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa

*Ao meu esposo Eduardo e aos nossos filhos
Giovana e Leonardo pelo apoio, compreensão,
paciência e sobretudo pelo amor que nos une.*

Com todo meu amor!

Dedico

*Aos meus queridos pais, Siquetoci e Stelita
pela importante base familiar, pelo exemplo de
dedicação e amor, principalmente pelo
incentivo na busca de ideais.*

Dedico

Às minhas queridas orientadoras Dras. Marlinda e Elita pela grande determinação e empenho, não medindo esforços para a conclusão deste trabalho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À **minha orientadora Dra. Marlinda Lobo de Souza**, pela sua orientação, pela grande paciência, por sua determinação, e principalmente por acreditar em mim e aceitar ser minha orientadora sendo, portanto, a responsável pela minha volta à carreira científica.

À **minha co-orientadora Dra. Maria Elita Batista de Castro**, pela sua grande contribuição e sugestões dadas no decorrer trabalho, pelos seus incentivos e ensinamentos, pela sua dedicação à pesquisa científica e pela sua amizade.

À Zilda Maria de Araújo Ribeiro pela sua disponibilidade em me ensinar a trabalhar com cultura de células, pelos inúmeros incentivos e palavras de apoio e carinho e por sua amizade.

Ao Dr. Bergmann M. Ribeiro pelas sugestões, pelo auxílio no manuseio do microscópio eletrônico e pelo uso do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da UnB para condução dos experimentos.

Ao Dr. Georgios Pappas pela ajuda com informações sobre bioinformática e pelo tratamento e análise dos resultados de sequenciamento do gene.

Ao Dr. Pinedo pela sua cooperação no decorrer do trabalho e sugestões relevantes.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Virologia de Insetos: Briana, Juliana, Lorena, Saluana, João Paulo, Paulo, Geraldo, Babi, Raimundinha e William pelo incentivo, pela ajuda prestada, pelo companheirismo, pelas conversas e momentos de descontração. Em especial a Briana, Juliana, Saluana e Paulo que se empenharam com tanta dedicação em me ajudar nos momentos finais de conclusão do trabalho.

Às técnicas Ana Cristina Menezes Mendes Gomes e Rosana Falcão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Cenargen pelo auxílio na preparação do material utilizado em microscopia eletrônica.

À Dra. Rose Monnerat do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e principalmente à prestativa colega Érica, pela sua receptividade, boa vontade e ajuda.

Ao pessoal da Plataforma de Sequenciamento de DNA, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelas reações de sequenciamento, em especial à Luciana Labuto.

Aos estatísticos Antônio Willians Moita e Joseane Padilha da Silva pela ajuda com o tratamento estatístico dos dados.

Ao Departamento de Biologia Celular desta Universidade (UnB) e Coordenação da Pós-Graduação em Biologia Molecular, em especial à Ana por ter me aberto portas e por ser tão prestativa.

À todos os professores e colegas do curso de pós-graduação em Biologia Molecular.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar os experimentos em seus laboratórios, pela disponibilidade de recursos técnicos e materiais e pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, sempre presente em minha vida.

Ao meu amor Eduardo, que me incentivou, apoiou e acreditou no meu trabalho. Sobretudo por sua confiança em mim e dedicação aos nossos filhos durante os momentos em que estive ausente. Também pelo seu amor e carinho.

Aos meus lindos filhos Giovana e Leonardo pelo amor, pela paciência, por terem suportado minhas ausências e por me receberem sempre com um abraço carinhoso. Por vocês, tudo vale a pena!

À Valeíse, meu braço direito em casa, que cuidou dos meus filhos com amor e dedicação e permitiu que eu pudesse nesse tempo me dedicar mais ao trabalho de pesquisa.

Aos meus queridos pais Siguetoci e Stelita por tudo que sou, exemplos de determinação, dedicação e amor.

Aos meus irmãos: Siguetoci, Silvane, Sílvio, Stelita, Sérgio e João Henrique. E aos seus familiares pelo apoio e incentivo e pelos nossos raros momentos juntos que tanto me fortalecem.

À minha cunhada e amiga Lílian pelo seu interesse, pela sua disposição e apoio.

Aos meus sogros, Élvio e Sálua pela generosidade, compreensão e apoio. E pelo filho maravilhoso.

À Briana, amiga e companheira de pós-graduação, pelas suas sugestões, por seu incentivo e apoio, sobretudo nos momentos mais difíceis. Também pelos muitos momentos de descontração.

À Soraia que gentilmente me abrigou em sua casa em Sobradinho até que eu me estabelecesse em Brasília, pela sua amizade e apoio.

À Valéria e sua família por terem me recebido com tanto carinho e gentileza em seu lar, pela convivência agradável. Especialmente a Valéria, uma pessoa elegante e batalhadora por nos tornarmos grandes amigas.

À Consuelo por nossa grande amizade, pelo incentivo, pelos sábios conselhos, pelos momentos de descontração quando nos reunimos.

Aos amigos Valter e Cláudia pela disposição em sempre estar presente nas horas mais necessárias, sobretudo pela amizade.

Eu não teria conseguido sem o apoio de todos vocês.

MUITO OBRIGADA !!

ÍNDICE

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
RESUMO	20
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	24
1. Baculovírus: Características Gerais	24
2. Ciclo de Infecção	28
3. Replicação Viral em Cultura de Células	33
3.1 Replicação do vírus e morfogênese viral	33
4. Baculovírus como Agente de Controle Biológico	37
4.1 <i>Anticarsia gemmatilis</i> MNPV	39
5. Produção de Baculovírus em Sistemas <i>in vitro</i>	40
5.1. Efeito Passagem	42
5.1.1. Vírus interferentes defectivos (DI)	43
5.1.2. Mutantes FP (<i>Few Polyhedra</i>)	44
5.2. Gene <i>25k fp</i>	47
5.3. Deficiência na oclusão viral	49
5.4. Variantes MP (<i>Many Polyhedra</i>)	51
6. Produção de baculovírus em alta escala (Biorreatores)	52
JUSTIFICATIVA	55
OBJETIVO GERAL	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
MATERIAIS E MÉTODOS	57
1. Vírus e inseto hospedeiro	57
2. Linhagens celulares e meio de cultura	57
3. Passagem serial de AgMNPV-2D	58
3.1. Obtenção do inóculo viral inicial (hemolinfa)	58
3.2. Infecção inicial (P1) em cultura de células	59
3.3. Passagem serial do vírus AgMNPV-2D	59
3.4. Microtitulação (TCID ₅₀)	61
3.5. Determinação da porcentagem de células com poliedros	61
3.6. Determinação do número de poliedros por célula	62
3.7. Alterações morfológicas - análise por microscopia	62
3.7.1. Microscopia eletrônica	63
4. Seleção de clones	63
4.1. Seleção de clones FP	64
4.2 Seleção de clones MP	65
4.3. Multiplicação dos clones em células IPLB-SF 21AE	65
5. Purificação de DNA viral	66
5.1. Extração de DNA a partir de partículas BV	66
5.2. Clivagem do DNA viral com enzima de restrição	67
6. Marcação radioativa de proteínas dos clones FP	67
7. Análise do gene <i>25k fp</i>	68
7.1 Amplificação do gene <i>25k fp</i> pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	68
7.2 Clonagem de fragmentos obtidos por PCR (gene <i>25k fp</i>)	69
7.3. Sequenciamento do fragmento correspondente ao gene <i>25k fp</i> dos clones FP	70
RESULTADOS	72
1. Efeitos citopáticos durante a passagem serial do vírus	72
1.1. Perfil da porcentagem de células com poliedros	73
1.2. Produção de poliedros por célula	78
1.3 Análise ultraestrutural das células infectadas da passagem serial	80
2. Análise comparativa do DNA viral produzido durante passagem serial de AgMNPV	83
3. Produção de partículas BV durante as passagens virais	84
4. Seleção de clones FP	85
5. Análise ultraestrutural de células infectadas com clones FP	87
6. Análise da síntese de proteínas dos clones FP	93

7. Sequenciamento do gene <i>25k fp</i> dos clones FP.....	94
8. Seleção de clones MP	99
DISCUSSÃO	101
CONCLUSÕES	110
PERSPECTIVAS	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMNPV – *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

AgMNPV – *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*

BEV – vector expression baculovirus

BmNPV – *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*

BTI-Tn5B1-4 – Linhagem celular derivada do inseto *Trichoplusia ni*

BV – *Budded Virus* ou vírus extracelular

Ci (Curie) – unidade de radioatividade

cm – centímetro

DI – Vírus Interferentes Defectivos

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FP – *Few Polyhedra*

g – grama

GP64 – Glicoproteína de fusão das partículas BV

GV – *Granulovirus*

h – hora(s)

h p.i. – horas pós-infecção

HaSNPV – *Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus*

IPLB-Sf 21AE – Linhagem celular derivada do inseto *Spodoptera frugiperda*

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kb – kilobase = 1000 pares de base

kDa – kilodalton

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LdMNPV – *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus*

M – molar

min – minuto(s)

ml – mililitro(s)

mm – milímetro

mM – milimolar

MNPV – *Multiple Nucleopolyhedrovirus*

MOI – Multiplicidade de infecção

MP – *Many Polyhedra*

NPV – *Nucleopolyhedrovirus*

OB – *Occlusion body*

ODV – Vírus derivados do corpo de oclusão (*Occluded Derived Virus*)

OGM – Organismo geneticamente modificado

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

P(n) – número da passagem do vírus em células

p.i – pós-infecção

pb – pares de base

PBS – *Phosphate buffered saline*

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

pH – Potencial de hidrogênio

PIB – *Polyhedral Inclusion Body*

RNA – Ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease

rpm – rotações por minuto

s – segundo(s)

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SNPV – *Single Nucleopolyhedrovirus*

Taq polimerase – Polimerase de *Thermus aquaticus*

TCID₅₀ – 50% da dosagem infectiva em cultura de células

TAE – Tampão Tris-acetato EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TNMFH – Meio de cultura para células de inseto

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

U – unidade enzimática

UV – ultravioleta

V – volts

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

μl – microlitro = 10⁻⁶ litro

μm – micrômetro

ng – nanograma = 10⁻⁹ gramas

°C – graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos fenótipos virais BV e ODV.....	29
Figura 2 - Ilustração do ciclo de infecção dos baculovírus.....	32
Figura 3 - Esquema do processo de infecção por baculovírus em células de insetos.....	35
Figura 4 - Esquema da infecção inicial e passagem serial.....	60
Figura 5 - Células de <i>Trichoplusia ni</i> (Tn5B1-4). (A) Células não infectadas (controle), aumento 200X; (B) Células infectadas	73
Figura 6 - Passagem viral P3. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D), 72h p.i. de sobrenadante da passagem anterior (P2). Aumento de 320X.....	74
Figura 7 - Passagem viral P6. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D), 72h p.i., de sobrenadante da passagem anterior (P5).....	75
Figura 8 - Passagens virais P8 e P10. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D) 72h p.i.....	76
Figura 9 - Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4, 72h p.i.. Perfil da porcentagem de células com poliedros.....	77
Figura 10 - Perfil da porcentagem de células infectadas durante a passagem serial do clone viral AgMNPV-2D.....	78
Figura 11 - Passagem serial do clone AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4 Curva da produção de poliedros por célula.....	79
Figura 12 - Análise ultraestrutural de células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D nas passagens P2, P4, P6 e P8, 72h p.i.	81
Figura 13 - Análise ultraestrutural de células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D na passagem P10	82
Figura 14 - Análise do perfil de restrição do DNA genômico de AgMNPV das passagens: P1, P2, P4, P6 and P8.	83
Figura 15 – Células Tn5B1-4 infectadas com o vírus AgMNPV-2D e células Tn5B1-4 infectadas com clones FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5 respectivamente.....	86
Figura 16 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com AgMNPV-2D (vírus selvagem – P1). (A) Célula com poliedros no núcleo. (B) poliedros.	87

Figura 17 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone FP1.	88
Figura 18 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone FP2.	89
Figura 19 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone FP3.	90
Figura 20 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone FP4.	91
Figura 21 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone FP5.	92
Figura 22 - Síntese de proteínas em células Tn5B1-4 infectadas com clones FP e AgMNPV-2D.....	93
Figura 23 - Produto da amplificação do fragmento correspondente ao gene 25k fp dos clones FP.	94
Figura 24 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos.....	95
Figura 25 - Diagrama mostrando as regiões no genoma onde estão localizadas as sequências correspondentes dos genes das proteínas 25K e LEF9.....	98
Figura 26 - Produção de poliedros do inóculo inicial AgMNPV-2D, e dos clones virais MP2 e MP5.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais baculovirus registrados como bioinseticidas38

Tabela 2 - Produção de partículas BV durante passagem serial do baculovirus AgMNPV em células Tn5B1-484

Tabela 3 – Produção de partículas BV de variantes MP de AgMNPV100

RESUMO

Baculovírus são vírus de inseto com grande potencial de uso em programas de controle biológico principalmente devido ao seu apelo ecológico, uma vez que são altamente específicos ao inseto alvo e não apresentam toxicidade ao homem e ao meio ambiente. Sua produção tem sido feita basicamente pela sua multiplicação no inseto hospedeiro. Porém, a produção de baculovírus em cultivos celulares oferece vantagens em relação à multiplicação *in vivo* por ser um sistema controlável, estéril, com alta pureza do produto e por dispor de centenas de linhagens de células de inseto estabelecidas. No entanto, sucessivas passagens do vírus em cultura de células podem resultar em alterações genéticas levando à perda de virulência. A alteração mais comum refere-se à formação de mutantes FP (*Few Polyhedra*) devido a mutações no gene *25k fp*. O baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) vem sendo utilizado com sucesso como agente de controle da lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Entretanto, sua produção tem sido feita *in vivo* e pouco se conhece sobre sua produção em cultivos celulares. Nesse trabalho, os efeitos causados pela passagem do vírus AgMNPV em células BTI-Tn-5B1-4 foram estudados. A porcentagem de células contendo muitos poliedros manteve-se alta e constante até a quinta passagem. A partir desse ponto houve uma redução significativa na quantidade de células com muitos poliedros com concomitante aumento na quantidade de células com poucos poliedros. Em paralelo, houve um dramático aumento no título viral pela produção de vírus extracelulares (*budded virus*). Todos esses parâmetros associados à análise ultraestrutural caracterizam a geração de mutantes FP durante a passagem serial do vírus em cultura de células. Adicionalmente, os perfis de restrição do DNA viral obtido em diferentes passagens mostraram similaridade revelando a ausência de grandes

modificações genéticas, como deleções e inserções no genoma do vírus. A indicação da presença de alterações menores como mutações pontuais no locus do gene *25k fp* foi comprovada pela determinação da sequência nucleotídica deste gene nos mutantes selecionados (sobrenadante da sétima passagem). Mutações pontuais foram detectadas em três clones (FP1, FP3, FP4) na região do gene *25k fp*, incluindo sua região promotora, sendo que apenas um clone (FP5) não apresentou qualquer alteração nesse gene. Com base na cinética de síntese de proteínas utilizado marcação radioativa, uma redução na síntese da poliedrina (principal componente protéico dos corpos de oclusão) foi também observada em todos os clones do tipo FP em comparação com o vírus padrão. Além disso, a análise ultraestrutural dos clones FP revelou características típicas de formação de mutantes FP como células com poucos ou nenhum poliedro, produção de poliedros amorfos com baixo número de virions e formação de estroma virogênico com intensa produção de nucleocapsídeos. Finalmente, variantes *Many Polyhedra* (MP), apresentando um maior número de poliedros por célula e um título de *budded virus* similar ao vírus parental, foram selecionados como parte de uma estratégia para produção do vírus em escala maior em cultivos celulares (biorreatores).

ABSTRACT

Baculovirus are insect viruses with great application potential for biological control programs due mainly to their ecological appeal, once they are highly specific to the host insect and do not present toxicity to man and to the environment. Their production has been made basically by their multiplication in host insects. Nevertheless, baculovirus production in cell cultures offers advantages over the *in vivo* multiplication for being a controllable, sterile, high pureness product yield process besides the fact of hundreds of cell lines being already established. However, successive passages of the virus in cell culture result in genetic alterations leading to loss of virulence. The most common alteration is the FP (Few Polyhedra) mutants formation due to mutations in the *25k fp* gene. *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) baculovirus is being used successfully as control agent of the soybean caterpillar (*A. gemmatalis*). However, its production has been made *in vivo* and little is known on its production in cell cultures. In this work, the effects caused by the passage of the AgMNPV in BTI-Tn-5B1-4 cells was studied. The percentage of cells containing many polyhedra remained high and constant until the fifth passage. From this point on there was a significant reduction in the amount of cells with many polyhedra with concomitant increase in the amount of cells with few polyhedra. In parallel, there was a dramatic increase in the viral titer by production of extracellular virus (*budded virus*). All these parameters associated to the ultra structural analysis characterize the FP mutants generation during serial passage of the virus on cell culture. Additionally, there was similarity in the viral DNA restriction endonuclease digestion profile of different passages revealing no significant genetic modifications, such as deletions and insertions. The indication that small alterations, such as point mutations, present in the *25k fp* gene

locus was confirmed by this gene nucleic sequence determination in the selected mutants (seventh passage of supernatant). Point mutations in the *25k fp* gene region were detected in three clones (FP1, FP3 and FP4), including its promoter region, and only one clone (FP5) did not present any alteration in this gene. Based on the protein synthesis kinetics using radioactive labeling, a reduction in the polyhedrin synthesis (the main component of the occlusion bodies) in all FP clones was also observed in comparison to the standard virus. Moreover, the ultra structural analysis of the FP clones disclosed typical characteristics of FP mutants formation such as cells with few or no polyhedra, amorphous polyhedra production with low virions number and virogenic stroma formation with intense nucleocapsid production. Finally, Many Polyhedra (MP) variants, presenting a larger number of polyhedra per cell and a similar to the parental virus budded virus titer, were selected as part of a strategy for a larger viral scale up production in cell culture (bioreactors).

INTRODUÇÃO

1. Baculovírus: Características Gerais

Baculovírus compreendem o maior grupo de vírus patogênicos a artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidóptera, Hymenoptera e Díptera (Theilmann *et al.*, 2005). Mais de 700 baculovírus têm sido descritos infectando invertebrados, incluindo espécies de insetos da ordem Coleoptera, e crustáceos da ordem Decapoda. Muitos desses são considerados ou realmente usados como agentes de biocontrole de insetos-praga (Moscardi, 1999). Apresentam alta especificidade, considerando que possuem uma faixa de hospedeiros restrita a poucas espécies estritamente relacionadas, sendo portanto, inofensivos a vertebrados, plantas ou outros invertebrados e microrganismos (Moscardi, 1990; Tanada e Kaya, 1993). Esses vírus são utilizados para o controle biológico de algumas pragas em culturas agrícolas, pomares de frutas e áreas florestais (Szewczyk *et al.*, 2006).

Os baculovírus, além de seu potencial uso como agentes de controle biológico, têm sido bastante utilizados na indústria biotecnológica como sistemas de expressão de proteínas eucarióticas biologicamente ativas (Douris *et al.*, 2006). Uma grande variedade de proteínas de importância na área agrícola e farmacêutica, incluindo vacinas e diagnósticos para a saúde animal e humana, têm sido expressas em níveis elevados, em células de insetos usando baculovírus como vetores de expressão (Luckow e Summers, 1988; Luckow, 1990; O'Reilly *et al.*, 1992; Kost *et al.*, 2005, Van Oers, 2006). As células de inseto são capazes de realizar glicosilação, fosforilação,

oligomerização e outras modificações pós-traducionais (em proteínas) distintas de sistemas bacterianos (Vialard *et al.*, 1995).

Um outro potencial de utilização dos baculovírus é como vetor de transferência para terapia gênica em células de mamíferos (Boyce e Bucher, 1996; Hofmann e Strauss, 1998; Liang *et al.*, 2004; Tani *et al.*, 2003). Os baculovírus entram nas células animais liberando o material genético no núcleo, sem a ocorrência de replicação viral. Algumas vantagens específicas dos baculovírus como vetor são: a falta de toxicidade e replicação, capacidade de clonagem de grandes fragmentos de DNA e sua facilidade de construção e produção (Hu, 2006).

Recentemente, a produção de imunogênicos eficientes tem sido possível devido a uma nova estratégia denominada *Baculodisplay* que consiste na fusão de proteínas de interesse a glicoproteína GP64 de baculovírus, presente na membrana da célula hospedeira (Kost *et al.*, 2005).

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae* e possuem DNA dupla fita, circular, variando de tamanho entre 80 a 180 kilobases (kb), cujo genoma codifica de 100 a 200 proteínas. Os genes que codificam essas proteínas estão envolvidos na replicação e transcrição do DNA, estrutura do vírus e outras funções voltadas para o estabelecimento e reprodução do vírus (Arif, 1986; Blissard *et al.*, 2000; Theilmann *et al.*, 2005). O DNA viral se condensa dentro do capsídeo em uma estrutura protéica denominada *core* e este conjunto é referido como nucleocapsídeo. Os nucleocapsídeos são envelopados formando os vírions que ficam embebidos em uma matriz protéica conhecida por corpo de oclusão (OB – *occlusion body*) que os protege de condições

ambientais adversas (Miller, 1997; Rohrmann, 1999). A exposição do vírus à luz solar do ambiente de campo ou à luz UV, prejudicam a atividade viral devido à desidratação e inativação do seu DNA (Szewczyk *et al.*, 2006).

Os baculovírus estão subdivididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) devido ao tamanho, morfologia e formação protéica dos seus corpos de oclusão. As proteínas de oclusão, principalmente a poliedrina para os NPV e granulina para GV, correspondem cerca de 95% do conteúdo protéico das partículas OB, variando de 25-33kDa (Theilmann *et al.*, 2005).

Nos *Nucleopolyhedrovirus*, os corpos de oclusão possuem formato poliédrico e podem medir de 0,15 a 15µm (Rohrmann, 1986). Essas partículas OB são comumente chamadas de poliedros e podem conter vírions com um único nucleocapsídeo (*single* – SNPV) ou com dois ou mais nucleocapsídeos por envelope, sendo do tipo múltiplo (*multiple* – MNPV). O envelopamento e montagem dos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo das células hospedeiras (Theilmann *et al.*, 2005).

Nos *Granulovirus*, os corpos de oclusão são pequenos grânulos com formato oval, variando em tamanho de 0,3 a 0,5µm, geralmente, contendo em seu interior uma partícula viral (ou, mais raramente, duas). Estas partículas são montadas entre os conteúdos nuclear e citoplasmáticos da célula após a ruptura da membrana nuclear de células infectadas (Theilmann *et al.*, 2005).

Trabalhos mais recentes têm mostrado que a divisão dos baculovírus baseada na morfologia das partículas de oclusão não reflete a história evolucionária dos NPV (Herniou *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2006a).

Estudos filogenéticos revelaram que o gênero NPV da família *Baculoviridae* pode ser subdividido em dois grupos: NPV do grupo I e NPV do grupo II. Partículas *Budded Virus* do grupo I de NPV contêm a glicoproteína GP64 como a principal proteína do envelope, no entanto, outra proteína de fusão do envelope denominada proteína F (*open reading frame* - ORF *Id-130*) é característica de NPV do grupo II (Pearson *et al.*, 2000; Herniou *et al.*, 2001). Subdivisões desses grupos foram propostas com base na análise filogenética das seqüências dos aminoácidos da poliedrina e da DNA polimerase (Zanotto *et al.*, 1993; Bulach *et al.*, 1999; Dalmolin *et al.*, 2005).

Herniou e colaboradores (2004) demonstraram uma clara divisão dos baculovírus com base no inseto hospedeiro e consideraram a possibilidade de um ou dois novos gêneros. Determinaram então que NPV de Diptera e Hymenoptera são grupos filogeneticamente separados dos grupos NPV e GV de Lepidoptera.

Recentemente, Jehle e colaboradores (2006b), utilizando-se de uma análise filogenética comparativa entre 29 genomas de baculovírus, propuseram uma nova classificação e nomenclatura para a família *Baculoviridae*, que foi subdividida em quatro gêneros de acordo com o tipo de inseto hospedeiro:

1. *Alfabaculovirus*: compreendem os SNPV e MNPV de lepidópteros que produzem ambos fenótipos virais, *Budded Virus* (BV) e *Occluded Derived Virus* (ODV).
2. *Betabaculovirus*: compreendem os GV de lepidópteros que produzem ambos fenótipos virais, BV e ODV.

3. *Gamabaculovirus*: compreendem os SNPV de himenópteros que não possuem genes para a formação da partícula BV, sugerindo sua ausência.
4. *Deltabaculovirus*: compreendem os NPV de dípteros que produzem ambos fenótipos virais, BV e ODV.

O baculovírus mais explorado em termos de conhecimento de sua biologia molecular, é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) isolado da lagarta de alfafa. Seu genoma possui 134 kb e contém 154 ORF codificando aproximadamente 150 genes (Ayres *et al.*, 1994). A maioria dos estudos com AcMNPV foi possível principalmente devido a sua fácil propagação em células de insetos e ampla abrangência de insetos hospedeiros alcançando cerca de 145 espécies (Goulson, 2003).

2. Ciclo de Infecção

Duas formas virais são necessárias para completar o ciclo de infecção no inseto hospedeiro: o vírus extracelular (BV) e o vírus derivado de oclusão (ODV). Esses últimos são imersos dentro do OB, também chamado de poliedro nos *Nucleopolyhedrovirus*. BV e ODV são partículas infectivas envelopadas e geneticamente idênticas, mas diferem quanto à morfologia e composição protéica, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e infectividade (Blissard e Rohrmann, 1990; Rohrmann, 1992; Braunagel e Summers, 1994). Essas diferenças conferem distintos papéis funcionais aos fenótipos BV e ODV (Blissard, 1996).

Os BV são formados por um único nucleocapsídeo com envelope derivado da

membrana plasmática do hospedeiro (de onde brotam) que é modificado por uma ou mais proteínas virais, sendo a GP64 a principal proteína do envelope. Os ODV são constituídos por um ou múltiplos nucleocapsídeos envolvidos por um envelope originado do núcleo da célula composto por numerosas outras proteínas virais diferentes do envelope dos BV (Braunagel *et al.*, 2003).

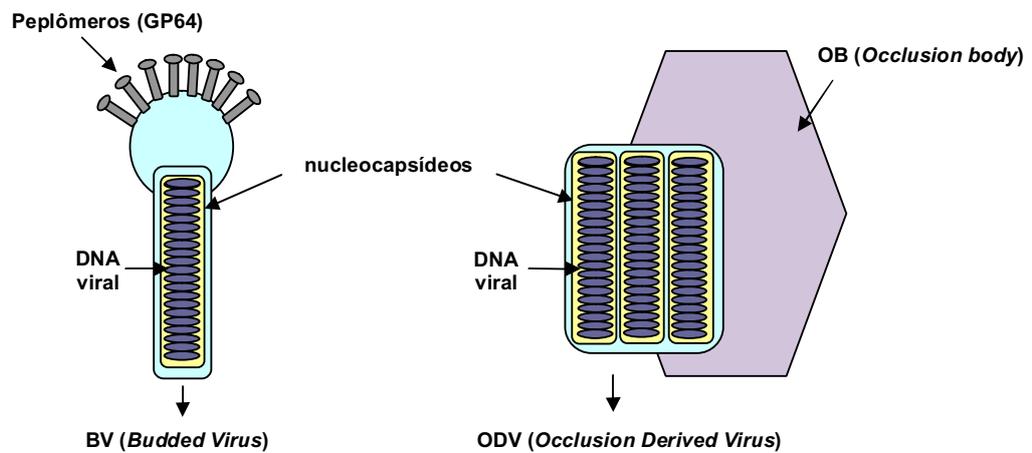


Figura 1 - Estrutura dos fenótipos virais BV e ODV.

As partículas BV e ODV possuem especificidade distinta para infectar diferentes tecidos. O envelope do ODV parece ser especializado em interagir com a poliedrina e é altamente infeccioso para as células epiteliais colunares do intestino do inseto, enquanto o envelope do BV é especializado em infectar células da hemocele e outras células do inseto, assim como células em cultura. Além disso, as partículas virais utilizam diferentes modos de penetração para entrar nas células hospedeiras. Os ODV entram por fusão do envelope viral com as microvilosidades das células colunares e os BV entram nas células por endocitose adsortiva mediada por receptor (Blissard e Rohrmann, 1990, Volkman e Goldsmith, 1985).

Em uma infecção natural (Figura 2), o inseto hospedeiro ingere corpos de oclusão (OB) como contaminantes de seu alimento. A matriz protéica é solubilizada no ambiente altamente alcalino (pH 10 - 11) do intestino médio da larva liberando as partículas virais (ODV) (Blissard e Rohrmann, 1990; Blissard, 1996; Miller 1997; Volkman 1997). Os ODV liberados no intestino atravessam a membrana peritrófica e ligam-se às células colunares epiteliais mediados por receptores presentes no envelope lipoprotéico das células (Horton e Burand, 1993; Haas-Stapleton *et al.*, 2004) onde se fundem às microvilosidades dessas células liberando nucleocapsídeos no citoplasma e estabelecendo a infecção primária (Keddie *et al.*, 1989).

Os nucleocapsídeos atingem o núcleo das células, por um mecanismo mediado por filamentos de actina (Charlton e Volkman, 1993), onde são desnudados liberando o DNA viral e iniciam o processo de replicação do vírus.

Nucleocapsídeos de progênie MNPV provenientes de ODV atravessam o citoplasma da célula, brotam da membrana celular adquirindo um envelope lipoprotéico, atuando como BV e infectando as células da hemocele ou da epiderme traqueal estabelecendo a infecção primária nestas células. Este mecanismo parece ser uma vantagem seletiva dos MNPV em relação aos SNPV uma vez que outras células foram primariamente infectadas antes que se completasse a replicação do vírus nas células alvo primárias (Washburn *et al.*, 2003).

Com a replicação, as partículas virais produzidas migram para o citoplasma atingindo a membrana plasmática de onde brotam adquirindo um envelope e formando os BV. Os BV produzidos são liberados na hemocele e infectam outras células no

organismo. São, portanto, os responsáveis pelo espalhamento sistêmico da infecção dentro do hospedeiro e ao infectarem novas células e tecidos produzem a infecção secundária. Os BV também são as partículas infectivas responsáveis pela infecção em cultura de células (Blissard e Rohrmann, 1990).

Com o progresso da infecção, nucleocapsídeos que se acumulam são envelopados *de novo* no núcleo por uma membrana, que acredita-se ser derivada da própria membrana nuclear, e envoltos por uma matriz protéica cristalina gerando os corpos de oclusão (OB) que se acumulam no núcleo das células infectadas. Os corpos de oclusão (poliedros) são liberados durante a lise celular no final do ciclo de infecção (Blissard e Rohrmann, 1990; Hong *et al.*, 1994).

Em estudos com larvas de lepidópteros infectadas com NPV, observou-se que, em geral, a infecção leva a uma série de mudanças comportamentais e morfológicas que culminam na morte da larva após alguns dias. Há uma redução na alimentação larval e retardo do crescimento do inseto, sendo que na maioria das vezes não ocorre a mudança de instar. Além disso, o inseto perde a coloração original do tegumento, tornando-se mais claro. No estágio terminal da infecção duas proteínas virais, catepsina e quitinase, atuam em conjunto para facilitar a desintegração da cutícula do hospedeiro (Hawtin *et al.*, 1997).

Após a morte, a cutícula da larva se desintegra e rompe liberando grandes quantidades de OB no ambiente. Estes servem de inóculo para infectar novas populações do inseto hospedeiro (Granados e Federici, 1986; Volkman e Keddie, 1990). Os OB são responsáveis pela transmissão horizontal do vírus (inseto - inseto).

Devido ao fato da partícula viral ODV ser a responsável pela infecção primária de células do intestino médio da lagarta, o estudo da quantidade e qualidade dessas partículas na formação dos OB, assim como da quantidade e qualidade dos OB, são de fundamental importância para a investigação da virulência do baculovírus.

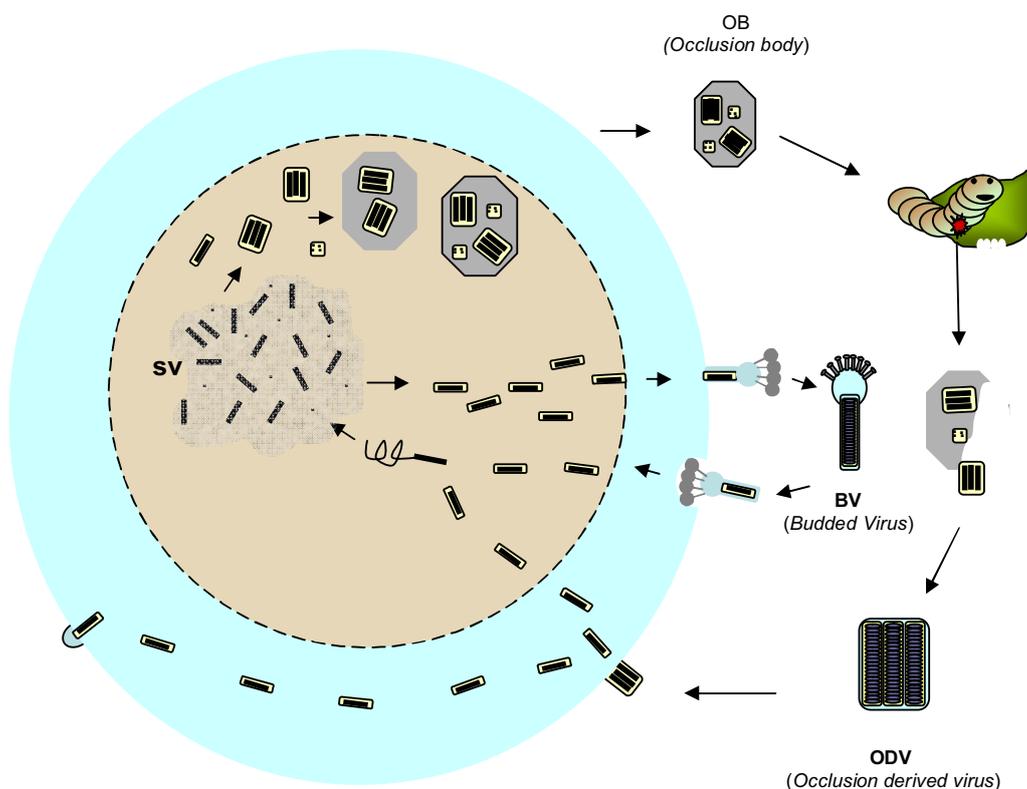


Figura 2 – Ilustração do ciclo de infecção dos baculovírus. (sv – estroma virogênico). A lagarta ingere OB que se dissolve no intestino liberando partículas infectivas de ODV responsáveis pela infecção primária da célula. Com a replicação viral na região do sv são formados nucleocapsídeos que podem ter 2 destinos: adquirir um envelope ao brotar da membrana citoplasmática e formar o BV, ou ser envelopado no núcleo e envolto por uma matriz protéica formando o OB. Alguns ODV de progênie MNPV podem atravessar o citoplasma da célula colunar e estabelecer infecção primária em outros tipos celulares.

3. Replicação Viral em Cultura de Células

3.1 Replicação do vírus e morfogênese viral

A maioria dos estudos de replicação viral e morfogênese tem sido baseados em sistemas utilizando linhagens de células derivadas de *Trichoplusia ni* e *Spodoptera frugiperda* infectadas pelo vírus AcMNPV (Volkman e Summers, 1977; Volkman e Knudson, 1986; Williams e Faulkner, 1997; Hefferon e Miller, 2002). No entanto, replicações de outros baculovírus têm sido relatadas: BmNPV (Rahman e Gopinathan, 2004); HaSNPV (Lua e Reid, 2000; 2003); LdMNPV (Slavicek *et al.*, 1992) e AgMNPV (Castro *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2006).

O processo de replicação dos *Nucleopolyhedrovirus* em cultura de células acontece de forma similar à replicação *in vivo* resultando na formação de duas progênes infecciosas. Porém, em cultivos celulares os BV são os principais responsáveis pela infecção por serem até duas mil vezes mais infecciosos que os ODV (Keddie e Volkman, 1985). Portanto, a infecção em cultura de células é iniciada com BV obtido diretamente da hemolinfa de insetos infectados ou do sobrenadante de cultura de células (Volkman e Knudson, 1986).

Para os baculovírus do Grupo I dos NPV, essa função é mediada por uma proteína de envelope, conhecida como GP64. Essa glicoproteína constitui o principal componente dos pleplômeros, uma estrutura em forma de projeções presente na superfície do nucleocapsídeo dos BV (Blissard, 1996). Recentemente, Zhou e Blissard (2008) demonstraram que a entrada do vírus envelopado nas células hospedeiras é tipicamente iniciada pela interação entre uma glicoproteína de envelope viral e um

receptor da célula hospedeira.

Em cultura de células, o ciclo de replicação pode ser dividido em três fases temporais: inicial (*early*), tardia (*late*) e muito tardia (*very late*). Estas fases correspondem à reprogramação da célula para a replicação viral, produção de BV e produção de OB (O'Reilly *et al.*, 1992; Blissard, 1996). A transição entre as fases conta com uma cascata transcricional em que cada fase sucessiva é dependente da expressão de genes da fase anterior (Kool *et al.*, 1995; Arhens *et al.*, 1995).

A fase inicial (*early*) começa com a entrada do vírus na célula e se estende até replicação do DNA viral (0 – 6h p.i.). No início dessa fase, os genes virais são transativados por fatores transcricionais do hospedeiro (RNA polimerase do hospedeiro) não necessitando das proteínas virais. No final, as proteínas virais produzidas ativam os genes necessários para a replicação do DNA viral e transcrição de genes tardios (Hefferon e Miller, 2002).

A fase seguinte (*late*) é caracterizada pela produção de BV, inicia com a replicação do DNA viral e se estende até o início da transcrição dos genes *very late* (6 – 12h p.i.). No início dessa fase ocorre a hipertrofia do núcleo, seguido de alteração progressiva da forma celular (arredondamento) concomitante com a mudança na distribuição da cromatina e da morfologia nucleolar. Em seguida, há uma extensiva replicação do DNA viral, síntese de proteínas estruturais do nucleocapsídeo e intensa produção de BV. Durante esta fase o estroma virogênico é formado no núcleo indicando a alta produção de partículas virais. Os vírions migram pelo citoplasma e interagem com a membrana plasmática de onde brotam adquirindo um envelope e formando os BV (Volkman e Knudson, 1986, Williams e Faulkner, 1997).

A última fase da replicação viral (*very late*) inicia com a transcrição dos genes *very late* e termina com a lise celular e liberação dos OB (12 – 72h p.i.), (Lu e Miller, 1997). Com a transcrição dos genes *very late* a produção da partícula BV é reduzida, e os nucleocapsídeos produzidos no núcleo da célula adquirem um envelope que pode englobar apenas uma partícula (SNPV) ou várias partículas (MNPV). Os nucleocapsídeos assim produzidos são embebidos em uma matriz formada principalmente pela proteína poliedrina acumulando-se no núcleo das células (O'Reilly *et al.*, 1992).

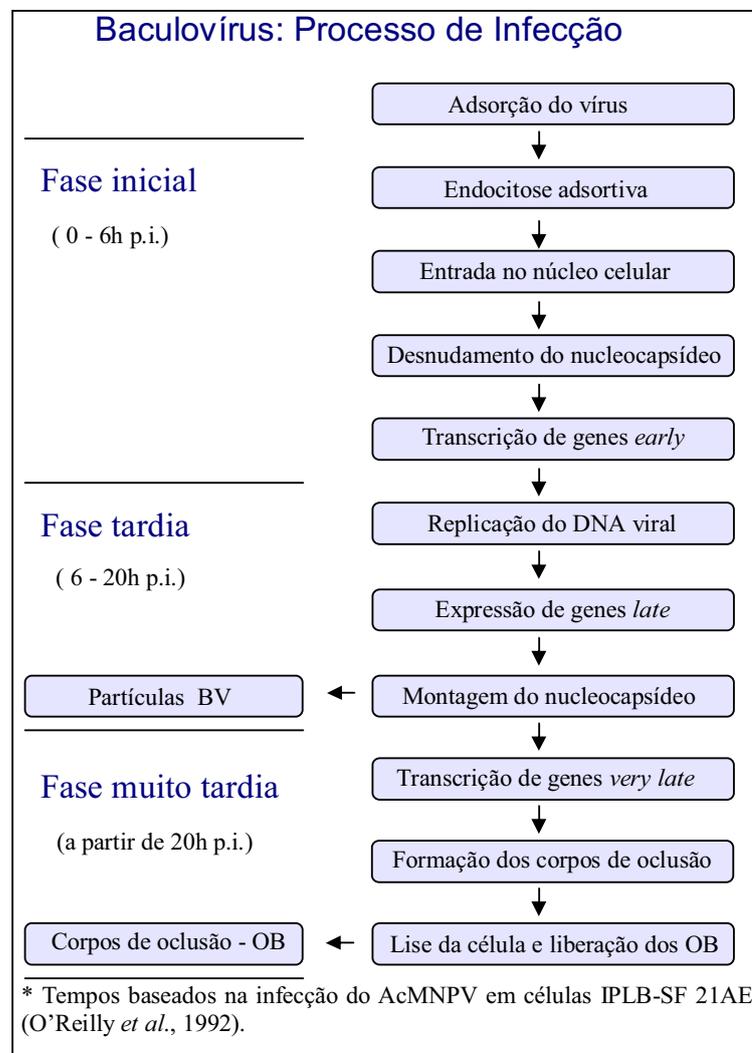


Figura 3 - Esquema do processo de infecção por baculovírus em células de insetos. Figura modificada com base em Acharya *et al.* (2002).

A literatura relata o estabelecimento de cerca de 500 linhagens celulares provenientes de mais de 100 espécies de insetos (Lynn, 1999) as quais apresentam diferente permissividade para replicação viral. Uma linhagem é permissiva quando há replicação e todas as etapas do ciclo viral são executadas, culminando na produção de corpos de oclusão e na lise da maioria das células infectadas. Linhagens semipermissivas permitem a replicação parcial do vírus nas células, possivelmente devido a restrições em diferentes estágios do ciclo (Bilimoria *et al.*, 1992). Linhagens abortivas são aquelas em que o vírus pode ou não induzir efeitos citopáticos, mas não há produção de partículas infectivas (Carpenter e Bilimoria, 1983; Liu, 1987).

Estudos de especificidade e espectro de hospedeiros têm sido realizados em diferentes linhagens de células de insetos, utilizando vírions BV obtidos a partir do sobrenadante de células ou da hemolinfa de insetos infectados (Knudson e Tinsley, 1974; Volkman e Summers, 1977; McIntosh *et al.*, 2005).

A infectibilidade é um aspecto da replicação viral que pode variar entre as linhagens celulares. Lynn (2003a; 2003b) comparou 12 linhagens de células de insetos quanto a susceptibilidade de infecção por BV e ODV dos vírus AcMNPV, AfMNPV e AgMNPV. As diferentes linhagens celulares exibiram diferenças de infectividade por BV e ODV. A infectividade do AgMNPV em cultura de células também tem sido investigada para outras linhagens de células. A linhagem BTI-Tn-5B1-4 de *Trichoplusia ni* mostrou ser altamente produtiva, em quantidade de poliedros e formação de BV para o vírus AgMNPV, assim como a linhagem UFL-AG-286 de *Anticarsia gemmatalis* (hospedeiro natural de AgMNPV) (Castro *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2006).

4. Baculovírus como Agente de Controle Biológico

O uso de pesticidas químicos tem várias conseqüências indesejáveis, incluindo o desenvolvimento de hospedeiros resistentes, a redução da fertilidade do solo e efeitos adversos na saúde de organismos não-alvo. Em contraste, os baculovírus podem ser usados como inseticidas biológicos como alternativa aos inseticidas químicos, sendo seguros à saúde humana e ao meio ambiente (Weiss *et al.*, 1994).

A maioria dos baculovírus usados como agentes de controle biológico pertencem ao gênero *Nucleopolyhedrovirus*. Estes vírus são altamente específicos e virulentos aos seus hospedeiros, e infectam principalmente representantes da ordem Lepidoptera (Castro *et al.*, 1999).

O uso de baculovírus como bioinseticida tem sido intensivamente relatado. Por mais de 20 anos os baculovírus têm sido comercializados para o controle de pragas (Wood e Granados, 1991; Moscardi 1999; Moscardi *et al.*, 2002; Moscardi e Souza, 2002; Moscardi e Santos, 2005; Szewczyk *et al.*, 2006).

Apesar de baculovírus serem mundialmente utilizados como inseticida comercial, sua expansão tem sido prejudicada por fatores como: demora na morte do inseto, inativação do inseticida pela radiação solar, dificuldades técnicas de produção do vírus e custo de produção do bioinseticida (Moscardi, 1999).

A tabela a seguir apresenta alguns vírus utilizados em diferentes países como bioinseticidas para controle de pragas.

Tabela 1- Principais baculovirus registrados como bioinseticidas

Espécie de Inseto	Baculovirus	Cultura	País/Região
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	maçã	Suíça
<i>Agrotis segetum</i>	GV	cenoura, algodão	Dinamarca, Rússia
<i>Anagrapha falcifera</i>	NPV	algodão, hortaliças	EUA
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	NPV	soja	Brasil, Paraguai
<i>Autographa californica</i>	NPV	algodão, hortaliças	EUA, China
<i>Cydia pomonella</i>	GV	maçã, pêra	Europa, EUA, Rússia
<i>Dendrolimus sibiricus</i>	NPV	pinheiros, floresta	Rússia
<i>Erinnyis ello</i>	GV	mandioca	Brasil
<i>Helicoverpa spp.</i>	NPV	algodão, hortaliças, leguminosas	EUA, China, Rússia, Tailândia, Austrália, Índia
<i>Homona magnanima</i>	GV	chá	Japão
<i>Hypantiria cunea</i>	NPV e GV	frutíferas e parques	Bulgária, Rússia
<i>Leucoma salicis</i>	NPV	parques ornamentais	Rússia, Polônia
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	florestas	EUA, Canadá, Rússia
<i>Mamestra brassicae</i>	NPV	couve, ervilha, beterraba	Europa, Rússia, Bulgária
<i>Malacosoma neustria</i>	NPV	frutíferas, parques	Rússia
<i>Neodiprion lecontei</i>	NPV	florestas	Canadá
<i>Neodiprion sertifer</i>	NPV	pinheiro	EUA, Europa, Rússia
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	florestas	EUA, Canadá
<i>Pieris rapae</i>	GV	hortaliças	China
<i>Spodoptera litura</i>	NPV	algodão, hortaliças	China
<i>Spodoptera littoralis</i>	NPV	algodão	África, França
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	hortaliças, ornamentais	EUA, Europa, Tailândia
<i>Spodoptera frugiperda</i>	NPV	milho	Brasil

(fonte: Chen, 2001; Moscardi e Souza, 2002)

Szewczyk *et al.* (2006) apresentaram duas propostas para melhorar a aplicação de baculovírus como biopesticida:

- Em países onde o uso de organismos geneticamente modificados (OGM) é restrito deve-se investir no desenvolvimento de processos de produção *in vitro* e de formulações do bioinseticida, além da melhoria de diagnósticos para identificação de baculovírus,
- Em países onde o uso de OGM é permitido deve-se investir na modificação genética de baculovírus existentes para melhoramento de suas características inseticidas tais como redução no tempo de mortalidade do inseto, aumento do espectro de hospedeiros.

4.1 *Anticarsia gemmatalis* MNPV

O *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi originalmente isolado de larvas de *A. gemmatalis* coletadas em Campinas - SP (Allen e Knell, 1977). A partir de 1979 o vírus foi produzido, formulado e aplicado para controlar a lagarta da soja, seu hospedeiro natural.

A aplicação do bioinseticida “Baculovírus anticarsia”, desenvolvido pela Embrapa Soja (Londrina – PR) para o controle da lagarta da soja no Brasil, representa o programa de maior sucesso no mundo com emprego de pesticida viral (Moscardi, 1999; Moscardi *et al.*, 2002). Foi introduzido no sul do País no início da década de oitenta e vem sendo aplicado em âmbito nacional, anualmente, em aproximadamente dois milhões de hectares de soja (Moscardi, 1983; Moscardi e Santos, 2005). O baculovírus anticarsia depende do inseto hospedeiro para sua replicação e sua produção *in vivo* é influenciada por fatores bióticos e abióticos que afetam a abundância do inseto

hospedeiro (Moscardi, 1999). Sua produção se dá por meio de insetos infectados no próprio campo de soja, em casas teladas ou criados em laboratório e alimentados com dieta artificial (Black *et al.*, 1997; Moscardi e Souza, 2002).

5. Produção de Baculovírus em Sistemas *in vitro*

A produção do biopesticida baculovírus pode ser feita em dois sistemas: poliedros podem ser multiplicados em uma lagarta viva (*in vivo*) ou o vírus pode ser replicado em cultura de células de inseto (*in vitro*). Todos os inseticidas, a base de baculovírus, comercialmente disponíveis são produzidos na própria lagarta.

Problemas como o controle de qualidade da produção *in vivo*, limitações no estabelecimento de criação de determinados insetos hospedeiros e a dificuldade em estabelecer uma produção que atenda a demanda de mercado têm estimulado o desenvolvimento da pesquisa e da produção *in vitro* de inseticida a base de baculovírus (Goodman e McIntosh, 1994; Shuler *et al.*, 1995).

A produção *in vitro* envolve o cultivo e infecção de células de insetos suscetíveis. Cultura de células de insetos tem tido diversas aplicações na virologia, incluindo o crescimento e replicação de baculovírus, assim como o estudo da biologia molecular e a genética das viroses. Além da utilização potencial de linhagens celulares de insetos para a produção de inseticidas virais, outras aplicações têm sido relatadas como a produção de vacinas e expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus como vetor de expressão (Smith *et al.*, 1983; Jarvis, 1997; Marks, 2003).

A cultura de células em suspensão pode ser realizada em frascos shaker-Schott e em frascos spinner, para pequenos volumes de suspensão ou em biorreatores quando se quer produzir grandes volumes de suspensão.

Rodas *et al.* (2005) desenvolveu parâmetros para otimizar a produção de poliedros do vírus AgMNPV em cultura de células Sf9 em frascos *shaker-Schott*. Este sistema em comparação ao sistema com frascos *spinner* permitiu uma taxa maior de transferência de oxigênio e apresentou melhores resultados de crescimento celular. Dependendo do valor de multiplicidade da infecção (MOI) utilizado houve variação do crescimento celular e da produção de poliedros, sendo que com o aumento do MOI estas taxas decresciam. A maior produção de poliedros foi de 8×10^7 OB/ml (com MOI de 0,1) e a maior quantidade de poliedro por célula foi de 18,3 OB/célula (com MOI de 1).

Visando a produção do vírus AgMNPV, Gioria e colaboradores (2006) adaptaram células UFL-AG-286 ao crescimento em cultura de suspensão com frascos *spinner*. Essas células não formavam agregados e foram suscetíveis à infecção pelo vírus AgMNPV. Desta forma, obteve-se alta produção de suas progênes virais: BV ($6,3 \times 10^8$ Pfu/ml) e de OB ($5,8 \times 10^7$ OB/ml e 64 OB/célula).

O sistema de produção do baculovírus em cultura de células é uma alternativa para a produção de vírus e apresenta diversas vantagens: é controlável, resulta em um produto com maior pureza e em grandes quantidades. Além disso, linhagens celulares podem ser testadas, selecionadas e adaptadas para produção em larga escala onde condições fisiológicas podem ser controladas e voltadas para um ótimo crescimento celular, o que melhora a produção viral. Vírus produzidas em cultura de células são

livres de agentes contaminantes, grandes proteínas e cutícula de insetos e seu produto final não é alergênico a humanos (Weiss *et al.*, 1994).

Até o momento, a produção de baculovírus em células de insetos em larga escala (biorreatores) não tem sido viável comercialmente. Uma das principais causas é a perda de virulência durante passagens seriadas necessárias ao processo de aumento da produção (*scaling up*) do patógeno (Weiss *et al.*, 1994; Slavicek *et al.*, 1995; Moscardi e Souza, 2002). No entanto, para que a produção de baculovírus em cultura de células seja viável comercialmente, é necessário que haja a produção de OB virulentos e a diminuição do custo de produção do produto final.

5.1. Efeito Passagem

A acumulação de alterações genômicas de baculovírus através de ciclos de replicação em insetos, cultivos celulares ou em biorreatores é denominada “efeito passagem” (Faulkner, 1981; Krell, 1996). Grandes mudanças no genoma do baculovírus aparecem durante a passagem serial em cultura de células (Lua *et al.*, 2002).

Durante a multiplicação do vírus em cultivos celulares há uma grande plasticidade genômica devido ao alto número de partículas virais produzidas durante cada ciclo de replicação e ao curto tempo para geração da nova progênie. Devido a recombinações e erros de replicação do DNA, há certa probabilidade de erro a cada passagem levando o genoma do baculovírus a mutações pontuais, deleções, rearranjos, inversões, reiteraões e aquisição de DNA da célula hospedeira (Krell, 1996).

Algumas dessas alterações são silenciosas e conferem vantagem seletiva, outras são letais e, portanto, eliminadas com a passagem. Entretanto, algumas alterações podem aumentar a vantagem replicativa do vírus de tal forma que o vírus mutante passa a competir com o genótipo original do vírus durante passagens sucessivas. Aquelas alterações genótípicas que aumentam a capacidade replicativa do vírus em células hospedeiras, ou insetos, são amplificadas em cada passagem e eventualmente passam a dominar o genótipo original (Krell, 1996).

Mutações comuns, devido ao efeito passagem são: formação de vírus interferentes defectivos (DI) e de Mutantes FP (*Few Polyhedra*). Ambas se tornam predominantes em relação ao vírus parental e reduzem a produção de poliedros drasticamente (Gooijer *et al.*, 1989; Kumar e Miller, 1987). Devido à diminuição da virulência de poliedros, a importância do efeito passagem na produção de um patógeno viral eficiente para o controle de insetos tem sido investigada (Payne, 1988).

5.1.1. Vírus interferentes defectivos (DI)

Vírus interferentes defectivos são formados por deleções sequenciais e acumulativas do DNA viral resultando em grandes perdas do genoma padrão e necessitam de um vírus auxiliar para sua replicação. Esses vírus contêm apenas parte do genoma viral, replicam mais rapidamente (pois são menores), precisam de um vírus intacto capaz de produzir as proteínas necessárias à replicação viral e competem com a replicação do vírus padrão (Bangham e Kirkwood, 1990). A maioria das partículas defectivas está presente em altas passagens do vírus, e é produzida rapidamente quando é usado um alto valor de multiplicidade de infecção (MOI). A concentração do DI aumenta em relação ao vírus original e, portanto o título do vírus parental vai

declinando a cada passagem. É comum a ocorrência de grandes deleções no genoma dessas partículas (Pijlman *et al.*, 2001).

O acúmulo de vírus DI de baculovírus com grandes deleções parece ser um fenômeno geral. Foi inicialmente observado por Koll *et al.* (1991), após passagem seriada de AcMNPV-E2 em células Sf21, a acumulação de DI contendo uma deleção principal de aproximadamente 43% (d43) do DNA genômico. A região deletada possui genes que estão envolvidos com a replicação do DNA de baculovírus, tais como *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, e DNA polimerase (Kool *et al.*, 1995; Lu e Miller, 1995). Em trabalhos anteriores foi demonstrada a geração de DI de AcMNPV com deleções similares a essas (Carstens, 1982; Lee e Krell, 1992; Van Lier *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1991). Da mesma forma, partículas DI após infecção com *Bombyx mori* NPV (BmNPV) apresentaram deleções semelhantes nesta região (Hashimoto *et al.*, 1993; Yanase *et al.*, 1998).

Com relação a estudos com AgMNPV, Rodas *et al.* (2005) detectaram a geração de partículas interferente defectivas durante a passagem serial deste vírus em células Sf9, de *Spodoptera frugiperda*, em suspensão. Com a passagem houve a perda de virulência, um decréscimo no número de poliedros produzidos, diminuição do título de BV e alteração no padrão de restrição do DNA viral.

5.1.2. Mutantes FP (*Few Polyhedra*)

O fenótipo do mutante FP é caracterizado por um decréscimo na produção total dos corpos de oclusão (OB), um decréscimo no número de corpos de oclusão por célula

infectada, um decréscimo no número de vírions oclusos em OB, alteração no envelopamento do nucleocapsídeo intranuclear e um aumento no número de OB morfológicamente anormais e ou menos virulentos (Hink e Vail, 1973; Harrison e Summers, 1995a; Slavicek *et al.*, 1995; Katsuma *et al.*, 1999a). A síntese de grandes quantidades de BV em comparação com o tipo selvagem do vírus (*Many Polyhedra*) também é observada em muitos casos (Potter *et al.*, 1978; Harrison e Summers, 1995a; Slavicek *et al.*, 1995).

A mutação FP confere um fenótipo dominante ao vírus sob condições de propagação em cultura de células (Fraser e Hink, 1982; Kumar e Miller, 1987; Cary *et al.*, 1989). Esta mutação já foi identificada em vários vírus como: *Autographa californica* MNPV (Hink e Vail, 1973), *Trichoplusia ni* MNPV (Potter *et al.*, 1976), *Galleria mellonella* MNPV (Fraser *et al.*, 1983), *Lymantria dispar* MNPV (Slavicek *et al.*, 1992), *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) (Russel e Rohrmann, 1993) e *Helicoverpa armigera* SNPV (HaSNPV) (Chakraborty e Reid, 1999; Lua *et al.*, 2002).

Durante a passagem serial do vírus, o aumento da produção de BV pode resultar em uma rápida conversão da população viral com fenótipo *Many Polyhedra* (MP) para a população com fenótipo *Few Polyhedra* (FP) (Slavicek *et al.*, 1995; Pedrini *et al.*, 2004). O fenótipo FP é selecionado por aumentar a produção de BV, essenciais para a replicação do vírus em células (Slavicek *et al.*, 1995; Harrison e Summers, 1995a, Bull *et al.*, 2003).

O resultado da passagem prolongada do baculovírus, *in vitro*, foi inicialmente demonstrado por MacKinnon *et al.* (1974) para o vírus *Trichoplusia ni* NPV em células

TN-368. Em passagens tardias (50 passagens) foram observados poucos poliedros desse vírus por célula e esses se apresentaram menos virulentos. Além disso, os poliedros formados foram morfológicamente alterados, sendo que os números de vírions oclusos em corpos de oclusão e de nucleocapsídeos produzidos também foram baixos.

Elementos transposons podem estar envolvidos na formação de mutantes FP. Fraser e colaboradores (1983) encontraram mutantes FP de AcMNPV e GmMNPV com reduzida oclusão viral e alterada morfologia de placa, isolados após passagem em células TN-368, devido a aquisição de fragmentos de DNA da célula hospedeira.

O número de passagens em que ocorre a mudança do tipo parental para o mutante FP varia em relação a diferentes sistemas célula-vírus. Uma rápida acumulação de mutantes FP (após somente duas passagens) foi observada por Slavicek *et al.* (1995; 1996) em *Lymantria dispar* MNPV e por Pedrini *et al.* (2004) em *Spodoptera frugiperda* MNPV. Lua *et al.* (2002), observaram este fenômeno após 6 passagens em *Helicoverpa armigera*. No entanto, para o vírus *Orgyia leucostigma* NPV esta mudança ocorreu somente após 41 passagens (Sohi *et al.*, 1984).

Sob condição de passagem serial (*in vitro*), a substituição da população MP pela FP, é devido provavelmente à mutação do vírus MP, seguida pela pressão de seleção do sistema de cultura de células, a qual favorece o crescimento do vírus FP. As partículas BV de ambas as populações matam os insetos quando injetados na hemocele, mas somente os corpos de oclusão MP são virulentos na infecção oral (Potter *et al.*, 1976).

5.2. Gene *25k fp*

Foi inicialmente sugerido que o gene *25k fp* afetava a taxa de formação do poliedro, que por sua vez afetava o tamanho da placa formada e a concentração de BV no sobrenadante de células em cultura (Potter *et al.*, 1976; Fraser e Hink, 1982). Experimentos de resgate confirmaram que as inserções na região de 500bp do fragmento *HindIII* – 4.95kb de AcMNPV estavam diretamente envolvidas em conferir o fenótipo FP e desde então ele tem sido designado locus FP (Fraser, 1987).

Foi também observado que a perda do gene *25k fp* resulta em morfologia aberrante do vírus e falta de envelopamento de vírions oclusos, entretanto experimentos de resgate confirmaram que esses fenótipos estão relacionados somente a mutações do gene *25k fp*. Mutantes FP de AcMNPV geralmente adquirem fragmentos do genoma da célula hospedeira (geralmente contendo transposon) e ou perdem ou uma porção do genoma viral (Harrison e Summers, 1995a).

O gene *25k fp* codifica uma proteína de 25kDa que é essencial para a oclusão viral e formação do poliedro (Beames e Summers, 1989). A proteína 25K está presente no citoplasma associada às massas citoplasmáticas amorfas e estruturas elétron-densas localizadas na periferia do núcleo de células infectadas (Harrison e Summers, 1995b). Atualmente, sabe-se que alterações nesse gene levam a geração de mutantes FP. A proteína 25K também foi identificada associada ao ODV (Braunagel *et al.*, 2003). Mutações no gene *25k fp* do vírus AcMNPV alteram a montagem da forma oclusa do baculovírus (Fraser, 1987; Harrison e Summers, 1995b).

Jarvis *et al.* (1992), demonstraram que o vírus AcMNPV mutante *25k* produz

menos poliedrina que o vírus selvagem. Harrison *et al.*(1996) demonstraram que a proteína 25K é necessária para a manutenção do nível de transcrição do gene da poliedrina, uma vez que mutações no gene *25k fp* causaram diminuição dos níveis de expressão da poliedrina.

A expressão do gene *25k fp* pode estar diretamente ou indiretamente relacionada à biossíntese e localização nuclear da proteína poliedrina. Jarvis *et al.* (1992), demonstraram que um vírus mutante FP de AcMNPV com gene *25k fp* inativado produziu menos poliedrina e em menor quantidade no núcleo, no início da fase de oclusão, do que um vírus selvagem.

A deleção parcial da ORF 61, correspondente ao gene *25k fp*, de AcMNPV altera a expressão, acúmulo e o transporte de proteínas do ODV para a membrana intranuclear durante a infecção. Houve redução em cinco vezes nos níveis da proteína E66 do mutante viral (sem o gene *25k fp*) quando comparado com células infectadas com o vírus selvagem, entretanto a super expressão do gene *25k fp* aumentou levemente a síntese dessa proteína (Braunagel *et al.*, 1999; Rosas-Acosta *et al.*, 2001).

Wu *et al.* (2005), construíram um vírus HaNPV recombinante com deleção do gene *25k fp* e utilizaram a técnica de resgate desse gene para estudos de função. Vírus recombinante com o gene *25k fp* deletado produziram alto título de BV e diminuição da produção de ODV em células infectadas. As células infectadas com o gene reintroduzido confirmaram que o aumento da produção de BV e o decréscimo da produção do vírus foram resultantes apenas da deleção do gene *25k fp*.

Alterações variando desde mutação pontual em uma única base do gene *25k fp* até deleção de regiões maiores, foram observadas em mutantes FP do baculovírus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (Katsuma *et al.* 1999a). Durante esse estudo, foi feita a construção do vírus BmNPV com deleção completa no gene *25k fp*, para avaliação funcional do gene em experimentos de *marker rescue*. Foi observado que, quanto maior a alteração na seqüência do gene, maior o bloqueio no processo de liquefação do inseto após sua morte. Além disso, a capacidade de ruptura da cutícula larval foi totalmente recuperada após resgate do gene *25k fp* do vírus selvagem. Recentemente, foi demonstrado que esse bloqueio está associado a não liberação da cisteína protease do vírus na hemolinfa do inseto (Katsuma *et al.*, 2004).

Recentemente, Kelly *et al.* (2006) ao isolarem um mutante do vírus AcMNPV com deficiência na produção da proteína P35 devido , encontraram também mutação no locus correspondente ao gene *25k fp*. Esse vírus mutante foi capaz de causar a formação de bolhas características de apoptose (formação de corpos apoptóticos) além de defectiva formação de poliedros em células infectadas TN-386. Apenas a inserção de uma base (A) no gene *25k fp* resultou em um códon de terminação e consequentemente produziu uma proteína 25K de 63 aminoácidos, enquanto a proteína 25K normalmente possui 214 aa. Essa mutação no gene *25k fp* combinado com a P35 não funcional foi a responsável pelo efeito de prolongamento e rompimento da membrana celular observado em células infectadas TN-386.

5.3. Deficiência na oclusão viral

Mutações em várias regiões do genoma do AcMNPV podem resultar em um

fenótipo FP. Harrison e Summers (1995a) sugerem que múltiplos genes podem estar envolvidos na formação do complexo fenótipo FP, pois a região correspondente ao gene 25k fp não é a única região em que ocorrem alterações após passagem em cultura de células.

A principal proteína de formação do poliedro é a poliedrina, uma proteína levemente ácida e altamente conservada. A poliedrina contendo erros na sua seqüência de aminoácidos é responsável pela formação de diferentes mutantes de AcMNPV que podem não formar poliedros ou quando o formam, este se apresenta com morfologia anormal ou com poucos vírions oclusos.

Carstens *et al.*, 1986 caracterizaram um mutante, M5, que produzia um poliedro cuboidal frequentemente sem vírions no núcleo de células infectadas devido a substituição de um aminoácido na poliedrina. Poliedros com semelhante morfologia também foram isolados de AcMNPV recombinante resultante de uma mutação pontual no gene da poliedrina (Lin *et al.*, 2000). Um outro mutante, M29, com a substituição do aminoácido fenilalanina por leucina no resíduo 84 evitou a cristalização de corpos de oclusão e acumulou grandes quantidades de pequenas partículas foi caracterizado por Carstens e colaboradores (1987). Dois mutantes com poliedros deficientes (M276 e M934) com mutações no gene da poliedrina também tiveram o fenótipo do poliedro alterado (Carstens *et al.*, 1992).

Katsuma e colaboradores (1999b) caracterizaram outros mutantes de BmNPV que também possuíam um fenótipo alterado da morfologia de poliedros em relação ao vírus selvagem. Análise da seqüência de nucleotídeos do gene da poliedrina desses mutantes demonstrou que simples substituições de aminoácidos na região codificante do gene da poliedrina foram responsáveis pela alteração do fenótipo do poliedro.

Recentemente Ribeiro *et al.*, 2009 ao purificarem um recombinante do AcMNPV isolaram um vírus mutante que ao infectar células de inseto apesar de produzirem a poliedrina, não formavam poliedros. Esta morfologia alterada do poliedro foi devida a uma única mudança de aminoácidos no gene da poliedrina.

5.4. Variantes MP (*Many Polyhedra*)

Vírus estáveis em passagens seriais que não tendem a formar mutantes FP tem sido identificados. Esses vírus são denominados variantes *Many Polyhedra* (MP). Mutantes virais com características MP e alta produção de BV, estáveis em passagens seriais, podem ser utilizados na produção do vírus em larga escala utilizando sistemas de cultura de células.

Slavicek *et al.* (1996), isolaram um vírus (A21-MPV) variante do LdMNPV que exibiu níveis aumentados de produção de BV e número de poliedros semelhantes aos poliedros MP, além de um pequeno aumento na quantidade de células que produziam poliedros. Esse vírus foi estável por mais de dez passagens em cultura de células. Outro clone (isolado-122b) de LdMNPV foi obtido por Slavicek *et al.* (2001). Este isolado exibiu produção estável de BV e poliedros por 14 passagens seriais e foi capaz de gerar infecções mais produtivas que o vírus selvagem.

Da mesma forma, Pedrini *et al.* (2005) isolaram um mutante (ppC19) do vírus HaSNPV que exibia um fenótipo parcial de MP e FP capaz de produzir cinco vezes mais poliedros que um típico mutante FP e três vezes menos poliedros que o vírus

selvagem. Além disso, esse mutante apresentou poliedros com muitos vírions típicos de fenótipo MP, embora em menor número.

A seleção de células, de isolados virais, análise de sua estabilidade e a otimização do processo são elementos chaves que precisam ser estudados para tornar viável a produção *in vitro* e a futura comercialização de seus produtos.

6. Produção de baculovírus em alta escala (Biorreatores)

O desenvolvimento do processo de produção *in vitro* para a formulação de inseticidas virais depende da habilidade das células de insetos crescerem em culturas em suspensão (Murhammer, 1996) e necessita de um conhecimento detalhado do requerimento nutricional das células e de seu comportamento metabólico (Gioria *et al.*, 2006).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com intuito de adaptar o crescimento de células com boa produção viral em meios de cultura com baixo custo, o que viabilizaria o custo de produção (Chakraborty *et al.*, 1999; Lua e Reid, 2003, Pedrini *et al.*, 2006).

Para o estabelecimento de cultura de células de insetos em biorreator (cultivo em alta escala) deve-se garantir condições físicas (temperatura, ausência de forças de cisalhamento) e bioquímicas (pH, pressão osmótica, nutrientes, ausência de substâncias citotóxicas) adequadas que possibilitem o crescimento das células e a produção do

produto viral esperado (Marques, 2005). Entretanto, grandes volumes do inóculo são necessários para a produção do baculovírus em larga escala, uma vez que várias passagens são necessárias para o *scale-up* do vírus, o que tem contribuído para a geração e acumulação de mutações durante a multiplicação do vírus em cultivos celulares, prejudicando a produção e eficácia viral (Rhodes, 1996).

A produção comercial de baculovírus requer a produção de no mínimo 10000 litros de cultura com um rendimento de mais de 150 OB por célula (Greenfield *et al.*, 1999).

Segundo Rhodes (1996) O processo padrão de produção viral de baculovírus para a produção do inóculo requer até 5 passagens para a obtenção de vírus suficiente para o estoque de trabalho. Mais 6 passagens são necessárias para a amplificação do processo de produção atingir o volume esperado. Portanto, são necessárias 11 passagens para obtenção de um produto final comercial com volume de 10000 litros desde que o vírus seja estável durante estas passagens e produza mais de 150 OB por célula.

Segundo Agathos (1996) diversos são os fatores necessários para a otimização da produção em biorreatores: densidade de células, viabilidade das células, estágio de crescimento, multiplicidade de infecção ou razão de vírus por célula (MOI), instante de infecção (TOI), tempo pós-infecção para a colheita das células, nutrição das células, concentração de oxigênio dissolvido (OD), temperatura, pH e pressão osmótica do meio.

Baculovirus tem sido utilizado como vetor de expressão sendo de grande

interesse na indústria farmacêutica. Na produção de vírus recombinantes para a expressão de proteínas heterólogas, em cultura de células, a transmissão é feita de célula a célula pelo fenótipo *budded virus*, sendo essas partículas suficientes para manter a infecção viral. Para a produção de uma vacina viral, a principal propriedade é a imunogenicidade sendo que a virulência não é considerada, pois o produto final deve ser inativado ou atenuado.

No entanto, para a produção de um bioinseticida em larga escala a virulência é um fator essencial. Para uso na agricultura, a produção *in vitro* de baculovírus com preservação de suas características inseticidas é dificultada pela formação de poliedros defeituosos, e em baixo número, em decorrência do efeito passagem. Para que ocorra a propagação da doença de inseto a inseto é necessária a oclusão das partículas virais infectivas em uma matriz protéica composta principalmente da proteína poliedrina. Portanto, a forma viral oclusa infectiva é essencial como produto final do processo.

Uma nova tecnologia para produção comercial de baculovírus usando uma combinação de métodos envolvendo produção de corpos de oclusão em larvas e de partículas virais com passagem serial em cultura de células foi desenvolvida pela Universidade de Brisbane, Queensland, Austrália (Steven Reid e Linda Lua - *Patent publ. n° WO 2005/045014 A1, Method of Producing Baculovirus*).

JUSTIFICATIVA

A demanda por uma maior produção de baculovírus para uso em controle biológico de pragas e para a produção *in vitro* de proteínas recombinantes tem estimulado o desenvolvimento científico-tecnológico visando à multiplicação desses vírus em cultura de células de insetos. No entanto, a dificuldade de se produzir vírus em cultivos celulares devido à perda de virulência causada pela formação de mutantes tem sido um obstáculo no avanço do uso de baculovírus como bioinseticida.

O *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) tem sido amplamente empregado como inseticida biológico no Brasil porém, sua produção encontra-se limitada a multiplicação no inseto hospedeiro. Neste contexto, o maior conhecimento sobre a dinâmica de produção e as principais alterações moleculares causadas pela passagem do vírus AgMNPV em cultura de células é relevante e contribui para sua futura produção *in vitro*. Dessa forma, a determinação da seqüência correspondente ao gene *25k fp*, o principal gene associado ao fenótipo FP (*Few Polyhedra*), de mutantes gerados com a passagem serial do vírus em cultura de células permite a identificação de possíveis mutações nesta região que poderiam estar envolvidas na formação deste fenótipo. Além disso, a seleção de variantes MP (*Many Polyhedra*) que não tendem a acumular mutantes FP e mantém a infectividade do vírus também contribui para produção *in vitro* do bioinseticida, onde características como a formação de poliedros infectivos e a alta virulência do produto final são relevantes.

OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência do efeito passagem no sistema AgMNPV em cultivo de células Tn-5B1-4 e caracterizar os possíveis mutantes gerados durante o processo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as principais alterações morfológicas produzidas pela passagem serial do vírus AgMNPV em cultura de células com a utilização de microscopia ótica e eletrônica.
- Verificar a presença de mutantes FP (*Few Polyhedra*), formados durante passagem serial, com base na produção de partículas OB (*occlusion bodies*) e BV (*budded viruses*) e pela análise de restrição do DNA viral.
- Selecionar clones FP e determinar a sequência nucleotídica do *locus* do gene *25k fp*, para caracterizar possíveis mutações.
- Selecionar variantes MP estáveis visando sua utilização em cultivos celulares em grande escala.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Vírus e inseto hospedeiro

O clone viral AgMNPV isolado 2D (Johnson e Maruniak, 1989) foi obtido a partir do vírus selvagem AgMNPV-79 pela técnica *plaque-assay* (Cooper, 1967; Knudson, 1976) e cedido pelo Dr. James Maruniak, University of Florida – USA.

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) foram cedidas pela Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN e cultivadas com dieta artificial (Greene *et al.*, 1976 modificado por Hoffmann-Campo, 1985) à temperatura ambiente (25°C).

2. Linhagens celulares e meio de cultura

Células BTI-Tn-5B1-4, obtidas de embriões de *Trichoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994), foram utilizadas para estudos de passagens seriais e amplificação de BV.

Células IPLB-SF-21AE (Sf21) obtidas de ovários imaturos de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) foram utilizadas para seleção e multiplicação dos clones virais MP e FP.

Para a manutenção e crescimento das células foi utilizado o meio de cultura TMNFH acrescido de antibiótico-antimicótico (GIBCO BRL), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (GIBCO BRL) livre de micoplasma (TMNFH completo), tratado

a 60°C/30min. As linhagens celulares utilizadas foram mantidas a 27°C em estufa incubadora.

Para a lavagem das células após a retirada do inóculo na infecção e para a coleta dos clones foi utilizado o mesmo meio de cultura TMNFH sem adição de soro.

3. Passagem serial de AgMNPV-2D

3.1. Obtenção do inóculo viral inicial (hemolinfa)

Lagartas sadias (3^o/4^o instar) foram alimentadas com dieta artificial contendo 100µl do inóculo viral em sua superfície em uma concentração de 1x10⁶OB/dieta. Após quatro dias de inoculação, as lagartas foram anestesiadas em gelo (por cerca de 2 min), tiveram o último par de patas cortado e a hemolinfa foi coletada em tubo de 1,5ml com 450µl de meio TNMFH sem soro e 50µl de cisteína (0,1M) resultando em um volume final de 1ml. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 3000rpm/1min em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5410), sendo o sobrenadante filtrado em filtro Millipore (0,45µm) e diluído em igual volume (diluição 1:1) de meio sem soro. Esta mistura foi designada inóculo P0 e utilizada para infecção inicial das células.

3.2. Infecção inicial (P1) em cultura de células

Células Tn5B1-4 foram previamente sedimentadas em frascos de 25cm³ (T-25) contendo meio TNMFH completo até atingirem uma densidade de 3x10⁶ células/frasco. O meio de cultura foi removido e então adicionado 1ml do inóculo viral (hemolinfa – P0) ao frasco. O período de adsorção do vírus foi de 1h com leve agitação manual a cada 10 min para permitir o contato do inóculo viral com toda camada celular. Em seguida, o inóculo foi retirado e as células foram lavadas com 2ml de meio TNMFH sem soro. Às células foram adicionados 5ml de meio TNMFH completo e estas mantidas em estufa a 27°C.

3.3. Passagem serial do vírus AgMNPV-2D

O vírus AgMNPV-2D foi serialmente propagado por 10 passagens em células Tn5B1-4 sedimentadas em frascos de 25cm³ (3x 10⁶ células/frasco). A infecção das células era realizada conforme descrito no item 3.2 sempre utilizando como inóculo 1ml do sobrenadante (contendo BV) da passagem anterior. As células infectadas eram mantidas em estufa a 27°C por 3 dias (72 h). O MOI utilizado para a primeira passagem serial foi de 2,4. Após 72 h de infecção as células eram fotografadas e amostras de 1ml de cada frasco infectado eram coletadas. Cada amostra consistia da suspensão celular (meio e células) e foi utilizada para a contagem de células com poliedros, determinação do número de poliedros por célula e microtitulação do vírus. A cada passagem foram infectados no mínimo 3 frascos de células e coletado uma amostra de cada frasco (triplicatas). Frascos com células semeadas (3x 10⁶ células/frasco), sem adição do vírus, foram utilizados como controle a cada passagem.

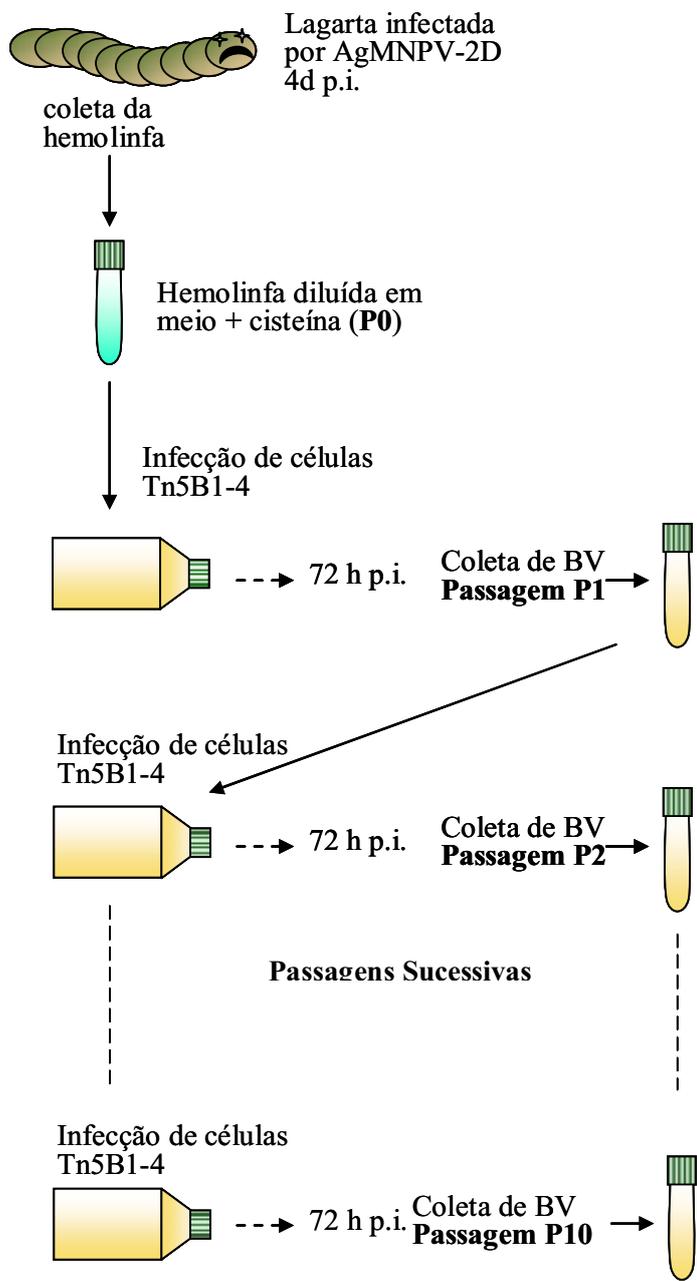


Figura 4 – Esquema da infecção inicial e passagem serial do vírus. As infecções durante passagem serial foram realizadas com 1ml do vírus (inóculo BV) em células Tn5B1-4 e a coleta do sobrenadante (inóculo BV) ocorreu sempre 72h p.i.

3.4. Microtitulação (TCID₅₀)

Para experimentos de microtitulação BV foram obtidos por centrifugação de uma alíquota (500µl) da suspensão celular a 3000rpm/5min (em microcentrífuga Eppendorf 5410).

Para avaliar a produção de BV, células Tn5B1-4 foram semeadas em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e infectadas com diferentes diluições em série do vírus (BV) (10⁻¹ a 10⁻⁸) e incubadas a 27°C, de acordo com O'Reilly *et al.* (1992). As células foram examinadas ao microscópio óptico, até o sétimo dia de infecção, para detecção de sinais de infecção. Poços que continham células com poliedros, ou com sinais típicos de infecção, foram contados como positivos. O cálculo do título viral foi estabelecido pelo método de Reed e Muench (1938).

3.5. Determinação da porcentagem de células com poliedros

Amostra da suspensão celular coletada a 72h p.i. de cada frasco infectado foi utilizada para visualização das células por microscopia ótica. Alíquotas de 15 µl da amostra eram colocadas em cada lado da câmara de Neubauer e foram contadas as células com muitos poliedros no núcleo (células tipo MP), as com poucos poliedros no núcleo (células tipo FP) e as hipertrofiadas, embora sem formação de poliedros para determinação da porcentagem de células com poliedros. Foram consideradas como células do tipo FP as células que visualmente apresentavam de 1 a 20 poliedros por núcleo e células tipo MP as que apresentavam mais de 20 poliedros por núcleo.

3.6. Determinação do número de poliedros por célula

O número total de células com poliedros (soma do total de células tipo MP e células tipo FP/ ml) e o número de poliedros por mililitro (OB/ml) foram utilizados para cálculo do número de poliedros por célula de cada amostra.

$$\text{N}^\circ \text{ de OB/ célula} = \frac{\text{quantidade de OB/ml}}{\text{células MP} + \text{célulasFP/ ml}}$$

O número de OB/ml foi determinado pela contagem de poliedros em câmara de Neubauer. Para a liberação dos poliedros produzidos pelas células infectadas, um volume referente a 1% de SDS foi adicionado a 0,5ml da suspensão celular. Esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por cerca de 1h até que houvesse a liberação de poliedros. Todas as contagens foram realizadas em triplicata.

3.7. Alterações morfológicas - análise por microscopia

A hipertrofia das células, formação de poliedros e demais efeitos citopáticos após infecção com inóculo viral foram observados e monitorados por microscopia de contraste de fase (microscópio de campo invertido Olympus CK2) e microscopia eletrônica (Jeol 1011). Células características de cada passagem viral foram fotografadas utilizando microscópio de luz Axiovert 135M Zeiss.

3.7.1. Microscopia eletrônica

Células infectadas relativas às passagens P2, P4, P6, P8 e P10 foram coletadas a 72 h p.i. e sedimentadas por centrifugação (microcentrífuga Eppendorf 5410) a 3000 rpm/5min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em fixador glutaraldeído 2,5% e mantido a 4°C por aproximadamente 24h. O sedimento foi novamente centrifugado e lavado 3x em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio 2% e desidratado em uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70% e 90% por 15min cada e duas vezes em etanol 100% pelo mesmo tempo. Seguiu-se a infiltração em resina Spurr (SEM – *Electron Microscopy Sciences*) em várias etapas com aumento gradual da concentração de resina (1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1). Posteriormente as amostras ficaram imersas em resina pura, por aproximadamente 12h. A polimerização da resina ocorreu em estufa a 70°C por 48h. Secções ultrafinas foram obtidas através de cortes em ultramicrótomo (Leica modelo Ultracut UCT) equipado com navalha de diamante, e montadas sobre telas de cobre. As secções foram contrastadas com acetato de uranila 3% por 20min e observadas ao microscópio eletrônico (Jeol 1011).

4. Seleção de clones

Após a obtenção da sétima passagem (P7) onde predominavam células do tipo FP, utilizou-se a técnica de *plaque assay* (Knudson, 1976) adaptada por O'Reilly *et al.* (1992) para seleção de clones virais. Essa técnica consiste em individualizar células infectadas, em meio sólido, de modo que cada partícula viral infecte um grupo isolado de células, sendo assim possível identificar um grupo com fenótipo mais puro. Para

tanto, foram utilizadas células SF21, pois estas apresentam melhor qualidade de visualização das placas.

Placas com características morfológicas *Few Polyhedra* (FP) e placas com características morfológicas *Many Polyhedra* (MP) foram coletadas e amplificadas em cultura de células. Placas FP foram utilizadas para estudo da mutação FP causada pelo efeito passagem e placas MP foram selecionadas para obtenção de um clone viral geneticamente estável, ou seja, que possivelmente não altere seu fenótipo mesmo sendo submetido a diversas passagens.

4.1. Seleção de clones FP

Cinco clones de mutantes *Few Polyhedra* (FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5) foram obtidos pelo método de *plaque assay*. Células SF21 foram semeadas (1×10^6 células) em placas de cultura de tecidos de 60 mm^2 com 4ml de meio TNMFH completo e incubadas a $27^\circ\text{C}/14\text{h}$ para crescimento e aderência das células. O sobrenadante foi então removido e 1ml dos BV produzidos na sétima passagem (P7), diluído serialmente (10^{-1} a 10^{-5}) em meio TNMFH sem soro, foi utilizado como inóculo para infectar as células por 1h com homogeneização a cada 10 min. Após este período, o inóculo foi removido e as células foram cobertas por 4ml de meio com 0,5% de agarose apropriada (*sea plaque*, Seakem). Após o endurecimento da agarose, as placas foram incubadas em estufa a 27°C por cerca de 7 dias quando foram então visualizadas placas de infecção por meio de microscópio invertido (Olympus CK2). Foram selecionadas as placas que estavam isoladas e que continham apenas células com poucos poliedros (indicando fenótipo FP). A coleta das placas foi feita por aspiração e cada uma foi suspensa em 1ml

de meio TNMFH sem soro, estocada a 4°C para posteriormente ser utilizada como inóculo em novo ensaio. Cada placa coletada foi purificada 3 vezes consecutivas, sendo então considerada um clone viral.

4.2 Seleção de clones MP

A seleção de clones MP foi realizada após 7 passagens de modo semelhante ao descrito no item 4.1. Seis clones de variantes *Many Polyhedra* (MP1, MP2, MP3, MP4, MP5 e MP6) foram obtidos pelo método de *plaque assay*.

Foram selecionadas as placas que estavam isoladas e que continham apenas células com muitos poliedros (indicando fenótipo MP). A coleta das placas foi feita por aspiração e estocada a 4°C para utilização em novo ensaio. Cada placa coletada foi purificada 3 vezes, sendo então considerada um clone viral.

4.3. Multiplicação dos clones em células IPLB-SF 21AE

Após seleção dos clones, 200µl do inóculo obtido de cada clone foi utilizado para infectar 2×10^5 células de Sf21 cultivadas em placa de 24 poços. Ao todo foram infectados 5 poços para cada clone. As células infectadas e o sobrenadante foram coletados após 72h p.i.. Novas amplificações foram realizadas em células Sf21 (3×10^6 células) cultivadas em frascos T-25 com 300µl do sobrenadante coletado da amplificação anterior. As células infectadas e o sobrenadante foram coletados após 72h p.i..

5. Purificação de DNA viral

5.1. Extração de DNA a partir de partículas BV

Foi realizada a extração de DNA de BV da população viral obtida nas passagens P1, P2, P4, P6 e P8 do vírus e de todos os clones FP. Para tanto foi preciso amplificar o vírus de cada passagem em cultura de células, utilizando 100µl de inóculo/T-25 contendo 3×10^6 células/frasco até obtenção de material suficiente para extração de DNA de BV (cerca de 30ml).

Os BV foram purificados em colchão de sacarose 25% em tampão NaCl, 5mM; EDTa, 10mM (O'Reilly *et al.*, 1992) por ultracentrifugação (Sorvall OTD75B rotor AH627), a 24000rpm/75min/4°C. O sedimento proveniente da purificação dos BV foi ressuspenso em 500µl de tampão de ruptura (Tris HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0; SDS 0,25%) e 500µg/ml de proteinase K, sendo a amostra incubada a 37°C/14h.

A extração do DNA foi realizada por ciclos de fenol, fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado em etanol absoluto gelado (2,5 volumes da amostra) e 10% de acetato de sódio (3M; pH 5,2) e incubado a -20°C/14h. O DNA foi sedimentado a 12000rpm/30min, lavado com etanol 70%, ressuspenso em 20µl de tampão TE (Tris 10mM, pH 7,8; EDTA 1mM) e mantido a 4°C.

5.2. Clivagem do DNA viral com enzima de restrição

DNA do vírus AgMNPV-2D (P1) e de passagens inicial a tardia (P2, P4, P6, P8) foram digeridos com a enzima de restrição *Hind* III (Pharmacia). Cada sistema foi preparado com 1µg de DNA viral e 20U de enzima em tampão próprio (1X). A reação de digestão ocorreu a 37°C/3h e o perfil foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% preparado em tampão TAE (Tris-acetato 40mM e EDTA 10mM). A migração das amostras no gel foi feita a 40V por aproximadamente 16h em presença de tampão TAE.

6. Marcação radioativa de proteínas dos clones FP

Células SF21 semeadas em uma densidade de 2×10^6 células/poço (placas de 60mm²) foram infectadas com clones FP (FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5) e AgMNPV-2D para observação da síntese de proteínas. A 48h p.i., as células foram lavadas com tampão salino fosfato - PBS, pH 6.2 (NaCl 140mM, KCl 40mM, Na₂HPO₄ 1mM, KH₂PO₄ 10,5mM) e mantidas neste tampão por 30min. Em seguida, células infectadas e não infectadas foram marcadas com 50µCi de [³⁵S]-metionina (Redivue™ L-[³⁵S]-methionine), com pulso de 1h, coletadas por centrifugação a 2500 rpm/5 min (microcentrífuga FANEN Centrimicro, modelo 212), lavadas com PBS e armazenadas a -20°C.

Para análise das amostras em gel SDS-PAGE, os sedimentos foram dissolvidos em tampão de amostra (SDS 2%, glicerol 15%, azul de bromofenol 0,002%, β-mercaptoetanol 2%), fervidos por 3min e então mantidos no gelo por 5min. Deste sistema, 10 µl da amostra de células não infectadas e 20µl das células infectadas com os

clones foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). Para determinação do peso molecular das proteínas foi utilizado o marcador radioativo *Rainbow*TM [¹⁴C] *methylated protein molecular weight marker* (Amersham, GE Healthcare). O gel foi tratado com o reagente fluorográfico *Amplify* (Amersham) de acordo com instruções do fabricante, foi seco e exposto ao filme raio-X (Kodak AR-5X-OMAT) a -80°C. O autoradiograma foi analisado para a presença de proteínas marcadas.

7. Análise do gene *25k fp*

7.1 Amplificação do gene *25k fp* pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação do gene *25k fp* das amostras do vírus original (AgMNPV 2D – Passagem 1) e dos clones mutantes FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5. Foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) externos ao gene, desenhados de acordo com a sequência descrita para o vírus AgMNPV (Oliveira *et al.*, 2006) disponível no site www.ncbi.nlm.gov (*GenBank/EMBL*) sintetizados pela Invitrogen.

Primer reverse: P25K: 5'-CTGCAGATTGTGTAAACTGTC-3'

Primer forward: P25K-265: 5'-TACTGCAGTGATAATGACGCAG-3'

Cada mistura de PCR continha 5µl de tampão de reação 10x, 1,5µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de dNTP (10mM), 1µl *Taq* DNA polimerase (5U/µl), 1µl DNA (10ng/µl), e 2µl de cada oligonucleotídeo (10µM) em volume final de 50µl com água Milli-Q.

A reação procedeu-se em termociclador (Peltier-effect cycling MJ Research Inc., PTC-100) utilizando o seguinte programa:

94°C – 5min para aquecimento inicial

94°C – 1min para a desnaturação	}	30 ciclos
48°C – 1min para o anelamento		
72°C – 1min para a elongação		

72°C – 10min para a extensão final

Após a amplificação da região correspondente ao gene *25k fp*, os produtos da PCR (~1000pb) foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml), com auxílio de transiluminador UV.

7.2 Clonagem de fragmentos obtidos por PCR (gene *25k fp*)

Os fragmentos de PCR correspondentes ao gene *25k fp* do DNA do vírus original (P1) e dos clones FP, foram isolados em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8% (*Low Melting Point* – Seakem) e purificados pelo kit GFXTM (GE Healthcare) de acordo com especificações do fabricante. Estes fragmentos foram utilizados para o sistema de ligação ao vetor pGEM (pGEM[®]-T Easy Vector Systems - Promega) que consistiu de 150ng de DNA do fragmento e 50ng do plasmídeo. A incubação foi feita com 3U da enzima T4 DNA ligase a 16°C por 14h.

Uma alíquota de 5µl de cada sistema de ligação foi utilizada para transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (200µl). O plaqueamento foi feito em meio seletivo LB-ágar (ampicilina 100µg/ml; X-gal 25µg/ml; IPTG 20µg/ml) e as

placas foram incubadas por 16h em estufa a 37°C. Foram obtidas várias colônias brancas que foram crescidas em meio LB líquido com ampicilina.

Para obtenção do DNA plasmidial, foi utilizado o método de extração por lise alcalina - miniprep (Sambrook *et al.*, 1989). O sedimento de 1,5 ml de células transformadas foi tratado com as soluções: 100µl de solução I (glicose 50mM; Tris-HCl 25mM, pH 8,0; EDTA 10mM), 200 µl de solução II (NaOH 0,2M; SDS 1%) e 150 µl de solução III (acetato de potássio 5M). O sobrenadante foi submetido a ciclos sucessivos de extração com fenol conforme descrito no item 5.1.. DNA dos plasmídeos com o fragmento do gene *25k fp* clonado foi ressuspendido em água MilliQ, quantificado e encaminhado para sequenciamento.

7.3. Sequenciamento do fragmento correspondente ao gene *25k fp* dos clones FP

A seqüência dos produtos de PCR foi determinada utilizando o método de terminação em cadeia *dye terminator chemistry*, em equipamento ABI 377 (Perkin Elmer), na Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA da Embrapa/CENARGEN.

A análise das seqüências teve início com a validação da qualidade das seqüências de bases utilizando o programa Phred (Ewing e Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998). Depois foi realizada a trimagem pelo programa Lucy (Chou e Holmes, 2001), que consiste na limpeza das seqüências produzidas pelo processo de sequenciamento. Esta etapa é responsável pela remoção de regiões que apresentam baixa qualidade ou que são indesejáveis por causarem incidência de erros nas análises dos dados.

Regiões de vetores de clonagem foram filtradas pelo programa Cross Match (Green, 1996), que compara a seqüência analisada com arquivos de seqüências de vetores.

Múltiplos alinhamentos foram realizados utilizando o programa Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/muscle/>). As mutações foram identificadas por inspeção visual dos alinhamentos múltiplos.

RESULTADOS

1. Efeitos citopáticos durante a passagem serial do vírus

Foi estabelecida a passagem serial do vírus AgMNPV-2D em cultura de células BTI-Tn-5B1-4 num total de 10 passagens sucessivas. Os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus em células infectadas foram visualizados por microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de transmissão.

Analisando os efeitos citopáticos resultantes da infecção de células, por microscopia ótica, observou-se alta taxa de infecção em todas as passagens, pois mesmo as células que não continham poliedros em seus núcleos apresentavam formato maior, arredondado, núcleo hipertrofiado e, em alguns casos, estroma virogênico e protusão celular. Uma densa região no núcleo das células, identificada como estroma virogênico, foi observada por volta de 48h p.i. e protusões celulares foram visíveis entre 48 e 72h p.i.

A Figura 5 apresenta células Tn5B1-4 não infectadas (controle negativo) e infectadas (72h p.i.) com hemolinfa de larvas infectadas com o vírus AgMNPV-2D (Figura 5A) . Nas células infectadas a 72h p.i.(Figura 5B) são evidenciados os principais efeitos citopáticos causados por infecção viral como o aumento do volume celular, hipertrofia do núcleo, acúmulo de poliedros no núcleo das células e presença de protusão citoplasmática. Também é possível notar um elevado número de células tipo MP.

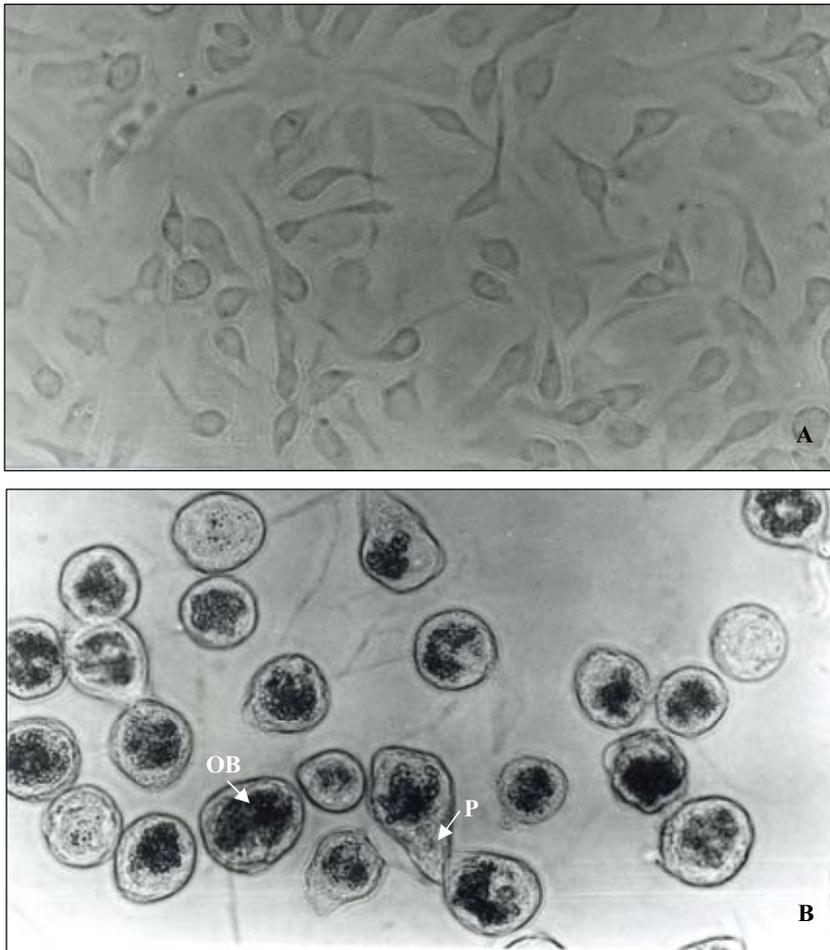


Figura 5 - Células de *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4). (A) Células não infectadas (controle), aumento 200X; (B) Células infectadas com hemolinfa de larvas infectadas com AgMNPV-2D (passagem P1), 72h p.i.. As setas apontam o acúmulo de corpos de oclusão (OB) no núcleo e a formação de protusão celular (P). Aumento de 320X.

1.1. Perfil da porcentagem de células com poliedros

A infecção com o clone viral AgMNPV-2D até a quinta passagem (P1, P2, P3, P4 e P5)

seguiu um padrão semelhante com sintomatologia de infecção em todas as células, apresentando alta porcentagem de células com muitos poliedros (células MP – *many polyhedra*) e muitos poliedros por núcleo de células infectadas. Nestas passagens, a porcentagem de células MP foi sempre superior à porcentagem de células com poucos poliedros (células FP – *few polyhedra*), após 72h p.i. (Figura 6).

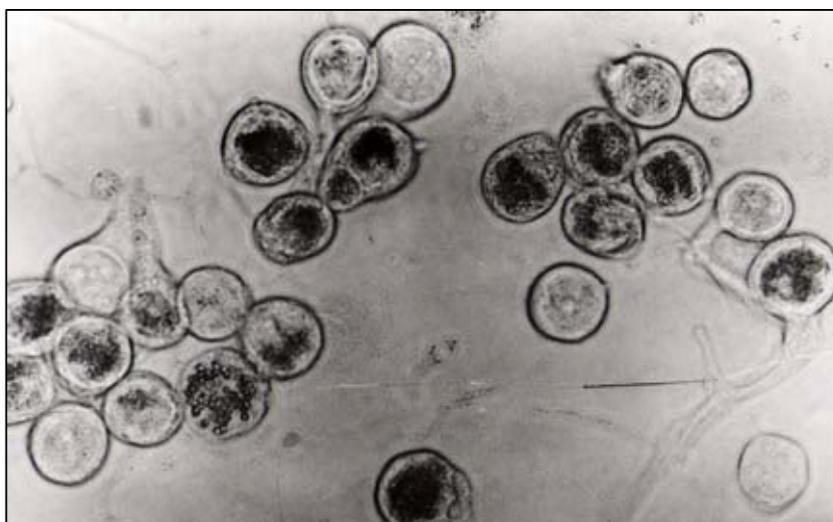


Figura 6 - Passagem viral P3. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D), 72h p.i. de sobrenadante da passagem anterior (P2). Aumento de 320X.

Como mencionado anteriormente, nas passagens iniciais as células apresentavam muitos poliedros e este padrão foi claramente alterado na sexta passagem do vírus (P6), quando começou-se então, a se evidenciar as células com poucos poliedros, sendo que muitas vezes estes poliedros apareciam como estruturas maiores no núcleo celular.

Na passagem P6 houve um aumento das células tipo FP que superou a porcentagem de células tipo MP (Figura 7).

As células do tipo FP apresentavam menos de 20 OB/célula e estas muitas vezes eram maiores que os poliedros de células do tipo MP. Além disso, muitas células apesar de apresentarem alguns efeitos citopáticos de infecção viral (tamanho maior, arredondamento, núcleo hipertrofiado e estroma virogênico) não apresentavam poliedros em seus núcleos (Figura 7).

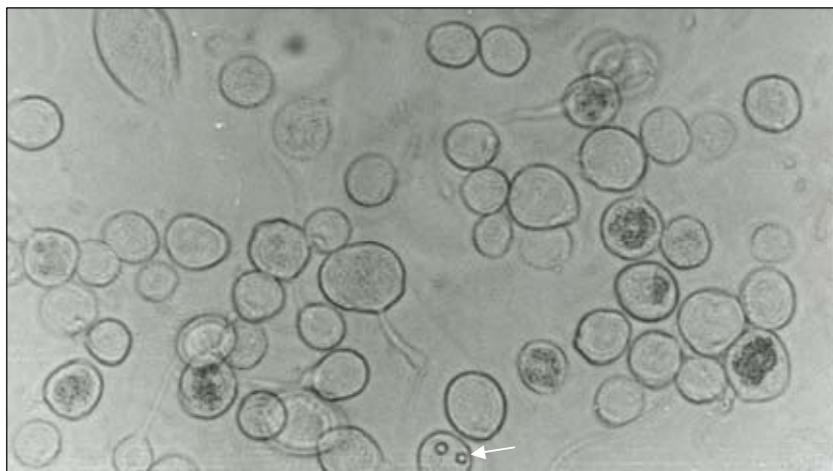


Figura 7 - Passagem viral P6. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D), 72h p.i., de sobrenadante da passagem anterior (P5). Presença de poucas células do tipo MP. A seta aponta poliedros de tamanho maior do que normalmente é encontrado em células do tipo MP. Aumento de 200X.

As passagens subsequentes (P7, P8, P9 e P10) também demonstraram a maior quantidade de células com poliedros do tipo FP em relação às células do tipo MP (Figura 8). Nessas passagens, a porcentagem de células com poliedros do tipo MP foi sempre menor que a de células tipo FP, chegando a atingir níveis basais nas últimas passagens.

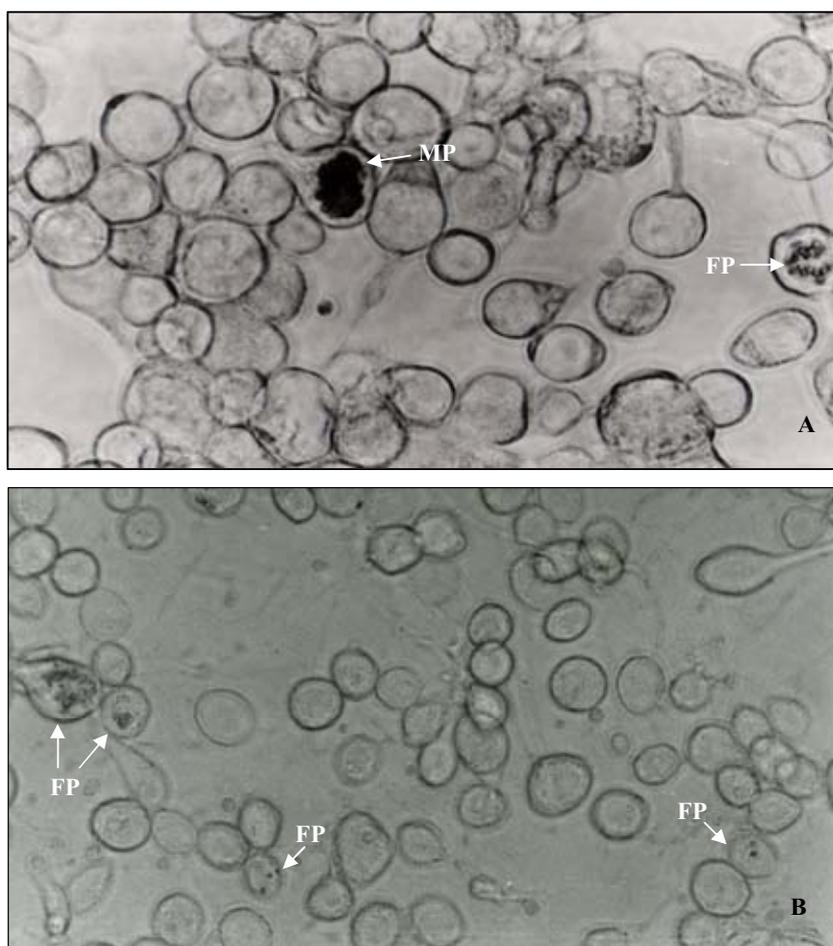


Figura 8 - Passagens virais P8 e P10. Células Tn5B1-4 infectadas com BV (AgMNPV-2D) 72h p.i., de sobrenadante de passagens anteriores P7 e P9, respectivamente. (A) Passagem P8, aumento 320X. (B) Passagem P10, aumento 200X.

A comparação entre as porcentagens de células dos tipos MP e FP resultantes de sucessivas passagens do vírus em cultura de células é apresentada na Figura 9.

As passagens iniciais (P1, P2, P3, P4 e P5) apresentaram variação de 53% a 65% de células MP. Na passagem P6, houve uma diminuição da porcentagem de células MP (para 10%) que foram superadas pelas células FP (17%). Com as passagens posteriores

(P7, P8, P9 e P10) a porcentagem de células FP variou entre 32 a 40% e manteve-se superior à porcentagem de células MP, que chegou a 3% na passagem P10.

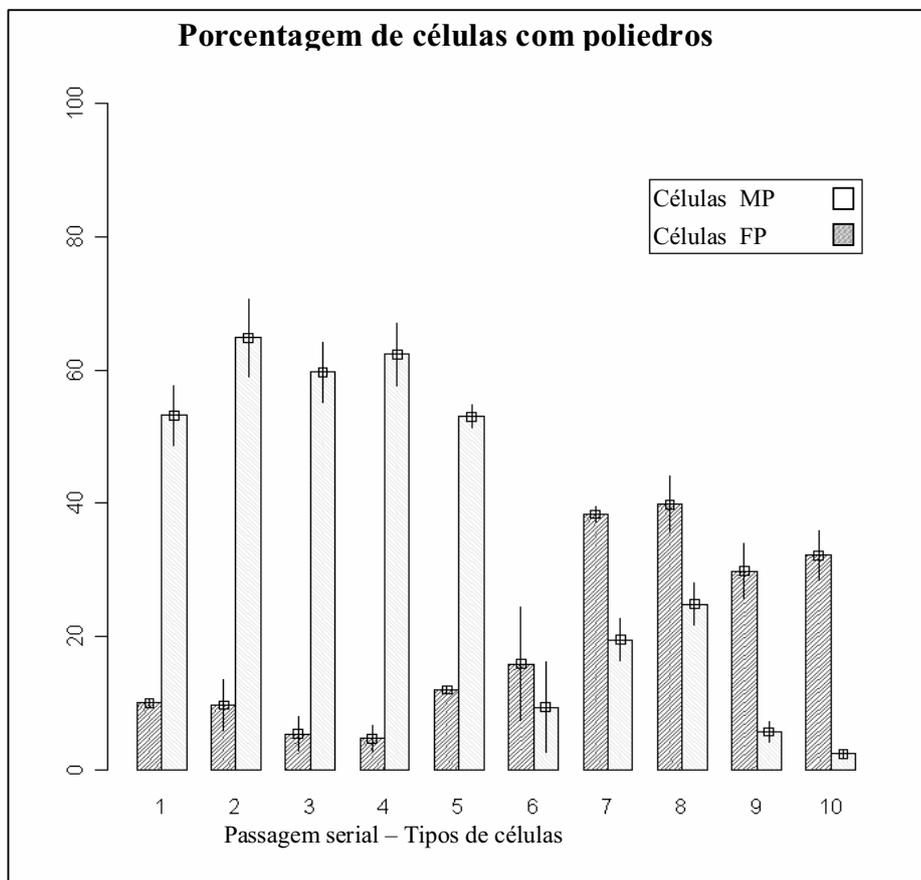


Figura 9 - Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4, 72h p.i.. Perfil da porcentagem de células com poliedros onde são apresentadas as porcentagens referentes aos tipos celulares (MP e FP) durante as várias passagens seriais.

Ao considerar na análise gráfica a porcentagem de todas as células com sintoma de infecção, e não apenas aquelas que produzem poliedros, ficou mais fácil visualizar que a partir da sexta passagem houve uma grande predominância do fenótipo FP em relação ao fenótipo MP. Esse evento é indicado pela alta porcentagem de células

infectadas e com poucos poliedros (variando de 75% a 97%) nas passagens tardias (Figura 10).

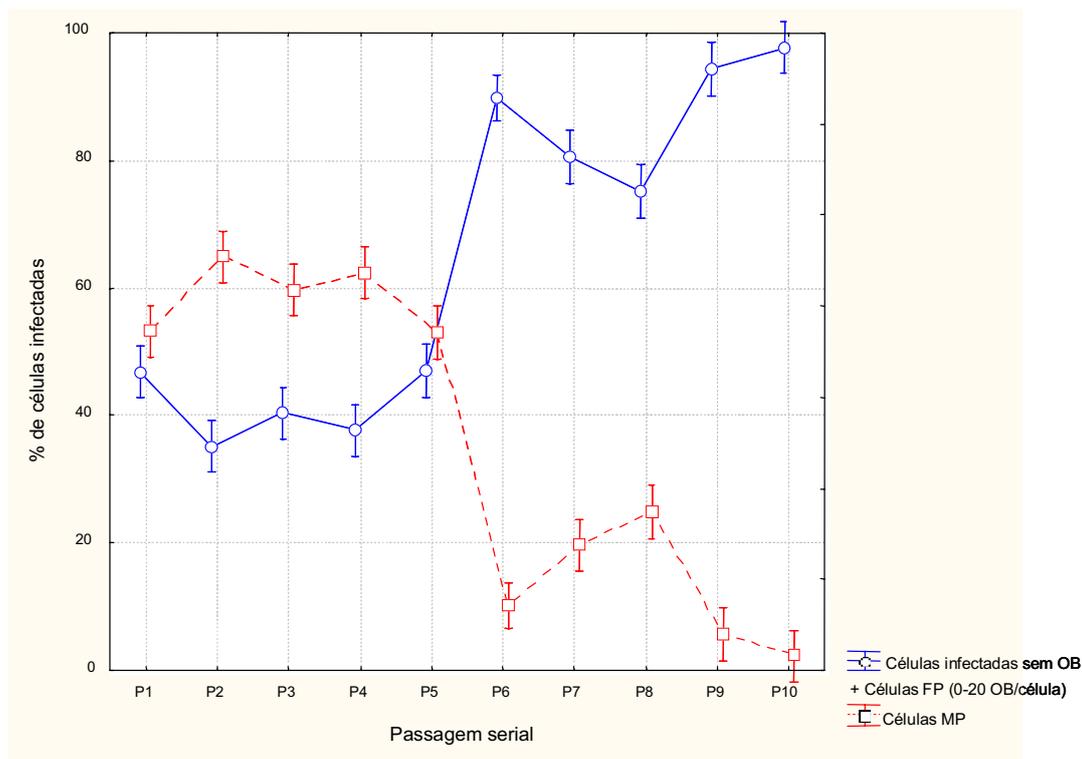


Figura 10 – Perfil da porcentagem de células infectadas durante a passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4, 72h p.i.

1.2. Produção de poliedros por célula

O perfil da produção de poliedros foi determinado apenas para as células que apresentavam poliedros (células MP e células FP) e não foi considerado para as células infectadas sem poliedros. Este perfil variou bastante durante a passagem serial e demonstrou um declínio do número de poliedros por célula associado à diminuição de

células *many polyhedra* MP e aumento de células *few polyhedra* FP, é característico da mutação FP comum em passagens continuadas de infecções virais em cultura de células.

O número de poliedros por células (OB/célula) na passagem inicial P1 foi de aproximadamente 150 OB/célula, sendo que na passagem P2 alcançou um valor de 320 OB/cel. Entretanto, a partir dessa passagem ocorreu uma redução na formação de poliedros (atingindo ~200 OB/célula na quinta passagem, P5), havendo um declínio acentuado na sexta passagem (45 OB/célula) e chegando a atingir um valor de 12 OB/célula na última passagem (Figura 11).

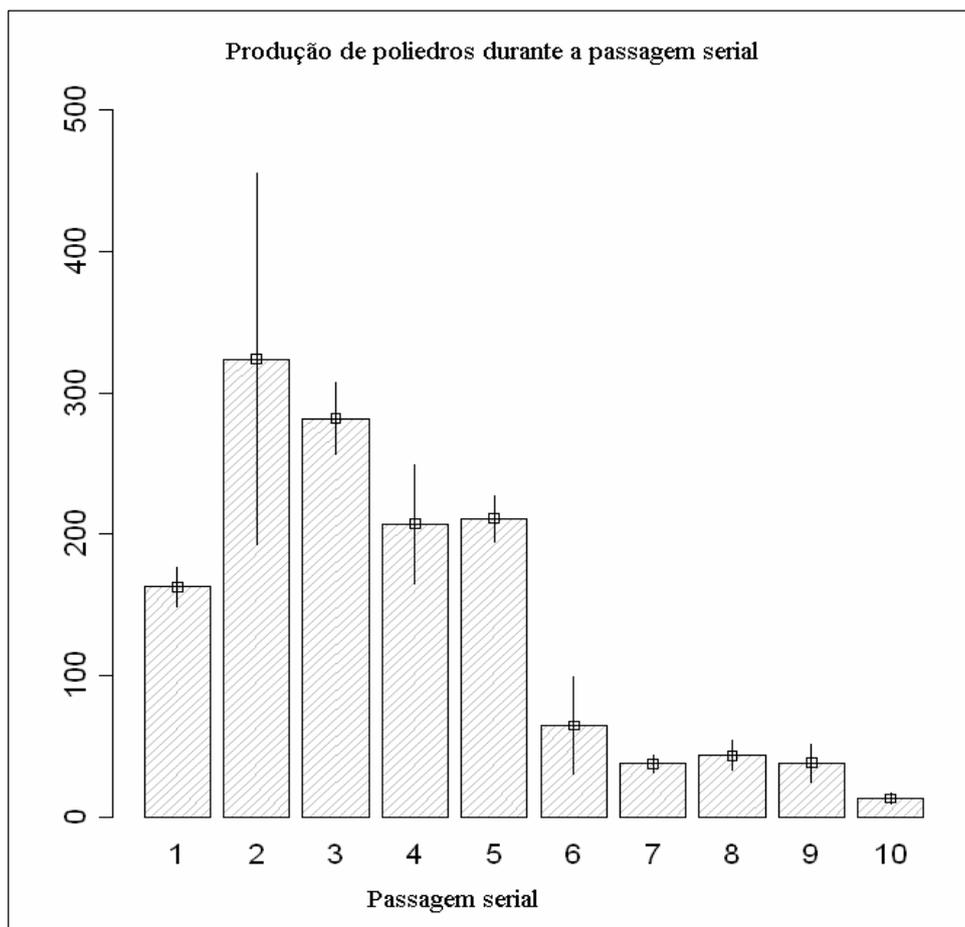


Figura 11- Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4. Curva da produção de poliedros por célula relativo às células que apresentam poliedros.

1.3 Análise ultraestrutural das células infectadas da passagem serial

Os efeitos citopáticos induzidos pelo AgMNPV-2D em células infectadas BTI-Tn-5B1-4 (coletadas a 72h p.i.) resultantes das passagens P2, P4, P6, P8 e P10 também foram visualizados por microscopia eletrônica de transmissão.

Em todas as passagens foram evidenciados sinais típicos de infecção tais como: células maiores e arredondadas, núcleo hipertrofiado, formação do estroma virogênico e presença de vírions no núcleo das células.

Em passagens iniciais, as células continham muitos poliedros acumulados no núcleo e estes apresentavam formato regular, contendo muitos vírions em seu interior. Pode-se notar uma diminuição do número de poliedros por célula com a passagem serial, sendo que estes se tornavam geralmente maiores, de formato irregular e muitas vezes com poucos vírions oclusos após a passagem P6 (Figura 12). Essa observação foi confirmada e melhor determinada com a quantificação de poliedros formados durante as passagens virais.

Em passagens mais altas (P8, P9 e P10), o tipo celular predominante passou a ser células sem poliedros no núcleo, onde apenas era visualizado o estroma virogênico com alta produção de BV. A formação do estroma virogênico e a alta produção de nucleocapsídeos nesta região em células infectadas, mesmo sem a formação de poliedros foram evidenciadas na Figura 13 (a, b). A diferença entre um poliedro obtido na passagem P2, com formato regular e grande quantidade de partículas ODV e um poliedro obtido na passagem P8 com formato irregular e pouca oclusão viral é demonstrada na Figura 13 (c, d).

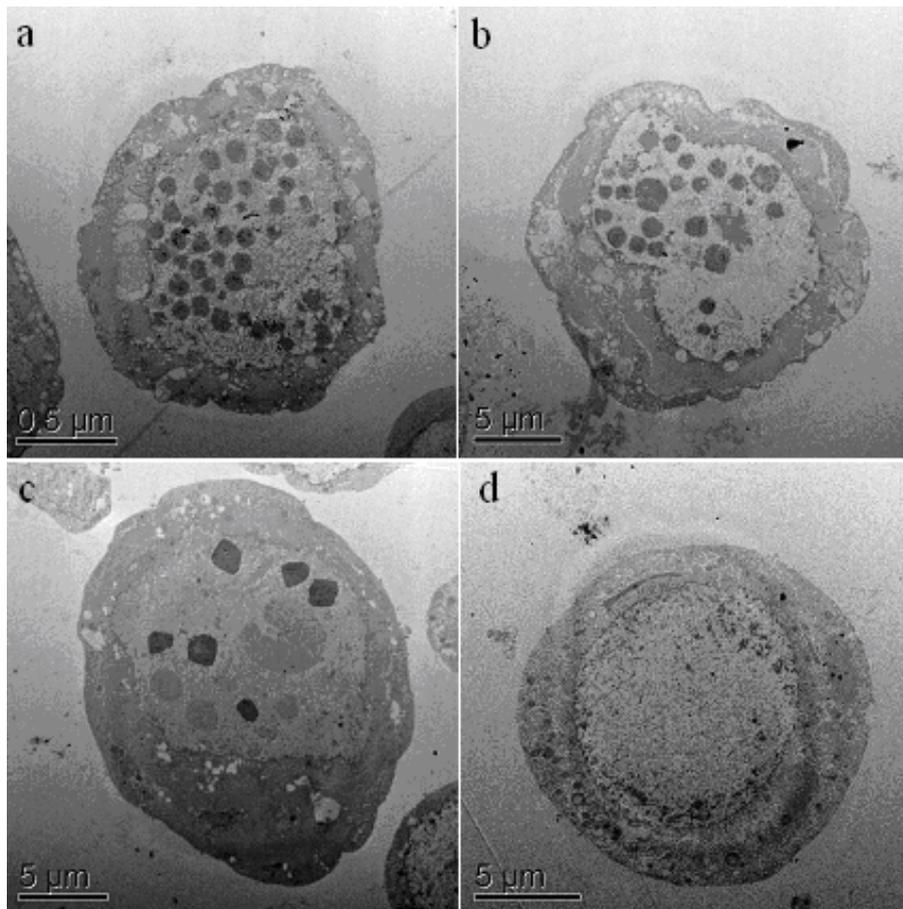


Figura 12 - Análise ultraestrutural de células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D nas passagens P2, P4, P6 e P8, 72h p.i.. (a) célula típica encontrada em P2 com núcleo hipertrofiado contendo muitos poliedros, (b) célula típica de passagem P4 com núcleo hipertrofiado ainda com muitos poliedros, tendo alguns com tamanho aumentado. (c) célula típica de passagem P6 com poucos poliedros no núcleo, estes se apresentam maiores que os poliedros encontrados no vírus selvagem e (d) tipo celular mais encontrado em passagens mais altas, após a sexta passagem (exemplar da P8). Estas células embora apresentem o núcleo hipertrofiado, não possuem poliedros no seu interior.

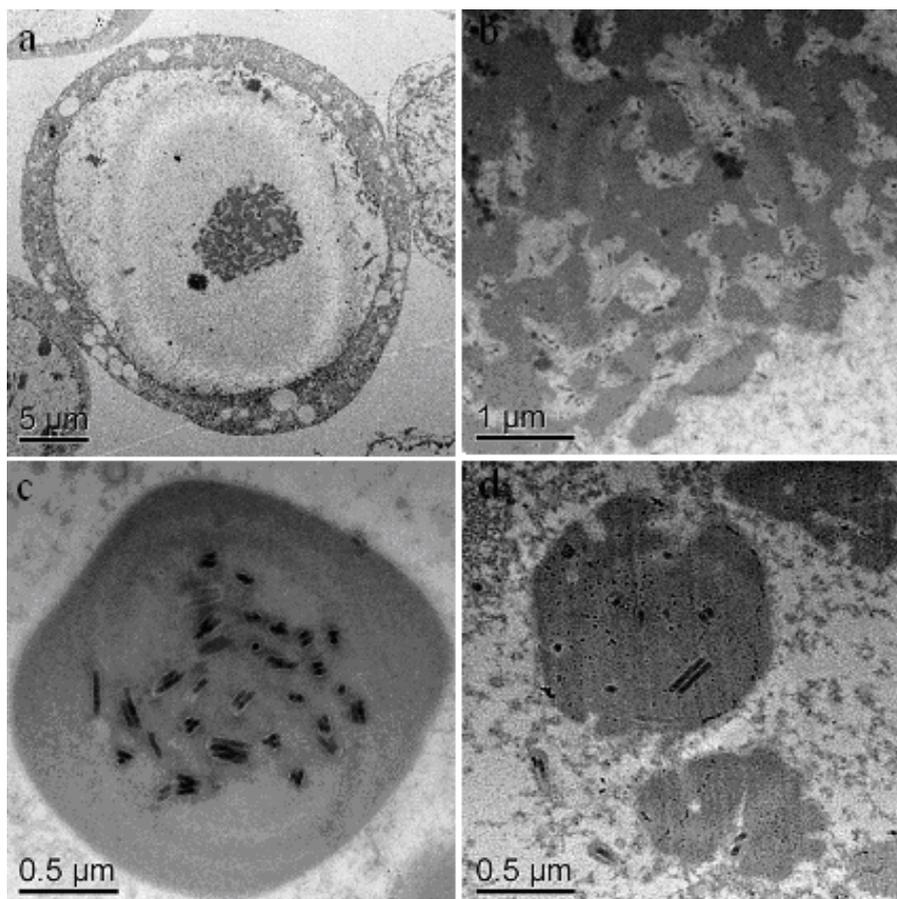


Figura 13 - Análise ultraestrutural de células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D na passagem P10 (a) e detalhe de seu estroma virogênico com alta produção de vírions (b); Comparação de poliedro formado na passagem P2 com muitos vírions oclusos e formato regular (c) e poliedro formado na passagem P8, com poucos vírions oclusos e formato irregular (d).

2. Análise comparativa do DNA viral produzido durante passagem serial de AgMNPV

Foi feita a comparação dos perfis de digestão do DNA extraído de partículas BV produzidas durante as passagens: P1, P2, P4, P6 e P8. Para digestão do DNA foi utilizada a enzima *Hind*III. Os perfis foram semelhantes (Figura 14), o que descarta a hipótese de formação de partículas DI, pois nesse caso são perdidos grandes pedaços do genoma, o que seria facilmente detectado no perfil de restrição do DNA viral.

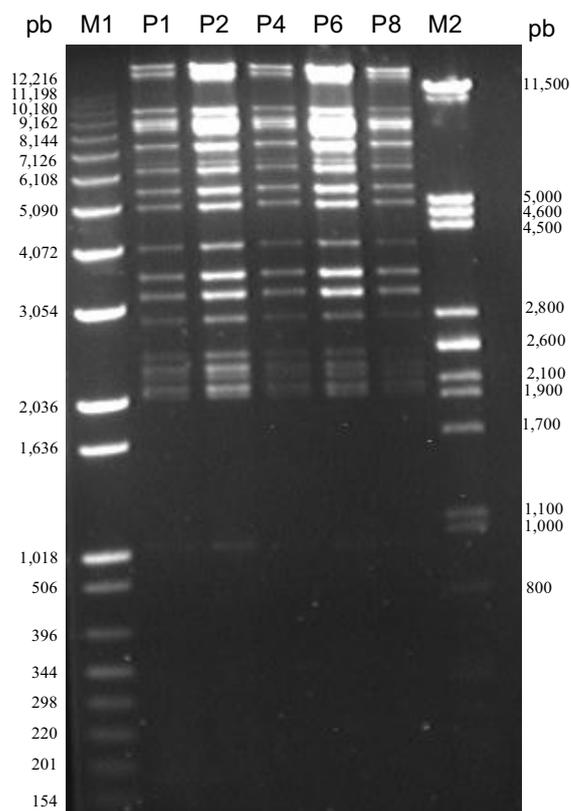


Figura 14 - Análise do perfil de restrição do DNA genômico de AgMNPV das passagens: P1, P2, P4, P6 e P8. Amostras de DNA de cada passagem foi digerido com a enzima *Hind*III. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e corados com brometo de etídeo. Marcadores DNA ladder 1kb (M1) e DNA λ *Pst*I (M2).

3. Produção de partículas BV durante as passagens virais

Os títulos das partículas virais (BV) produzidas nas passagens P1, P3, P5, P7 e P9 foram determinados. Nas passagens mais altas esse título foi significativamente maior do que em passagens iniciais o que confirma a predominância de mutantes FP na população viral (Tabela 2).

Tabela 2 – Produção de partículas BV durante passagem serial do baculovirus AgMNPV em células Tn5B1-4. Determinação do título viral pelo método de TCID₅₀

Passagem	Título viral (pfu/ml)	Desvio Padrão
P1	$7,1 \times 10^6$	$\pm 5,21 \times 10^6$
P3	$8,0 \times 10^6$	$\pm 4,24 \times 10^6$
P5	$1,1 \times 10^{10}$	$\pm 1,08 \times 10^{10}$
P7	$1,5 \times 10^{10}$	$\pm 8,38 \times 10^9$
P9	$3,8 \times 10^8$	$\pm 1,43 \times 10^8$

*Valores médios de três determinações do título de BV produzidos durante a infecção de células Tn5B1-4 com os inóculos das passagens: P1, P3, P5, P7 e P9 (72h p.i.)

Esses dados mostram que a passagem do baculovirus *Anticarsia gemmatalis* MNPV em cultura de células levou a um significativo aumento do título de produção de BV durante a conversão da população viral com fenótipo MP para fenótipo FP.

De acordo com testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas o alto título viral de BV da passagem P5 é estatisticamente idêntico ao da passagem P7. Na passagem P9 há um decréscimo do título viral de BV.

4. Seleção de clones FP

Inicialmente, cinco clones mutantes FP (FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5) foram selecionados pelo método de *plaque assay* (Figura 15). Desses, o clone FP1 geralmente apresentava células com efeitos citopáticos evidentes de infecção viral mas sem formação de poliedros e raras células com poucos poliedros (células FP), este clone não apresentou formação de células do tipo MP (Figura 15 B).

Nos demais clones FP (Figuras 15 C, D, E e F), a maioria das células infectadas também não apresentavam poliedros no núcleo. Entre as células com poliedros era predominante a do tipo FP embora algumas células MP também tenham sido visualizadas.

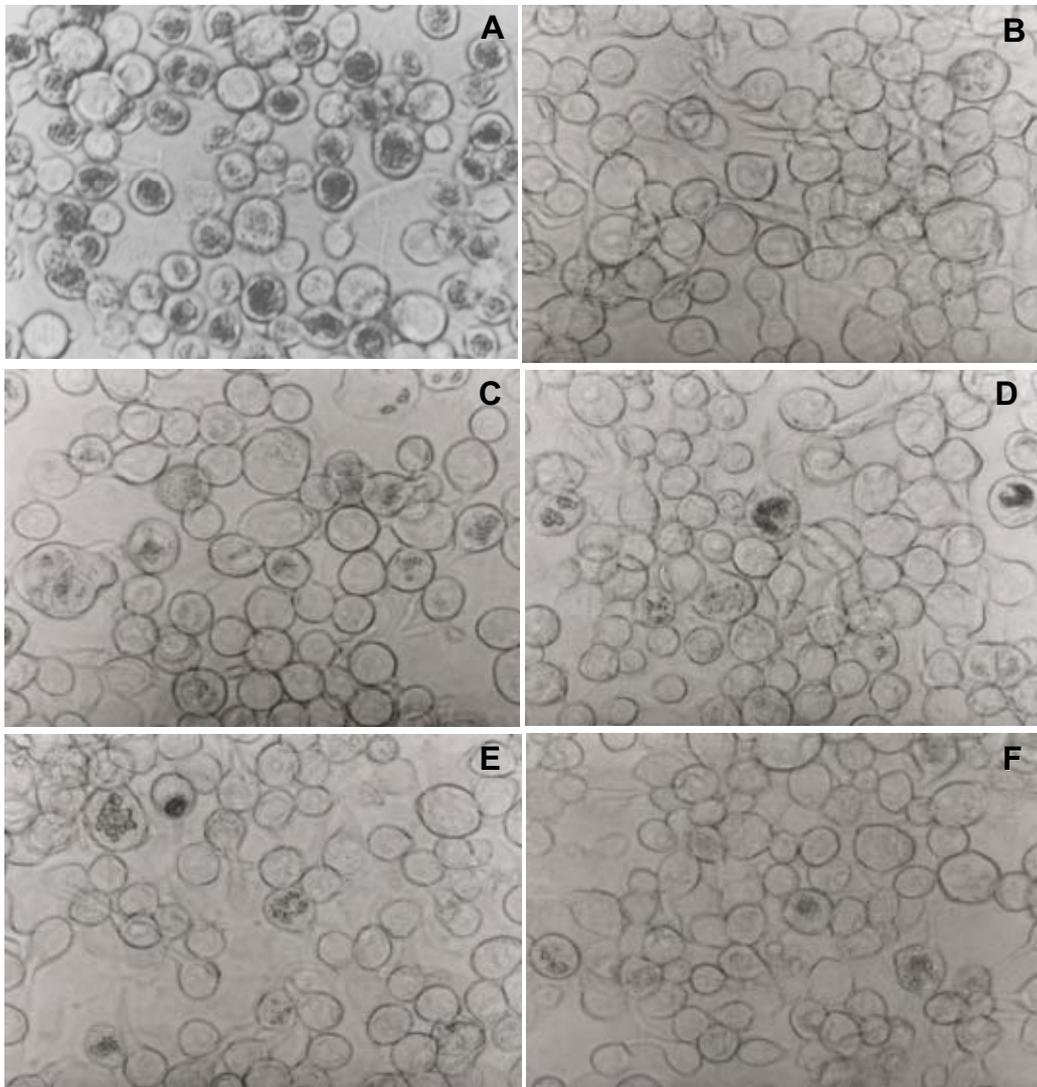


Figura 15 – (A) Células Tn5B1-4 infectadas com o vírus AgMNPV-2D, 72h p.i. (B, C, D, E e F) Células Tn5B1-4 infectadas com clones FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5 respectivamente, 72h p.i..(B) Células Tn5B1-4 infectadas com clones FP1. A seta aponta célula com poucos poliedros no núcleo, as demais células apresentam núcleo hipertrofiado sem poliedros. (D) Células Tn5B1-4 infectadas com o clone FP3. Presença de células do tipo FP e algumas células MP (setas). Aumento de 200X.

5. Análise ultraestrutural de células infectadas com clones FP

Células infectadas com cada clone FP (FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5) foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Em todos os sistemas de infecção foram observadas células com efeitos citopáticos como arredondamento celular, hipertrofia do núcleo e estroma virogênico com alta produção viral. Geralmente, os clones possuíam poliedros mal formados, muitas vezes truncados ou sem limites bem definidos com poucos ou sem vírions oclusos (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21). Célula infectada e poliedros da passagem P1 foram fotografados para efeitos de comparação. A célula de P1 apresentou grande quantidade de poliedros com muitos vírions por poliedro, além disso os poliedros eram bem delimitados (Figura 16). Da mesma forma que o P1, o clone FP2 apresentou efeitos citopáticos típicos de células MP, diferindo das características de um fenótipo FP preliminarmente observadas por microscopia de luz.

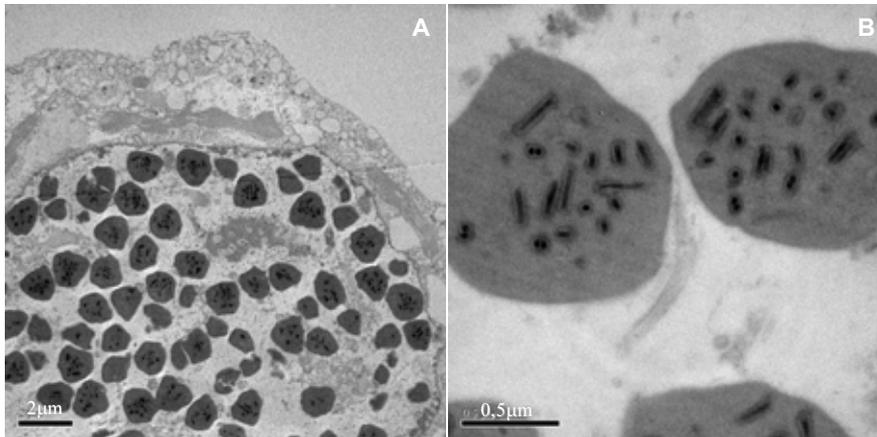


Figura 16 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com AgMNPV-2D (vírus selvagem - P1). (A) Célula com poliedros no núcleo. (B) poliedros.

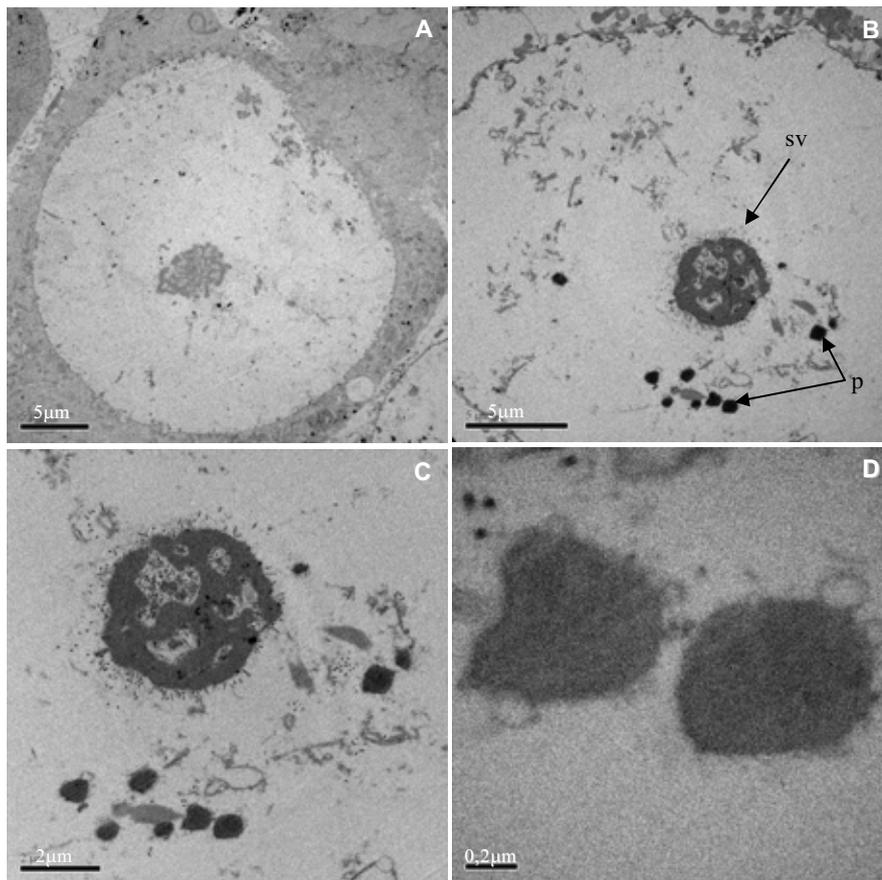


Figura 17 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone viral FP1. (A) Célula infectada sem poliedros. (B) Célula infectada com poucos poliedros. (C) Detalhe do estroma virogênico (sv) e poliedros (p). (D) Ampliação de poliedros demonstrando que não há presença de vírions oclusos.

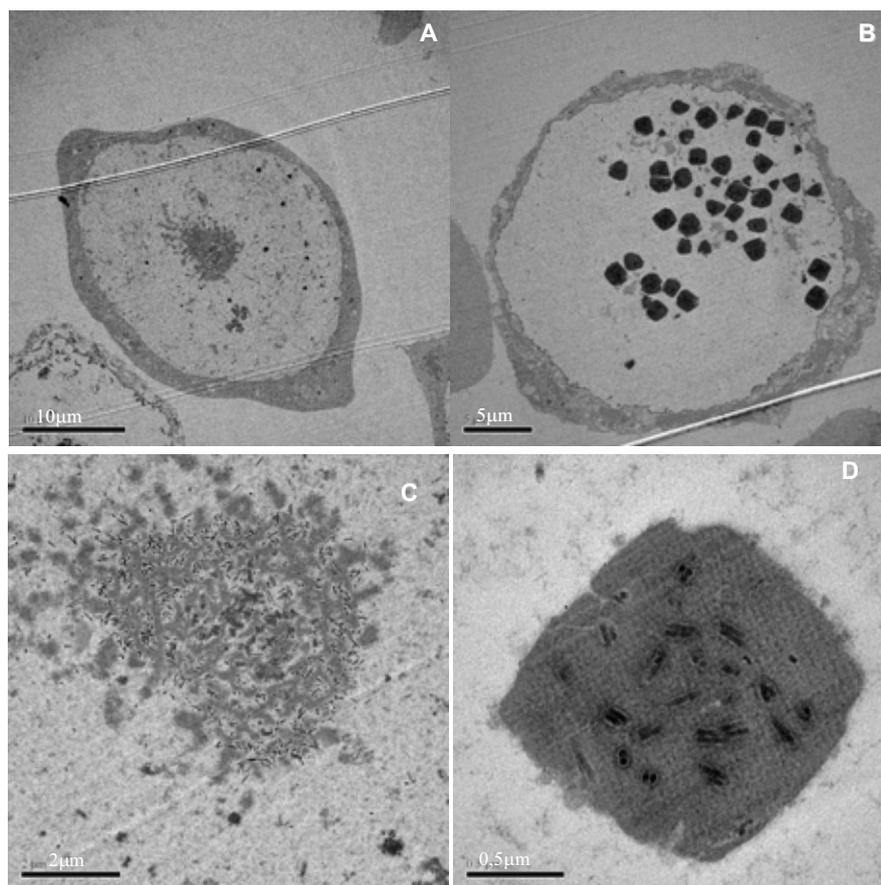


Figura 18 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone viral FP2. (A) Célula infectada sem poliedros. (B) Célula infectada com poliedros. (C) Detalhe do estroma virogênico com alta produção de nucleocapsídeos. (D) Poliedro com vírions oclusos.

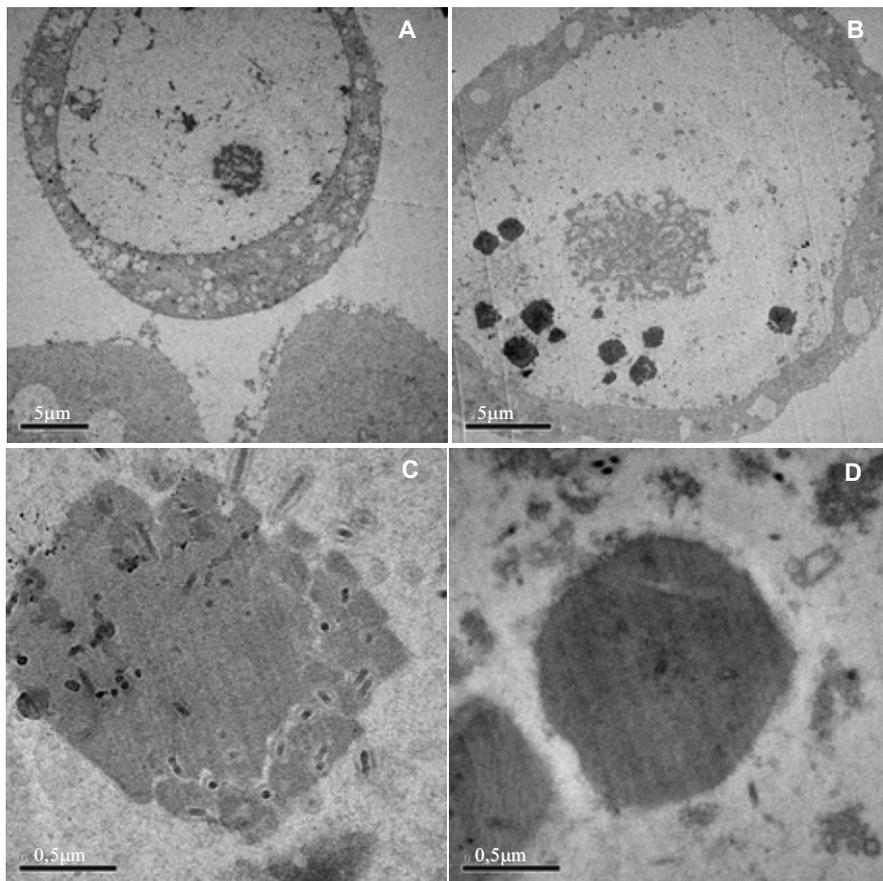


Figura 19 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone viral FP3. (A) Célula infectada sem poliedros. (B) Célula infectada com poucos poliedros. (C) Detalhe de poliedro truncado com vírions. (D) Poliedro sem vírions oclusos.

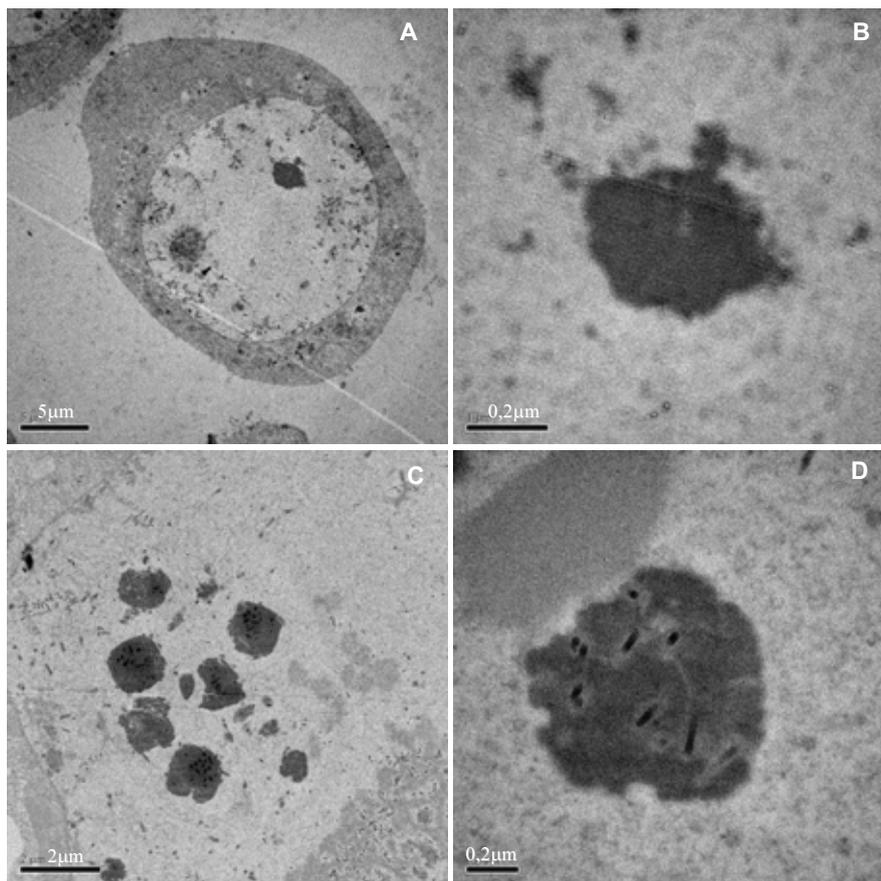


Figura 20 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone viral FP4. (A) Célula infectada com poucos poliedros. (B) Poliedro mal formado sem vírions oclusos. (C) Poliedros truncados. (D) Detalhe de poliedro mal formado com poucos vírions oclusos.

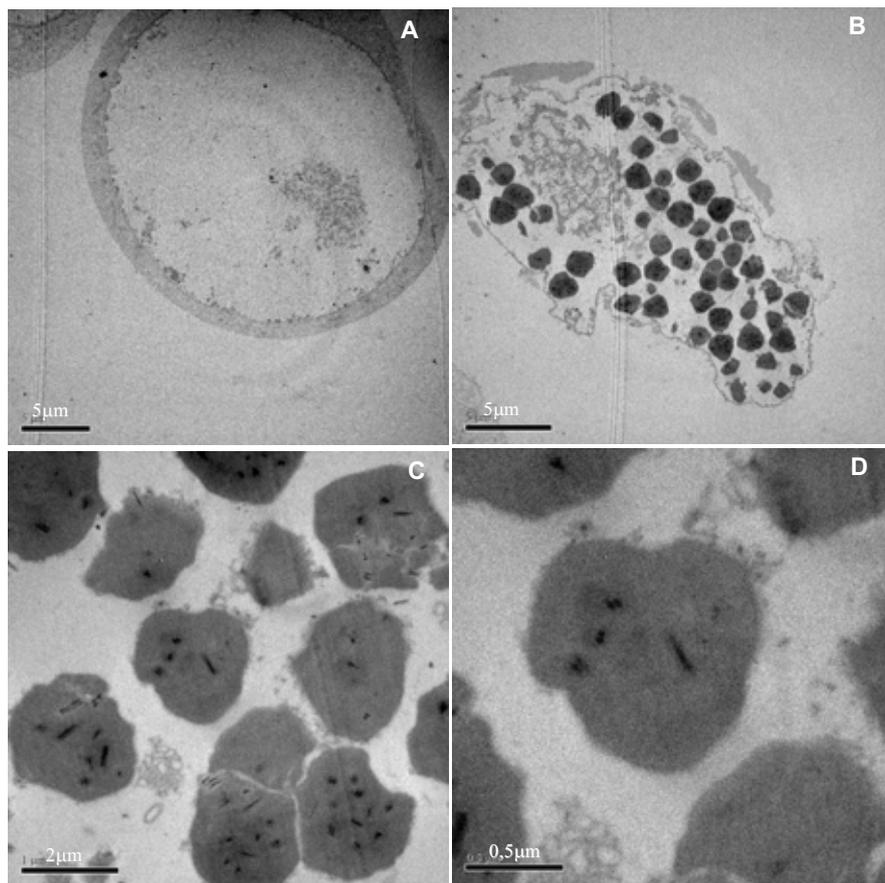


Figura 21 - Micrografia eletrônica da infecção de células Tn5B1-4 com clone viral FP5. (A) Célula infectada sem poliedros. (B) Célula infectada com muitos poliedros. (C) Poliedros mal formados. (D) Poliedro mal formado com poucos vírions oclusos.

6. Análise da síntese de proteínas dos clones FP

Células Tn5B1-4 infectadas com os clones FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5 foram analisadas para síntese de proteínas a 48h p.i. com pulso radioativo de ^{35}S -metionina (Figura 22). Os perfis obtidos por migração das amostras em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foram similares para os clones FP1, FP3, FP4 e FP5 mostrando reduzida ou quase nenhuma síntese da poliedrina, a principal proteína do corpo de oclusão (OB) dos NPV. Estes resultados estão de acordo com a observação e quantificação de poliedros por microscopia ótica e eletrônica: presença de poucos poliedros em células infectadas com os clones FP. O clone FP2 novamente não se apresentou com características de um fenótipo FP (poucos poliedros), pois seu perfil protéico foi muito similar ao do vírus AgMNPV-2D (controle), apresentando uma intensa banda de ~33kDa correspondente a poliedrina

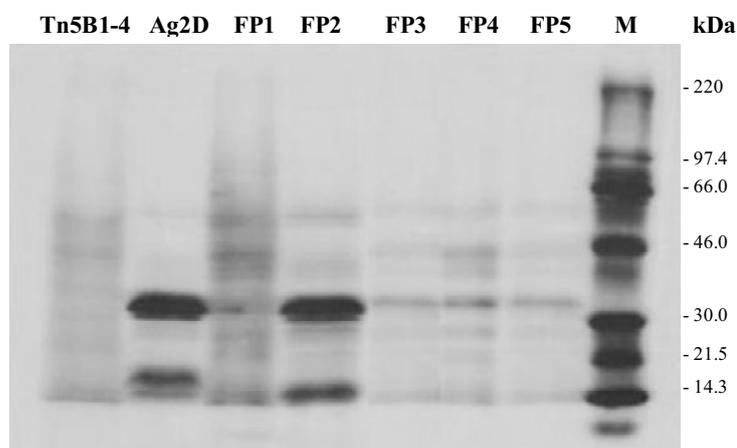


Figura 22 - Síntese de proteínas em células Tn5B1-4 infectadas com clones FP e AgMNPV-2D (Ag2D- controle positivo), 48h p.i.. Autorradiograma de gel de poliacrilamida-SDS 16% de células marcadas com ^{35}S -metionina (pulso de $50\mu\text{Ci}$ por 1 hora). Tn5B1-4: células sem infecção. M: marcador de peso molecular em kDa.

7. Sequenciamento do gene *25k fp* dos clones FP

Para determinar a sequência do gene *25k fp* dos clones FP, o fragmento correspondente ao gene e regiões adjacentes (incluindo a região promotora do gene) do DNA dos clones FP1, FP2, FP3, FP4 e FP5 foram amplificados por PCR e visualizados em gel de agarose para a confirmação da amplificação do fragmento (Figura 23). O mesmo fragmento também foi obtido do DNA de passagem P1 (selvagem) para efeitos de comparação. Todos os clones continham o fragmento do tamanho esperado (aproximadamente 1kb).

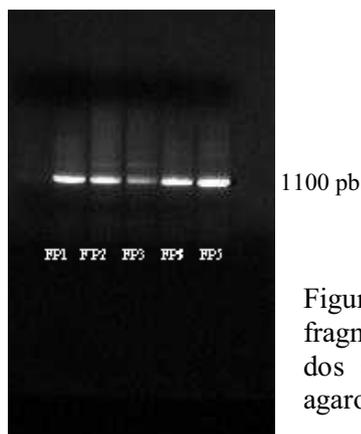
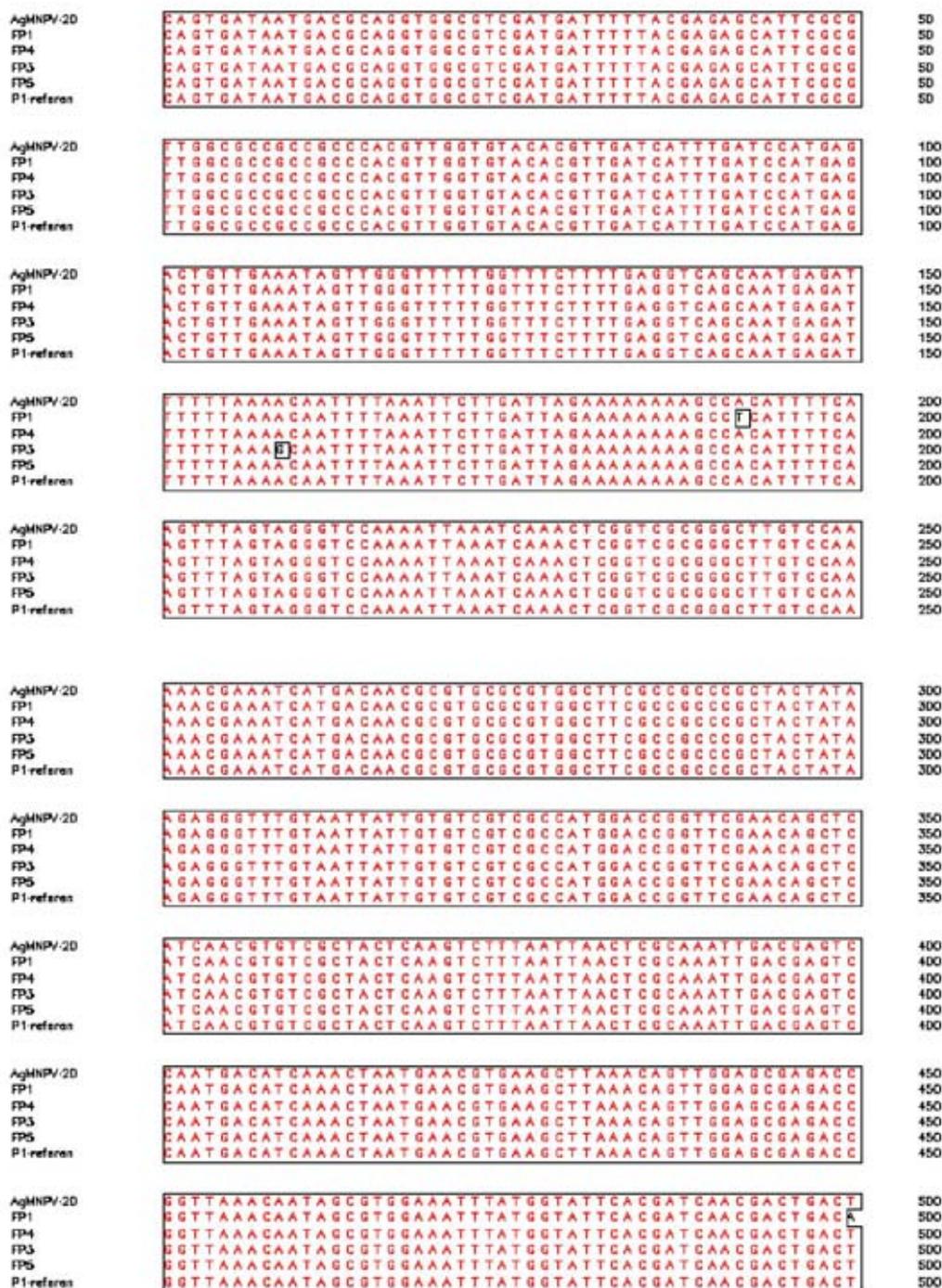


Figura 23 – Produto da amplificação do fragmento correspondente ao gene *25k fp* dos clones FP. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A sequência do gene *25k fp* foi obtida a partir da sequência completa do genoma do vírus AgMNPV-2D determinada por Oliveira *et al.* (2006).

O gene *25k fp* do baculovírus AgMNPV corresponde a ORF 61 e se localiza no genoma entre posição 48592 e 49287 de nucleotídeos na fita negativa do DNA. Portanto seu código de iniciação se localiza na posição 49287 e termina na posição 48592 do genoma viral.

O alinhamento de seqüências nucleotídicas do vírus AgMNPV (DQ813662 – *GenBank/EMBL*), dos clones FP e do protótipo viral P1 (vírus de referência) correspondentes à região do gene *25k fp* permitiu identificar modificações pontuais nas seqüências dos clones FP1, FP3 e FP4 (Figura 24).



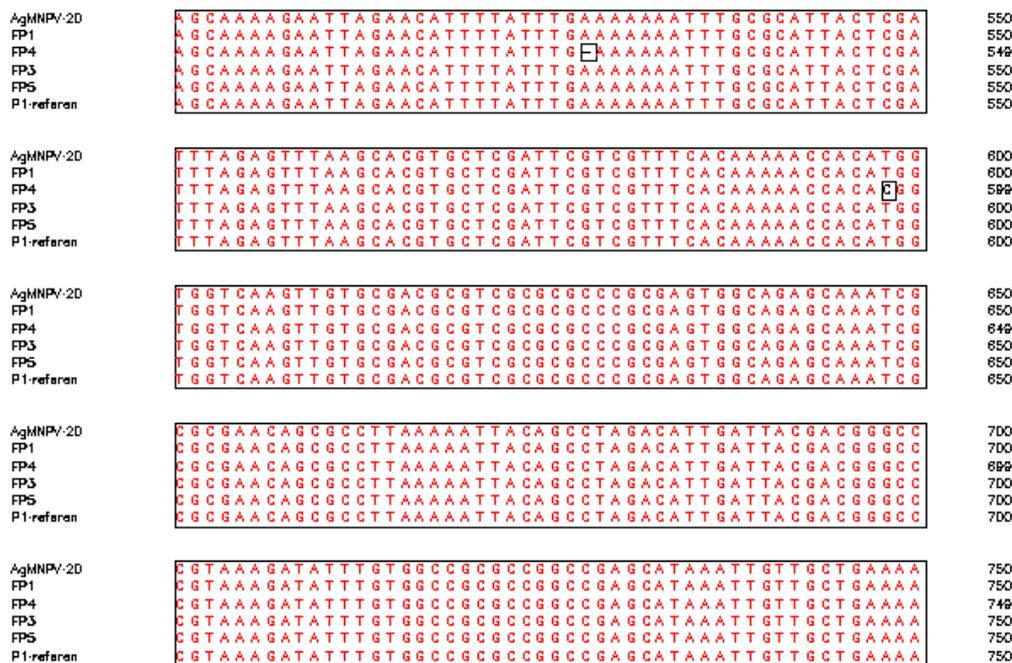


Figura 24 – Alinhamento de seqüências de nucleotídeos do vírus AgMNPV (DQ813662 – GenBank/EMBL), dos clones FP e do protótipo viral P1 correspondentes à regiões do gene 25k fp onde foram detectadas mutações.

No clone FP1 foram encontradas 2 mutações pontuais. Na posição 49048 do genoma correspondente ao gene *25k fp* houve uma mutação da base A→T, mas esta é uma mutação silenciosa, pois não altera o aminoácido (Treonina). A segunda mutação no clone FP1 ocorre na posição 49356 e é uma substituição da base T→A. Esta mutação está localizada a 69 bases antes do códon de iniciação, potencialmente na região promotora do gene e se sobrepõe a região 5' do gene *lef-9* (Figura 25).

Não foram encontradas mutações nos fragmentos correspondentes ao gene *25k fp* nos clones FP2 e FP5.

O clone FP3 apresentou uma mutação pontual com substituição da base T→C na posição 49389 do genoma correspondente ao gene *25k fp*. esta mutação não se encontra na ORF 61 correspondente ao gene 25k e potencialmente deve estar no promotor a 102

bases antes do códon de iniciação do gene e também se sobrepõe a região 5' do gene *lef-9* (Figura 25).

No clone FP4 foram identificadas duas mutações. Uma mutação da base A→G ocorreu na posição 48950 do genoma correspondente ao gene *25k fp*. Esta mutação provocou uma troca do aminoácido Metionina (ATG) para o aminoácido Treonina (ACG). A segunda mutação no clone FP4 foi uma deleção da base A na posição 49020, confirmada por inspeção visual de 2 distintos eletroesferogramas do FP4. O genoma de referência contém uma extensão de 7 adeninas e o mutante contém apenas 6 adeninas nesta posição. Esta mutação causa uma mudança no quadro de leitura levando a um código de terminação prematuro após o aminoácido lisina 82, resultando na produção de uma proteína truncada com 92 aminoácidos ao invés de 231 aminoácidos da proteína 25K do vírus selvagem (AgMNPV-2D).

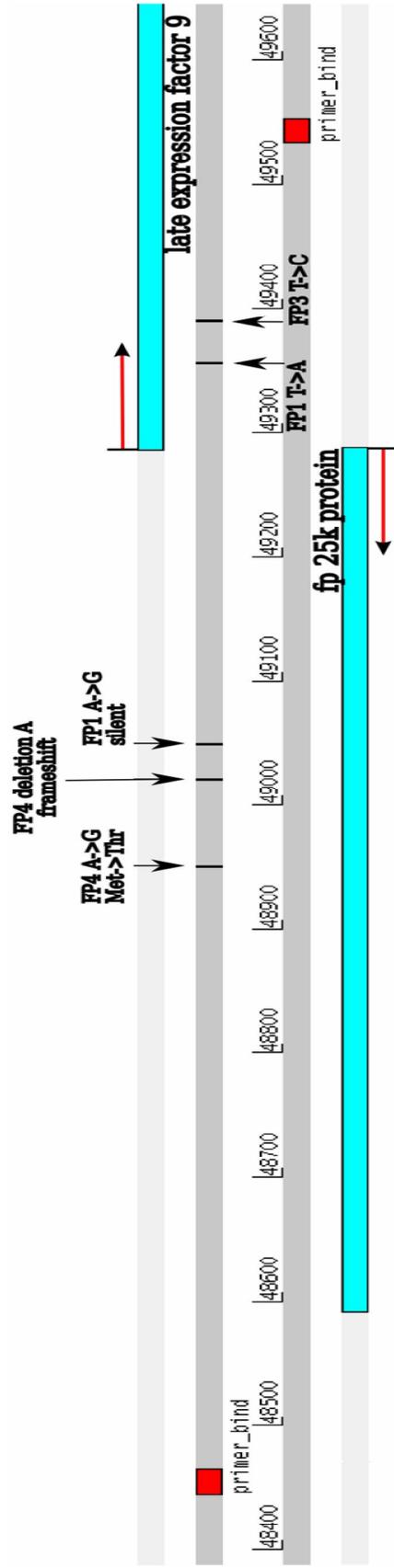


Figura 25 - Diagrama mostrando as regiões no genoma onde estão localizadas as seqüências correspondentes aos genes das proteínas 25K e LEP9 e onde ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores. São demonstrados os locais onde ocorrem as mutações encontradas nos clones FP.

8. Seleção de clones MP

Foram purificados 6 clones MP sendo que 2 clones (MP2 e MP5) foram selecionados devido a maior produção de poliedros/ ml, visando sua produção em larga escala em cultivos celulares. Os títulos virais obtidos na primeira passagem dos clones MP e do vírus AgMNPV-2D foram similares (Tabela 3). O clone viral MP2 produziu uma infecção com 81,0% de células tipo MP, um total de 150 OB/célula e um título viral de $1,20 \times 10^7$ pfu/ml. O clone viral MP5 produziu uma infecção com 63,0% de células tipo MP, uma produção de 125 OB/célula e um título viral de $1,64 \times 10^7$ pfu/ml (Figura 26 e Tabela 3). Embora o vírus AgMNPV-2D, usado como inóculo na primeira passagem e que deu origem aos clones MP, apresentou apenas 54 OB/célula seu título foi muito próximo ao dos clones obtidos ($1,80 \times 10^7$ pfu/ml).

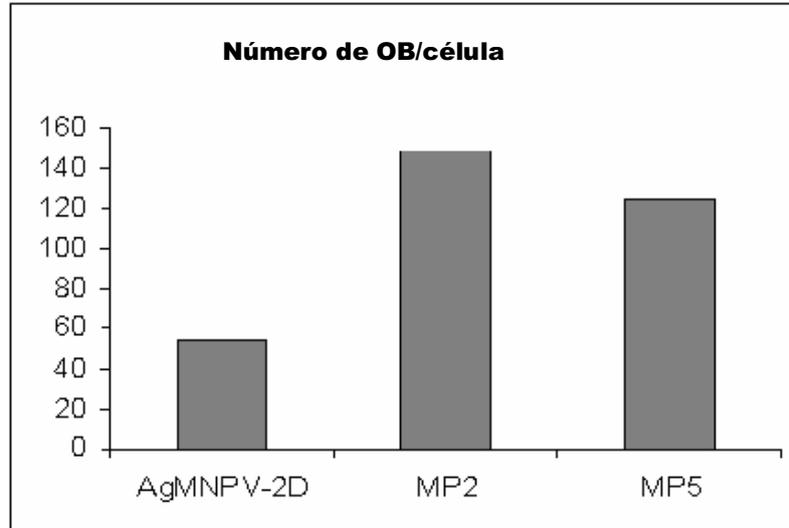


Figura 26 - Produção de poliedros do inóculo inicial AgMNPV-2D, e dos clones virais MP2 e MP5.

Tabela 3 – Produção de partículas BV de variantes MP de AgMNPV. Determinação do título viral pelo método de TCID₅₀

Vírus	*Título viral (pfu/ml)
AgMNPV-2D	1,80 x10 ⁷
Clone MP2	1,20x10 ⁷
Clone MP5	1,64x10 ⁷

*Valores médios de três determinações do título de BV.

DISCUSSÃO

Passagem serial de baculovirus em cultura de células gera, em uma alta frequência, alterações genômicas que se acumulam durante infecções continuadas resultando no fenômeno conhecido como *Efeito Passagem*. Dois tipos principais de mutações podem ser gerados: os vírus interferentes defectivos (DI) e os mutantes de poucos poliedros (FP). Essas mutações frequentemente se tornam dominantes sobre o fenótipo selvagem e significam uma vantagem replicativa do vírus (Krell, 1996). Os efeitos da passagem serial variam com os diferentes tipos de baculovirus e entre as diversas linhagens celulares.

Neste trabalho, procurou-se caracterizar mutantes gerados pela passagem serial do baculovírus AgMNPV-2D em cultura de células BTI-Tn5B1-4 que resultou no acúmulo de mutantes com um fenótipo caracterizado como mutante FP. Tendo isso como objetivo principal, ensaios de infecção foram conduzidos e os efeitos citopáticos monitorados e analisados com base, essencialmente, na produção de partículas OB e BV, geração de mutantes FP e sua predominância em relação ao fenótipo MP, ultraestrutura das células infectadas pelas passagens virais e dos clones FP selecionados, análise comparativa do DNA viral proveniente das passagens e sequenciamento de fragmentos homólogos ao gene *25k fp* dos clones FP selecionados.

Mutantes FP geralmente produzem um decréscimo no número de corpos de oclusão por célula infectada, uma diminuição no número de vírions oclusos em OB, aumento da síntese de partículas BV, alteração no envelopamento do nucleocapsídeo e um aumento no número de OB morfológicamente anormais e ou menos virulentos em

comparação ao vírus tipo selvagem (Hink e Vail, 1973; Harrison e Summers, 1995a; Slavicek *et al.*, 1995; Katsuma *et al.*, 1999).

Passagens sucessivas do baculovirus AgMNPV-2D em cultura de células (Tn5B1-4) foram analisadas procurando detectar a possível ocorrência de alterações genéticas. Dentre 10 passagens virais, a formação de mutantes com fenótipo FP e o acúmulo dessas partículas foram detectados a partir da passagem P6. Esse fenômeno também ocorreu após 6 passagens seriais para o vírus HaSNPV em células de *Helicoverpa zea* como descrito por Lua *et al.*, 2002. A rápida acumulação de mutantes FP em cultura de células também tem sido relatada para outros baculovírus como LdMNPV (Slavicek *et al.*, 1995, 1996, 2001) e SfMNPV (Pedrini *et al.*, 2004).

Os efeitos citopáticos apresentados pelas células infectadas por AgMNPV-2D como células maiores e arredondadas, núcleo hipertrofiado, presença de estroma virogênico e protusões do citoplasma também foram visualizados em células infectadas por outros baculovírus (Volkman e Knudson, 1986; Silveira *et al.*, 2004).

Mudanças típicas de mutantes FP ocorreram na ultraestrutura das células infectadas de passagem serial. A análise ultraestrutural de células infectadas derivadas das passagens P6 a P10 demonstrou que células do tipo FP apresentavam poucos corpos de oclusão (OB) no núcleo e geralmente estes OB possuíam morfologia irregular e apresentavam poucos ou nenhum vírion ocluso, enquanto as células do tipo MP apresentavam muitos OB e estes continham vários vírions. A redução do número de OB por célula infectada FP em comparação a célula MP também foi detectada por Lua *et al.*, 2002 e Pedrini *et al.*, 2005.

Harrison e Summers (1995a) observaram alteração no processo de envelopamento de vírions produzidos por células infectadas com vírus contendo mutações no gene *25k fp*. Em células infectadas com vírus mutantes FP, frequentemente a membrana dos ODV não incluía completamente os nucleocapsídeos e o envelopamento dos nucleocapsídeos raramente completava e até mesmo quando o envelopamento era completo, este apresentava um perfil assimétrico. Esse processo não foi visualizado nesse trabalho nem em células infectadas após passagem serial, ou em células infectadas com os clones virais FP.

Em altas passagens, também em clones FP, muitas células apresentaram, diferentemente de uma oclusão viral, uma região com estroma virogênico bem definido contendo muitos vírions, indicando intensa replicação viral. Essas características também são exibidas pelos baculovírus AcMNPV (Wood, 1980; Harrison e Summers, 1995a), TnMNPV (Potter *et al.*, 1976), GmMNPV (Fraser e Hink, 1982; Fraser *et al.*, 1983), LdMNPV (Slavicek *et al.*, 1995), BmMNPV (Katsuma *et al.*, 1999) HaSNPV (Luo *et al.*, 2002) e SfMNPV (Pedrini *et al.*, 2004).

A porcentagem de células com OB diminuiu com a passagem serial. Além disso, houve um declínio de células com muitos OB em paralelo a um aumento de células com menos de 20 partículas OB. A produção de poliedros também diminuiu com a passagem serial num valor de 30 vezes, sendo, que nas últimas passagens poucas células com OB foram detectadas. Este fato deve contribuir para um decréscimo na virulência, pois as partículas oclusas (OB) são as responsáveis pela transmissão natural do vírus de inseto para inseto. Os OB de mutantes FP geralmente possuem baixa virulência em

experimentos de bioensaios (*in vivo*) (Potter *et al.*, 1976; Fraser e Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1995; Lua *et al.*, 2002).

Simultâneo a diminuição da partícula OB, houve um aumento da produção de BV. A estabilidade e vantagem seletiva do mutante FP em cultura de células são atribuídas ao aumento da produção de BV (Potter *et al.*, 1976; Fraser e Hink, 1982; Fraser e McCarthy, 1984), uma vez que esta partícula é a principal responsável pela infecção célula a célula (Keddie e Volkmann, 1985). Mutantes FP são frequentemente selecionados em cultura de células porque as taxas de replicação de BV desses mutantes são maiores que as do vírus tipo selvagem (Harrison e Summers, 1995a).

O título do vírus não ocluso (BV) aumentou principalmente nas passagens P5 e P7 (quando foram selecionados os clones FP), alcançando um aumento de até 2.000 vezes da passagem inicial P1 para a passagem P7. Essa diferença altamente significativa evidencia e deve ser atribuída a ocorrência do efeito passagem.

Em passagem mais alta, P9, o título viral teve um declínio, mas ainda assim permaneceu com um aumento de quase 50 vezes com relação às passagens iniciais. Kanokwan *et al.* (2006) estudando o efeito passagem do HaNPV (no total de 10 passagens) também obtiveram aumento do título viral de BV em passagens iniciais (2 a 6) que depois diminuiu gradualmente em passagens posteriores. Pedrini *et al.*, 2005 relacionam o aparecimento de DI a um declínio na produção de BV ocorrido durante extensa passagem serial do vírus HaSNPV. Alto título de BV também foi relatado em mutantes FP de AcMNPV (Harrison e Summers, 1995b; Wood, 1980), TnMNPV (Potter *et al.*, 1976, 1978) e LdMNPV (Slavicek *et al.*, 1995). O título de BV de

mutantes FP de LdMNPV exibiu um significativo aumento com o aparecimento de mutantes FP (Slavicek *et al.*, 1995).

O aumento da produção de BV, o decréscimo na formação de OB e a diminuição da oclusão viral são eventos típicos exibidos por mutantes FP (Potter *et al.*, 1976; Fraser e Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1992).

A formação de vírus interferentes defectivos (DI) é uma alteração genômica também comum em cultivos celulares e tem sido relatada por vários autores (Burand *et al.*, 1983; Wickhan *et al.*, 1991; Lee e Krell, 1992; Pijlman *et al.*, 2001 e 2004; Rodas *et al.*, 2005).

O perfil de restrição do DNA de AgMNPV obtido das diferentes passagens não apresentou polimorfismo, o que indica a ausência de grandes deleções, inserções ou rearranjos. A ausência de grandes perdas do genoma viral aliada ao aumento do título viral de BV reforçam a possibilidade de não estar ocorrendo a formação de vírus interferentes defectivos (DI) durante as passagens estudadas. Porém, é recomendável a continuidade deste estudo analisando passagens mais altas do vírus. Não se pode descartar a possibilidade de vírus interferentes defectivos (DI) serem produzidos em passagens mais altas do AgMNPV.

Mutantes DI e FP induzem os mesmos efeitos citopáticos e similar morfologia e produção de poliedros. Nas últimas passagens, com o aumento dramático do título viral, e conseqüente aumento de MOI, é possível que ao invés de mutantes FP, partículas DI também tenham sido desenvolvidas e que não foram evidenciadas no perfil de restrição

de DNA apresentado. Além disso, uma redução de 40 vezes na produção de BV foi observada da passagem P7 para a P9, o que poderia ser explicado pela possível ocorrência da formação de DI, como observado por Pedrini e colaboradores para o vírus HaSNPV (2005).

No estudo apresentado por Rodas *et al.* (2005), durante a passagem serial de um isolado selvagem de AgMNPV em células SF9 cultivadas em *shaker* foi detectada a presença de partículas interferente defectivas (DI) por análise do perfil de restrição do DNA digerido com *HindIII* e *PstI*. Entretanto, as células e as condições utilizadas no presente trabalho foram totalmente diferentes das utilizadas por Rodas e colaboradores.

O surgimento do fenótipo FP durante a passagem serial em cultura de células frequentemente é relacionado com a presença de inserções e deleções que ocorrem predominantemente no locus 25K (Beames e Summers, 1989) e tem sido relatado em AcMNPV e GmMNPV (Fraser *et al.*, 1983; Kumar e Miller, 1987; Cary *et al.*, 1989, Bull *et al.*, 2003). Também inserções espontâneas de transposons originados do DNA da célula hospedeira no gene *25k fp* são frequentes e tem sido relacionadas ao fenótipo FP (Cary *et al.*, 1989; Bull *et al.*, 2003).

O fato de nenhuma mudança significativa ter sido detectada por análise de restrição do DNA das passagens seriais do vírus AgMNPV-2D contribuiu com a hipótese de que pequenas mudanças pontuais, como simples inserções ou deleções no gene *25k fp* de AgMNPV poderiam estar ocorrendo e induzindo a formação do fenótipo FP. Essa indicação foi comprovada mais adiante pelo sequenciamento dos clones FP selecionados.

Como a seleção de mutantes FP é feita pelo processo de *plaque assay* e nesse processo um único vírion é requerido para iniciar uma placa, conclui-se que os mutantes FP selecionados não devem ser vírus interferentes defectivos (DI), uma vez que estes necessitam de um vírus *helper* para proceder a infecção (Potter *et al.*, 1976).

Neste estudo, cinco clones virais inicialmente com características fenotípicas de mutantes FP foram purificados (FP1, FP2, FP3, FP4, FP5). Células infectadas por estes clones apresentaram sinais de infecção evidentes como núcleo hipertrofiado, presença de estroma virogênico e presença de nucleocapsídeos. Assim, como visto por Lua *et al.* (2002), muitas células FP não continham OB.

Embora tenham sido isolados clones com baixa formação de células contendo muitos OB no núcleo, o clone FP2 parece ter resgatado a capacidade de formar células do tipo MP ou talvez em algum momento tenha sido contaminado com vírus selvagem. Observações como grande produção de partículas OB infectivas, perfil protéico mostrando alta síntese de poliedrina, e ausência de qualquer tipo mutação na região correspondente ao gene *25k fp*, todas similares às obtidas com células infectadas com o vírus padrão (AgMNPV-2D P1), suportam a constatação de que o FP2 não deve ser um mutante FP.

Todos os demais clones FP apresentaram características fenotípicas de mutante FP em nível de análise ultraestrutural e de análise da seqüência nucleotídica de produtos de PCR contendo o gene *25k fp*, a exceção apenas do clone FP5 que não apresentou qualquer alteração na seqüência analisada. Os clones FP1, FP3 e FP4 apresentaram mutações pontuais no gene *25k fp* assim como foi encontrado para LdMNPV (Slavicek *et*

al., 1995; Bischoff e Slavicek, 1997), HaSNPV (Lua *et al.*, 2002) e BmMNPV (Katsuma *et al.*, 1999). O clone FP4 ainda apresentou a deleção pontual de uma base.

Embora nenhuma mutação no gene *25k fp* tenha sido encontrada para o clone FP5, este clone apresentou muita semelhança com os outros clones mutantes FP selecionados, tanto em relação às características fenotípicas como ao perfil protéico apresentado. Todos os clones FP, exceto o clone FP2, apresentaram reduzida ou quase nenhuma síntese de poliedrina, diferente da observada para células infectadas com o vírus padrão (AgMNPV-2D P1).

Dentre os clones mutantes FP, o clone FP1 foi o que apresentou menor formação de células com poliedros. A maioria das células não continham poliedros e eram células do tipo FP. Das duas mutações pontuais que o clone FP1 apresentou na região correspondente ao gene *25k fp* uma se localiza provavelmente na região promotora e a outra é uma mutação silenciosa que não causa a mudança de tipo de aminoácido.

Hu *et al.* (1999) desenvolvendo estudos sobre a especificidade da poliedrina na geração de corpos de oclusão de baculovirus e também considerando outros trabalhos anteriormente desenvolvidos relatam que a poliedrina e partículas ODV são provavelmente as principais entidades diretamente envolvidas na oclusão da partícula ODV. Além disso, considerando que proteína 25K não é um componente do ODV e que uma mutação no gene *25k fp* pode resultar em reduzida síntese de poliedrina (Jarvis *et al.*, 1992), como demonstrado pelos resultados obtidos no presente trabalho, foi então sugerido que a proteína 25K deve exercer indiretamente um papel no processo de oclusão viral (Harrison e Summers, 1995a; 1995b).

Portanto, outros genes responsáveis pela formação do OB e oclusão viral devem ser investigados quanto à presença de alterações que expliquem os fenótipos apresentados pelos clones FP1 e FP5.

Com a passagem serial, durante a seleção dos clones FP, também foram selecionadas placas com características de MP (clones MP2 e MP5), onde as células apresentavam muitos poliedros por núcleo além de alta produção de BV. Vírus estáveis com fenótipo MP e que não formam mutantes FP isolados durante a passagem serial também foram obtidos por Slavicek *et al.* (1996 e 2001) e Pedrini *et al.* (2005). Os clones MP2 e MP5 atualmente estão sendo testados quanto à estabilidade em passagem serial. Estes clones que exibem fenótipo MP se tiverem estabilidade em passagem serial podem ser de grande importância para a produção do vírus AgMNPV em cultura de células Tn5B1-4.

O estudo das alterações causadas pela passagem do vírus AgMNPV em cultura de células, neste trabalho, é bastante relevante diante do pouco conhecimento relatado sobre sua produção em sistema *in vitro* e também por se tratar de um baculovirus (AgMNPV) amplamente utilizado como biopesticida no Brasil.

CONCLUSÕES

- A passagem serial do vírus AgMNPV em células cultivadas de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) induziu alterações típicas de efeito passagem similares a outros sistemas descritos na literatura.
- A passagem sucessiva do baculovírus em cultura de células levou a diminuição da produção de poliedros e o aumento da produção de vírus extracelular (BV).
- A acumulação de mutantes FP (*Few Polyhedra*) foi evidenciada a partir da sexta passagem do vírus.
- Poliedros formados pela infecção com mutantes FP apresentaram formato irregular com menor número de vírions oclusos que poliedros do vírus selvagem.
- As principais mutações identificadas nos clones FP são pontuais e ocorreram na região do locus do gene *25k fp*.
- Em relação ao clone FP5, alterações genéticas devem ter ocorrido em outro local do genoma.
- A obtenção de variantes MP (*Many Polyhedra*) de AgMNPV constitui uma interessante estratégia para multiplicação do vírus em biorreatores

PERSPECTIVAS

Diante da importância de pesquisas para desenvolvimento de sistemas de produção *in vitro* e com base nos resultados obtidos neste trabalho, os seguintes estudos poderão ser alvos de futuras investigações:

- Construção de um baculovirus recombinante de AgMNPV com interrupção (*knock out*) do gene *25k fp* visando experimentos de *marker rescue*, para análise de sua função.
- Sequenciamento do gene da poliedrina de mutantes FP para verificação de possíveis mutações em outras regiões do genoma do vírus AgMNPV.
- Realização de maior número de passagens do vírus AgMNPV para investigação da geração de vírus interferentes defectivos.
- Realização de bioensaios utilizando partículas virais de sedimentos de células infectadas ou por injeção intrahemocélica de sobrenadantes contendo BV resultantes da passagem serial de AgMNPV, para confirmação do efeito na redução da virulência.
- Determinação da estabilidade genética de variantes *Many Polyhedra* de AgMNPV pela passagem serial dos clones MP selecionados, visando o seu emprego como inóculo em cultivos com escala maior de produção (biorreator).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya, A., Sriram, S., Sehrawat, S., Rahman, M., Sehgal, D., Gopinathan, K. P. 2002. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: Molecular biology and biotechnological applications for large-scale synthesis of recombinant proteins. *Current Science* 83: 455-465.

Agathos, S.N. 1996 Insect cell bioreactors. *Cytotechnology*, 20: 173-189.

Ahrens, C. H., Pearson, M. N., Rohrmann, G. F. 1995. Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* 207: 572-576.

Allen, G., E., Knell, J.D. 1977. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. *Florida Entomologist* 60: 233-240

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

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* 202:586-605.

Bangham, C. R. M., Kirkwood, T. B. L. 1990. Defective interfering particles: Effects in modulating virus growth and persistence. *Virology* 179:821-826.

Beames, B., Summers, M. D. 1989. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. *Virology* 168:344-353.

Bilimoria, S. L., Demirbag, Z., Ng, H., Reinisch, A. J. 1992. Abortive cell culture infections of nuclear polyhedrosis viruses as model systems for host specificity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 27:123-141.

Bischoff, D. S., Slavicek, J. M. 1997. Phenotypic and Genetic Analysis of *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Few Polyhedra Mutants: Mutations in the 25K FP Gene May Be Caused by DNA Replication Errors. *Journal of Virology* 71: 1097-1106.

Black, B. C., Brennan, L. A., Dierks, P. M., Gard, I. E. 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. In: *The Baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.) New York, 341-387.

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

Blissard, G. W., Black, B. C., Crook, N., Keddie, B. A., Possee, R. D., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Volkman, L. E. 2000. Family Baculoviridae. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 195-202.

- Blissard, G.W. 1996. Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20: 73-93.
- Boyce, F. M., Bucher, N. L. R. 1996 Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2348-2352.
- Braunagel, S. C., Burks, J. K., Rosas-Acosta, G., Harrison, R. L., Ma, H. e Summers, M. D. 1999. Mutations within the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *Journal of Virology* 73:8559–8570.
- Braunagel S. C., Russell W. K., Rosas-Acosta G., Russell D. H., Summers M. D. 2003. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:9797–9802.
- Braunagel, S. C., Summers, M. D. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202:315-328.
- Bulach D. M., Kumar C. A., Zaia A., Linag, B. F., Tribe, D. E. 1999. Group II *nucleopolyhedrovirus* subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 59-73.
- Bull, J. C., Godfray, H. C., O'Reilly, D.R. 2003. A few-polyhedra mutant and wild-type *nucleopolyhedrovirus* remain as a stable polymorphism during serial co-infection in *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2052–2057.
- Burand, J. P., Wood, H. A., Summers, M. D. 1983. Defective particles from a persistent baculovirus infection in *Trichoplusia ni* tissue culture cells. *Journal of General Virology* 64: 391-398.
- Carpenter, W. M., Bilimoria, S. L. 1983. A semipermissive nuclear polyhedrosis virus infection: Characterization of infection kinetics and morphogenesis. *Virology* 130:222-227.
- Carstens, E. B. 1982. Mapping the mutation site of an *Autographa californica* nuclear polyhedron morphology mutant. *Journal of Virology* 43:809-818.
- Carstens, E.B., Krebs, A., Gallerneault, C.E. 1986. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *Journal of Virology* 58, 684–688.
- Carstens, E. B., Lin-Bai, Y., Faulkner, P. 1987. A Point Mutation in the Polyhedrin Gene of a Baculovirus, *Autographa californica* MNPV, Prevents Crystallization of Occlusion Bodies *Journal of General Virology*. 68: 901 905.
- Carstens, E. B., Williams, G. V., Faulkner, P., Partington, S. 1992. Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; molecular and ultrastructural features. *Journal of General Virology* 73: 1471–1479.

- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E., Frasen, M. J. 1989. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172:156–169.
- Castro, M. E. B., Ribeiro, Z. M. A., Souza, M. L. 2006 Infectivity of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* to different insect cell lines: morphology, viral production, and protein synthesis. *Biological Control* 36: 299–304.
- Castro, M. E. B., Souza, M. L., Sihler, W., Rodrigues, J. C. M., Ribeiro, B. M. 1999. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 10: 1733-1761.
- Castro, M. E. B., Souza, M. L., Araujo, S., Bilimoria, S. L. 1997. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four Lepidopteran cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology* 69:40–45.
- Chakraborty, S., Reid, S. 1999. Serial passage of a *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* in *Helicoverpa zea* cell cultures. *Journal of General Virology* 73:303-308.
- Chakraborty, S., Monsour, C., Teakle, R., Reid, S. 1999. Yield, Biological Activity, and Field Performance of a Wild-Type *Helicoverpa Nucleopolyhedrovirus* Produced in *H. zea* Cell Cultures. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 199–205.
- Charlton, C. A., Volkman, L. E. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces action cable formation. *Virology* 197: 245-254.
- Chen, X. 2001. Genomics and genetic engineering of *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*. Wageningen, Holanda, 2001. 154p. Tese (Doutorado), Universidade de Wageningen, Holanda.
- Chou, H. H., Holmes M. H. 2001. DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17: 1093-1104.
- Cooper, P. 1967. The plaque assay of animal viruses. In *Methods in Virology*, Vol. III., Eds. K. Maramorosch e H. Koprowski, pp. 244-311. New York: Academic Press
- Dalmolin, C. C., Silva, F. R., Mello, L. V., Rigden, D. J., Castro, M. E. B. 2005. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. *Virus Research* 110:99-109.
- Douris, V., Swevers, L., Labropoulou, V., Andronopoulou, E., Georgoussi, Z., Iatrou K. 2006. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. *Advance in Virus Research* 68: 113-156.

Ewing, B., Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.

Faulkner, P. 1981. Baculovirus. In: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Davidson, E. W., Allenheld, Osmun and Co., (Ed.) New York. p. 3-37.

Fraser, M. J. 1987. FP mutation of nuclear polyhedrosis viruses: A novel system for the study of transposon-mediated mutagenesis. In: *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*. Maramorosch K. (Ed.) New York, 265-293.

Fraser, M. J., Hink, W. F. 1982. The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 117:366-378.

Fraser, M. J., McCarthy W. J. 1984. The detection of FP plaque variants of *Heliothis zea* nuclear polyhedrosis virus grown in the IPLB-HZ 1075 insect cell line. *Journal of invertebrate pathology* 43: 427-429.

Fraser, M. J., Smith, G. E., Summers, M. D. 1983. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: Relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Virology* 47:287-300.

Gioria, V. V., Jäger, V., Claus, J. D. 2006. Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. *Cytotechnology* 52:113-124.

Granados, R. R., Guoxun, L., Derksen, A. C. G., McKenna, K. A. 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 260-266.

Greene, G. L.; Leppa, N. C.; Dickerson, W. A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69: 487-488.

Goodman, L. C., McIntosh, A. H. 1994. Production of baculoviruses for insect control using cell culture. In: *Insect Cell Biotechnology*. Maramorosh, K. e McIntosh, A. H. (Ed) Flórida, 33-56.

Goulson, D. 2003. Can host susceptibility to baculovirus infection be predicted from host taxonomy or life history? *Environmental Entomology* 32: 61-70.

Granados, R. R., Federici, B. A. 1986. The biology of baculoviruses. Florida: CRC Press, v 1, 89-108.

Green, P. 1996. PHRAP (analysistools/phrap.htm, <http://genome.washington.edu/uwgc/>).

- Greenfield, P. F., Reid, S., Weiss, S., Scholz, B. 1999. Baculovirus as biological control agents: research, production and commercial issues. In *The 5th Asia-Pacific Biochemical engineering conference Proceedings*. Phuket, Thailand.
- Gooijer, C. D., Van Lier, F. L. J. Van den End, E. J., Vlak, J. M., Tramper, J. 1989. A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30:497-501.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., Volkman, L. E. 2004. P74 mediates specific binding of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology* 78:6786-6791.
- Harrison, R. L., Summers, M. D. 1995a. Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology* 76:1451-1459.
- Harrison, R. L., Summers, M. D. 1995b. Biosynthesis and localization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 25K gene product. *Virology* 208:279-288.
- Harrison, R. L., Jarvis, D. L., Summers, M. D. 1996. The role of the AcMNPV 25K gene, "FP25," in Baculovirus *polh* and *p10* expression. *Virology*, 226: 34-46.
- Hashimoto, Y., Hatanaka, E., Ishizaki A., Matsumoto, T. 1993. Production of defective genomes of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus by serial passage through cultured cells. *Journal of Applied Entomology and Zoology* 37:240-243.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A., Possee, R.D. 1997. Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* - infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238:243-253.
- Hefferon, K. L., Miller, L. K. 2002. Reconstructing the replication complex of AcMNPV. *European Journal of Biochemistry* 269:6233-6240.
- Herniou, E. A., Luque, T., Chen, X., Vlack, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S., O'Reilly, D. R. 2001. Use of the whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology* 75: 8117 - 8126.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., Cory, J. S. 2004. Ancient co-evolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology* 78:3244-3251.
- Hink, W. F., Vail, P. V. 1973. A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN-368) cell line. *Journal of Invertebrate Pathology* 22:168-174.

Hoffman-Campo, C. B., Oliveira, E. B. de, Moscardi, F. 1985. *Criação massal da lagarta-da soja (Anticarsia gemmatalis)*. Londrina: Embrapa-CNPSO, 22p. (Embrapa-CNPSO. Documentos, 10).

Hofmann, C., Strauss, M. 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Therapy* 5: 531-536.

Hong, T., Braunagel, S. C., Summers, M. D. 1994. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204:210-222.

Horton, H. M., Burand, J. P. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology* 67:1860-1868.

Hu, Z. H., Luijckx, T., Van Dinten, L. C., Van Oers, M. M., Hajos, J. P., Bianchi, F. J. J. A., Van Lent, J. W. M., Zuidema, D., Vlak, J. M. 1999. Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. *Journal of General Virology* 80: 1045–1053.

Hu, Y. C. 2006. Baculovirus vectors for gene therapy. *Advances in Virus Research* 68: 287-320.

Jarvis, D. L., Bohlmeier, D. A., Garcia, A. Jr. 1992. Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection. *Journal of Virology* 66:6903-6911.

Jarvis, D. L. 1997. Baculovirus expression vectors. In: *The Baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.) New York, 389-431.

Jehle J. A., Lange M., Wang H., Hu Z., Wang Y., Hauschild R. 2006a. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* 346:180-193.

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., Vlak, J. M. 2006b. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology* 151:1257-1266.

Johnson, D. W., Maruniak, J. E. 1989. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. *Journal of General Virology* 70: 1877–1883.

Kanokwan, P., Kultida, P., Somkiet, T., Phenjun., M. 2006. Studies of passage effect of HaNPV baculovirus produced in Hz insect cell culture *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* 163–167.

Katsuma, S., Noguchi, Y., Zhou, C. L., Kobayashi, M., Maeda, S. 1999a. Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: implications for post-mortem host degradation. *Journal of*

General Virology 80:783-91.

Katsuma, S., Noguchi, Y., Shimada, T., Nagata, M., Kobayashi, M., Maeda, S., 1999b. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Archives of Virology* 144: 1275–1285.

Katsuma, S., Tanaka, S., Shimada, T., Kobayashi, M. 2004, Reduced cysteine protease activity of the hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected with fp25K-inactivated *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus results in the reduced postmortem host degradation. *Archives of Virology* 149: 1773-1782.

Keddie, B. A. e Volkmann, L. E. 1985. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: importance of the 64K envelope glycoprotein. *Journal of General Virology* 66:1195-2000.

Keddie, B., Aponte, G., Volkman, L. E. 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243:1728–1730.

Kelly, B. J., King, L. A., Possee, R. D., Chapple, S. D. J. 2006. Dual mutations in the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *FP-25* and *p35* genes result in plasma-membrane blebbing in *Trichoplusia ni* cells. (Short communication) *Journal of General Virology* 87: 531–536.

Knudson, D. L., Tinsley, T. W. 1974. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus. *Journal of Virology* 14:934-944.

Knudson, D. L. 1976. Plaque assay of baculoviruses: visible plaques under solid agarose overlays. *Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology and IXth Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology*, 104–107.

Kool, M., Ahrens, C. H., Vlak, J. M., Rohrmann, F. 1995. Replication of baculovirus DNA. *Journal of General Virology* 76:2103-2118.

Kool, M., Voncken, J. W., van Lier, F. L., Tramper, J. e Vlak, J. M. 1991. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology* 183:739-746.

Kost, T. A., Condreay, J. P., Jarvis, D. L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23:567-575.

Krell P J. 1996. Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology* 20:125–137.

Kumar, S., Miller, L. K. 1987. Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture. *Virus Research* 7:335-349.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lee, H. Y., Krell, P. J. 1992. Generation and analysis of defective genomes of infection by three baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 129–131.
- Liang, C. Y., Wang, H. Z., Li T. X., Hu, Z. H., Chen X.W. 2004. High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Archives of Virology* 149:51–60.
- Lin, G. Y., Zhong, J., Wang X., 2000. Abnormal Formation of Polyhedra Resulting from a Single Mutation in the Polyhedrin Gene of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 13–19.
- Liu, H. S. 1987. Host specific expression of baculovirus *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus, in insect cell lines. Lubbock, TX: Texas Tech. Univ., 83p. Ph.D. Thesis.
- Lu A., Miller L. K. 1995. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *Journal of Virology* 69:975–982.
- Lu, A., Miller, L. K. 1997. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: *The Baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.), 193–216.
- Lua, L. H. L., Reid, S., 2000. Virus morphogenesis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* serum-free suspension culture. *Journal of General Virology* 81: 2531–2543.
- Lua, L. H. L., Pedrini M. R. S., Reid, S., Robertson, A., Tribe, D. E. 2002. Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. *Journal of General Virology* 83:945-955.
- Lua, L. H. L., Reid, S., 2003. Growth, viral production and metabolism of a *Helicoverpa zea* cell line in serum-free culture. *Cytotechnology* 42: 109–120.
- Luckow, V. M. 1990. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: *Recombinant DNA technology and applications*. Ho C., Prokop A., Bajpai R.(Eds). McGraw-Hill, New York.
- Luckow, V. A., Summers, M. D. 1988. Trends in the development of baculovirus vectors. *Bio Technology* 6:47–55.
- Lynn, D. E. 1999. Development of insect cell lines: Virus susceptibility and applicability to prawn cell culture. *Methods in Cell Science* 21: 173–181.
- Lynn, D. E. 2003a. Comparative susceptibilities of insect cell lines to infection by the occlusion-body derived phenotype of baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 215–222.
- Lynn, D. E. 2003b. Comparative susceptibilities of twelve insect cell lines to infection by three baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 82:129–131.

- Mackinnon, E. A., Henderson J. F., Stoltz D. B., Faulkner, P. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. *Journal of Ultrastructure Research* 49:419-435.
- Marques, F., 2005. Influência do oxigênio dissolvido na produção de poliedros de baculovírus por células de inseto em biorreator. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
- Marks, D. M. 2003. Equipment design consideration for large scale culture. *Cytotechnology* 42: 21-33.
- McIntosh, A. H., Grasela, J. J., Popham, H. J. R. 2005. AcMNPV in permissive, semipermissive, and nonpermissive cell lines from arthropoda. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 41:298–304.
- Miller, L. K. 1997. Introduction to the baculoviruses. In: *The Baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.), 1-6.
- Moscardi, F. 1983. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. Londrina, PR: Embrapa Soja, 21p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 23).
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44:257-289.
- Moscardi, F., Santos, B. 2005. Produção comercial do nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lep.: Noctuidae) em laboratório. In: *Proceedings of the IX Simposio de Controle Biológico*, Recife, Brazil, p. 42.
- Moscardi, F., Souza, M. L. 2002. Baculovírus para o controle de pragas: Panacéia ou realidade? *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 24: 22-29.
- Moscardi, F., Morales, L., Santos, B. 2002. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, in soybean in Brazil. In: *International colloquium on invertebrate pathology and microbiol control. 35th Annual Meeting of the SIP*, 86-91.
- Murhammer D. W. 1996. Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59:199–220
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A. 1992. Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual. Freeman W. H. (Ed.), 347.
- Oliveira, J. V. C., Wolff, L. C., Maruniak, A. G., Ribeiro, B. M., Castro, M. E. B., Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E., Zanotto, P. M. A. 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 87:01–18.

- Payne, C. C. 1988. Pathogens for the Control of Insects: Where Next? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 318: 225-248.
- Pedrini, M. R. S., Wolff, J. L. C., Reid, S. 2004. Fast accumulation of few polyhedra mutants during passage of a *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in Sf9 cell cultures. *Annals of Applied Biology* 145:107–112.
- Pedrini, M. R. S., Nielsen, L. K., Reid, S., Chan, L.C. L. 2005. Properties of a unique mutant of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus that exhibits a partial many polyhedra and few polyhedra phenotype on extended serial passaging in suspension cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 41: 289-297.
- Pedrini, M. R. S., Christian, P., Nielsen, L.K., Reid, S, Chan, L. C. L. 2006. Importance of virus–medium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell cultures. *Journal of Virological Methods* 136: 267–272.
- Pearson, M. N., Groten, C., Rohrman, G. H. 2000. Identification of the *Lymnandria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *Journal of Virology* 74:6126-6131.
- Pijlman, G. P., Born, E. V. D., Martens, D. E., Vlak, J. M. 2001. *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* 283:132-138.
- Pijlman, G. P., Vermeesch, A. M. G., Vlak, J. M. 2004. Cell line-specific accumulation of the baculovirus non-hr origin of DNA replication in infected insect cells. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 214–219.
- Potter, K. N., Faulkner, P., MacKinnon, E. A. 1976. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 18:1040-1050.
- Potter, K. N., Jaques, R. P., Faulkner, P. 1978 .Modification of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus passaged *in vivo*. *Intervirology* 9:76-85.
- Rahman, M. M., Gopinathan, K. P. 2004. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, *Virus Research* 101: 109–118.
- Reed, L., Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene* 27:493-497.
- Ribeiro, B. M., Gerino, A. P. M. O., Acácio, C. N. L., Kalapothakis, E., Bão, S. N., 2009. Characterization of a new *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) polyhedra mutant. *Virus Research* 140: 1-7.

- Rhodes, D. J. 1996. Economics of baculovirus-insect cell production systems. *Cytotechnology* 20:291-297.
- Rodas, V. M., Marques, F. H., Honda, M. T., Soares, D. M., Jorge, S. A. C., Antoniazzi, M. M., Castro, M. E. B., Ribeiro, B. M., Souza, M. L., Tonso, A., Pereira, C. A. 2005. Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology* 48:27-39.
- Rohrmann, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73:749-761.
- Rohrmann, G. F. 1999. Nucleopolyhedrovirus. In: *Encyclopedia of Virology*. Granoff, A. e Webster, R. G. (Ed) New York, 146-152.
- Rohrmann, G.F. 1986. Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* 67:1499-1513.
- Rosas-Acosta, G., Braunagel, S. C.; Summers, M. D. 2001. Effects of deletion and overexpression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *FP25K* gene on synthesis of two occlusion-derived virus envelope proteins and their transport into virus-induced intranuclear membranes. *Journal of Virology* 75:10829-10842.
- Russell, R. L. Q., Rohrmann, G. F. 1993. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology* 195: 532-540.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis. 1989. T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shuler, M. L., Wood, A., Granados, R. R., Hammer, D. A. 1995. Baculovirus Expression Systems and Biopesticides, New York: Wiley-Liss, p. 259.
- Silveira, E. B., Cordeiro, B. A., Ribeiro, B. M., Bão, S. N. 2004. Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in hemocytes from its natural larval host the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tissue Cell* 36: 171-180.
- Slavicek, J. M., Hayes-Plazolles, N., Kelly, M. E. 1995. Rapid formation of few polyhedra mutants of *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus during serial passage in cell culture. *Biological Control* 5:251-261.
- Slavicek, J. M., Mercer, M. J.; Kelly, M. E., Hayes-Plazolles, N. 1996. Isolation of a baculovirus variant that exhibits enhanced polyhedra production stability during serial passage in cell culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 67:153-160.
- Slavicek, J. M., Podgwaite, J., Lanner-Herrera, C. 1992. Properties of two *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus isolates obtained from the microbial pesticide Gypchek. *Journal of Invertebrate Pathology* 59:142-148.

- Slavicek, J. M., Hayes-Plazolles, N., Kelly, M. E. 2001. Identification of a *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus isolate that does not accumulate few-polyhedra mutants during extended serial passage in cell culture *Biological Control* 22: 159–168.
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D. 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology* 46:584-593.
- Sohi, S. S., Percy, J., Arif, B. M., Cunningham J. C. 1984. Replication and serial passage of a singly enveloped baculovirus of *Orgyia leucostigma* in homologous cell lines. *Intervirology* 21:50-60.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., Souza, M. L. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24:143-160.
- Tanada Y., Kaya H. K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, CA, USA New York, cap 6 p 171-244.
- Tani, H., Limn, C. K., Yap, C. C., Onishi, M., Nozaki, M., Nishimune, Y., Okahashi, N., Kitagawa, Y., Watanabe R., Mochizuki, R., Moriishi, K., Matsuura, Y. 2003 *In Vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. *Journal of Virology* 77: 9799–9808.
- Theilmann, D. A., Blissard, G. W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D. R., Rohrmann, G. F., Thiem, S., Vlak, J. M. 2005. Family Baculoviridae. *In: Virus taxonomy: Eight report of international committee on taxonomy of viruses*. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L. A. (Ed.) 177-185.
- Van Lier, F. L., Van Duijnhoven, G. C., de Vaan, M. M., Vlak, J. M., Tramper, J. 1994. Continuous beta-galactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in a two-stage bioreactor system. *Biotechnology Progress* 10:60–64.
- Van Oers, M. M. 2006. Baculovirus applications for vaccine development. *Advances in Virus Research* 68:193-253.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., McCawley, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *In Vitro*, 13: 213-217
- Vialard, J. E., Arif, B. M., Richardson, C. D. 1995. Introduction to the molecular biology of baculoviruses. *Methods in Molecular. Biology* 39: 1-24.
- Volkman, L. E. 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Advances in Virus Research* 48:313-348.
- Volkman, L. E., Summers, M. D. 1977. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30:102-103.

- Volkman, L.E., Keddie, B.A. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology*, 1:249-256, *Journal of General Virology* 76:1451-145.
- Volkman, L. E., Knudson, D. L. 1986. *In vitro* replication of baculoviruses. In: Granados, R. R. e Frederici, B. A. The Biology of baculoviruses, vol. 1, Biological Properties and Molecular Biology, Boca Raton: CRC, 110-127.
- Volkman, L. E., Goldsmith, P. A. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, 143:185-195.
- Washburn, J. O., Trudeau, D., Wong, J. F., Volkman, L. E. 2003. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *Journal of General Virology* 84: 343–351.
- Weiss, S. A., Thomas, D. W., Dunlop, B. F., Georgis, R., Vail, P., Hoffman, D. 1994. *In vitro* production of viral pesticides: Key elements. In: *Biopesticides: Opportunities for Australian Industry*. Monsour, C. J., Reid, S., Teackle, R. E. (Ed) Austrália, 137.
- Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Hammer, D. A., Shuler, M. L., Wood, H. A. 1991. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters* 13:483-488.
- Williams, G.V., Faulkner, P. 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: *The Baculoviruses*. Miller, L.K. (Ed.), New York, 61–107.
- Wood, H. A. 1980. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induced proteins in tissue culture. *Virology* 102: 21-27.
- Wood, H. A., Granados, R. R. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annual Review of Microbiology* 45:69–87.
- Wu, D., Deng, F., Sun, X., Wang, H., Yuan, L., Vlak, J. M., Hu, Z. 2005. Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 86: 2439–2444.
- Yanase, T., Hashimoto, Y., Matsumoto, T. 1998. Analysis of defective genomes of bombyx mori nucleopolyhedrovirus generated by serial undiluted passage in cell culture *Acta Virologica* 42:65-70.
- Zanotto, P. M. A., Kessing, B. D., Maruniak, J. E. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* 62:147-1643.
- Zhou, J., Blissard, G. W. 2008. Identification of a GP64 subdomain involved in receptor binding by budded virions of the baculovirus *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus *Journal of Virology* 82: 4449-4460.