



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**A AÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS SUPRESSORAS DE
SILENCIAMENTO GÊNICO NA PATOGENICIDADE
DE UM BACULOVÍRUS**

VIRGÍNIA CARLA DE OLIVEIRA

Orientador: Renato de Oliveira Resende, Ph.D
Co-Orientador: Bergmann Morais Ribeiro, Ph.D

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Biologia Molecular.**

BRASÍLIA
2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**A AÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS SUPRESSORAS DE
SILENCIAMENTO GÊNICO NA PATOGENICIDADE
DE UM BACULOVÍRUS**

VIRGÍNIA CARLA DE OLIVEIRA

Orientador: Renato de Oliveira Resende, Ph.D

Co-Orientador: Bergmann Morais Ribeiro, Ph.D

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília
2010

“Na idade média, as pessoas acreditavam que a terra era plana, porque elas tinham ao menos a evidência de seus sentidos; nós acreditamos que ela é redonda não porque um por cento de nós pudesse dar as razões científicas para uma crença tão fantástica, mas porque a ciência moderna nos convenceu de que nada que é óbvio é verdadeiro, e que tudo que é mágico, improvável, extraordinário, gigantesco, microscópico, cruel ou excessivo é científico”.

(George Bernard Shaw, 1856-1950, dramaturgo e crítico irlandês)

Aos meu pais, Valter e Valdivina.

Aos meus irmãos, Vanessa e Vinícius.

Ao meu esposo Claudiney.

Às minhas avós, Eroltildes e Nadir.

Aos meus avôs (*in memoriam*), Joaquim e
Sebastião.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof Dr Renato de Oliveira Resende**, por ter me recebido em seu laboratório e nunca ter medido esforços para tornar possível a realização desta tese. Agradeço o entusiasmo, a alegria, o ombro amigo, a sapiência passada não apenas para o crescimento na vida científica, mas, sobretudo, para a vida pessoal. MUITÍSSIMO obrigada por todo o apoio!

Ao meu co-orientador **Prof Dr Bergmann Morais Ribeiro**, por toda atenção, paciência e dedicação em me ensinar tudo do pouco que sei a respeito de baculovírus. Meu muito obrigada pela preciosa colaboração não só na realização deste projeto, mas na minha formação profissional!

À amiga **Lorrainy**, bolsista do PIBIC, que participou ativamente da realização dessa pesquisa e por muito tempo foi uma amiga inseparável.

À **Profª Drª Sônia Nair Bão**, pelos conhecimentos de microscopia eletrônica, pela receptividade em seu laboratório, pela amizade e pelo incentivo.

Ao **Prof Dr José Raimundo Corrêa**, pelo auxílio na metodologia de microscopia confocal e na visualização dos espécimes. Agradeço, também, o apoio, o incentivo na carreira científica.

Ao **Prof Dr Tatsuya Nagata**, pelo apoio e pelas sugestões que muito colaboraram na elaboração desta tese.

À amiga **Érica**, que, por fazer seu trabalho de doutorado no Prédio de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, contribuiu com a cessão de larvas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* utilizadas nos bioensaios e nas análises estatísticas no programa PC Polo.

Ao **Prof Dr Enrique** do laboratório de virologia molecular, aos colegas **Brúmmel** e **Marcos Vinícius**, pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo realizadas no equipamento FACSCalibur.

À **Profª Drª Maria Elita**, por ter cedido, sempre que precisei, culturas da linhagem celular BM-5 e o vírus BmNPV e pela troca de informações sobre algumas metodologias.

Ao **Thiago**, doutorando do laboratório de biologia molecular, pelo auxílio no equipamento Typhoon para a captação da imagem de quimioluminescência. Desse mesmo

laboratório, agradeço também à amiga **Lorena**, pelo convívio em algumas disciplinas da pós-graduação e pelas discussões em torno de algumas metodologias do meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora, **Prof^a Dr^a Anamélia L. Bocca, Prof Dr Carlos André Ricart, Dr Francisco José Lima Aragão, Prof Dr José Luiz Caldas Wolff e Dr^a Marília Santos Silva**, por se disponibilizarem a analisar esse trabalho acadêmico e pelas valiosas e oportunas observações.

À minha primeira colega de bancada, que se tornou uma grande amiga de vida, **Claudinha**. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, em especial os de descontração.

Ao **Fabricio**, meu amigo “bioinformata” do laboratório de baculovírus, o meu muito obrigada por resolver os mais diversos problemas que surgiram ao longo da realização deste projeto, desde instalação de softwares no computador a auxílio na tradução dos dados experimentais para a linguagem estatística.

Aos amigos **Athos, Michelle, André, Rayane, Raíssa, Franciele e Kelly**, do grupo de pesquisa em virologia vegetal, pela amizade e pelo convívio.

Aos amigos **Raimundo, Gláucia, Susane, Bruno, Victor, Tiago, Marcelo, Anabele, Aline, Maria, Greice, Carol, Clara, Daniel, Mariana, Rafael e Raul**, do grupo de pesquisa em Baculovírus, que em alguns momentos me socorreram durante os experimentos. Obrigada por todos os *happy hours* que aliviaram a tensão nestes quatro anos de pesquisa.

À **Ana**, Secretária do Departamento de Biologia Celular, por estar sempre disposta a ajudar. À **Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília**, pela oportunidade. Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelas quatro modalidades de bolsas que me foram concedidas desde a minha iniciação científica.

À **Embrapa Arroz e Feijão e a todos os profissionais** que lá me orientaram, por iniciarem-me no campo da pesquisa e por terem me levado a acreditar que vale a pena dedicar a vida à ciência.

A todos os **familiares** que me apoiaram e fizeram com que esse sonho fosse realizado. Em especial, a um grande amigo que conheci durante o segundo ano de doutorado e é hoje meu digníssimo esposo, **Claudiney**, pelo apoio e pela esperança de dias melhores.

A **todos aqueles** que acreditaram no meu trabalho e estiveram do meu lado.

A **Deus**, por me dar forças para vencer obstáculos que pareciam ser intransponíveis.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de siglas, abreviaturas, nomes científicos e populares.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
Introdução.....	xx
Capítulo I - Revisão bibliográfica.....	22
1. Baculovírus.....	22
1.1. Família <i>Baculoviridae</i>	22
1.2. Fenótipos dos baculovírus.....	24
1.3. Infecção <i>in vivo</i> por baculovírus.....	26
1.4. Infecção <i>in vitro</i> por baculovírus.....	29
1.5. Expressão gênica.....	30
1.6. Fatores que influenciam no espectro de hospedeiros do baculovírus.....	33
1.7. O baculovírus como uma ferramenta biotecnológica.....	35
1.8. O baculovírus como uma alternativa viável ao controle químico de insetos-praga.....	37
2. <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV).....	39
3. O Silenciamento gênico.....	42
3.1. Histórico.....	42
3.2. Bases moleculares do silenciamento gênico.....	45
3.3. Etapas do silenciamento de RNA.....	45
3.3.1. Dicer.....	46
3.3.2. RISC.....	46
3.4. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa da célula contra vírus.....	50
3.4.1. Supressores virais do silenciamento gênico.....	52
Hipótese científica.....	56
Objetivos.....	57
Objetivo geral.....	57
Objetivos específicos.....	57
Capítulo II - Construção de baculovírus recombinantes contendo genes supressores do silenciamento gênico.....	58
1. Introdução.....	59
2. Materiais e Métodos.....	61
2.1. Prospecção dos genes <i>AC2</i> , <i>NS1</i> e <i>NSs</i> e desenho dos oligonucleotídeos.....	61

2.2. Amplificação e clonagem dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> nos vetores de clonagem e transferência.....	62
2.3. Obtenção dos vírus recombinantes.....	63
2.4. Linhagem celular e propagação dos vírus recombinantes.....	64
2.5. Insetos.....	64
2.6. Infecção viral e efeito citopático.....	64
2.7. Bioensaios preliminares – injeção intrahemocélica.....	65
3. Resultados.....	66
3.1. Amplificação e clonagem dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> nos vetores de clonagem e transferência	66
3.2. Obtenção dos baculovírus recombinantes.....	69
3.3. Infecção viral e efeito citopático.....	72
3.4. Bioensaios preliminares.....	74
4. Discussão.....	75
 CAPÍTULO III - A proteína supressora de silenciamento gênico de um tospovírus aumenta a replicação do baculovírus em linhagens celulares de inseto permissivas e semipermissivas.....	
1. Introdução.....	78
2. Materiais e Métodos.....	79
2.1. Células e vírus.....	79
2.2. Insetos.....	81
2.3. Construção do baculovírus recombinante vAcNSs.....	81
2.4. Análise de Western-blot	81
2.5. Titulação de BVs (<i>budded virus</i>).....	82
2.6. Efeito da proteína NSs na produção de corpos de oclusão poliédricos (PIB) dos baculovírus tipos selvagem.....	82
2.7. Imunofluorescência e análise de microscopia confocal.....	83
2.8. Expressão de EGFP em células de inseto infectadas por baculovírus.....	84
2.9. Ensaio de detecção de RNAi.....	85
3. Resultados.....	86
3.1. Replicação do baculovírus recombinante vAcNSs em diferentes linhagens de célula de inseto.....	86
3.2. Produção de PIBs de baculovírus do tipo selvagem em células permissiva, semipermissiva e não-permissiva.....	91
3.3. Localização da proteína NSs em células de inseto infectadas por baculovírus.....	93
3.4. Expressão de EGFP em células de inseto infectadas por baculovírus.....	95
3.5. Detecção de RNAs de interferência (siRNAs) em células de inseto infectadas por baculovírus.....	96
4. Discussão.....	98

Capítulo IV – A proteína NSs do TSWV aumenta a eficiência da ação bioinseticida do baculovírus AcMNPV em larvas permissivas de <i>S. frugiperda</i> e semimpermissivas de <i>A. gemmatalis</i>	108
1. Introdução	110
2. Materiais e Métodos	111
2.1. Células e vírus.....	111
2.2. Insetos.....	112
2.3. Bioensaios – Injeções.....	112
3. Resultados	113
4. Discussão	116
Conclusões e perspectivas	119
Referências Bibliográficas	121
Sobre a autora	145
Apêndice	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Árvore filogenética baseada no alinhamento de 29 genes comuns, identificados nos 29 genomas de baculovírus já sequenciados.....	24
Figura 1.2: Morfologia dos fenótipos dos baculovírus.....	26
Figura 1.3: Diagrama esquemático do ciclo bifásico da replicação de AcMNPV.....	28
Figura 1.4: Fases de replicação do baculovírus AcMNPV.....	32
Figura 1.5: Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hubner).....	38
Figura 1.6: Representação da estrutura da partícula de um tospovírus.....	41
Figura 1.7: Sintomas do <i>Tomato spotted wilt virus</i> no tomateiro.....	41
Figura 1.8: Modelo de mecanismo geral para via de silenciamento por RNA.....	49
Figura 1.9: Esquema que mostra uma das principais funções do RNAi: inibir infecções virais pela produção de RNAs de interferência (siRNAs).....	51
Figura 1.10: Esquema que mostra a ação da proteína NSs de TSWV no mecanismo de silenciamento de RNA.....	55
Figura 2.1: Produtos da amplificação dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2.1), analisados pela eletroforese em gel de agarose.....	66
Figura 2.2: Confirmação da clonagem dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> no vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	67
Figura. 2.3: Confirmação da clonagem dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> no vetor de transferência pFastBac TM 1.....	68
Figura 2.4: Confirmação dos bacmídeos recombinantes BacAc2, BacNS1 e BacNSs por PCR e à direita, representação esquemática do fragmento amplificado no genoma do bacmídeo, feita pelo programa Vector NTI (Invitrogen).....	70
Figura 2.5: Confirmação da presença dos genes <i>AC2</i> , <i>NSI</i> e <i>NSs</i> no genoma dos baculovírus recombinantes.....	71
Figura 2.6: Esquema mostrando o locus da poliedrina (<i>polh</i>) dos baculovírus selvagem e recombinantes.....	72
Figura 2.7: Análise microscópica do efeito citopático dos baculovírus recombinantes vAcAC2 (B), vAcNS1 (C) e vAcNSs (D) 48 h p.i.....	73

Figura 2.8: Efeito do baculovírus vAcNSs no aumento da produção de poliedros (PIBs) do baculovírus selvagem AcMNPV na célula BTI-Tn-5B-1-4.....	74
Figura 3.1: Esquema mostrando o locus da poliedrina (<i>polh</i>) dos diferentes baculovírus usados neste estudo.	80
Figura 3.2: Análise da expressão da proteína NSs em diferentes células de inseto infectadas com o baculovírus vAcNSs.	88
Figura 3.3: Análise da presença de BVs no sobrenadante de diferentes células de inseto infectadas por diferentes baculovírus.....	89
Figura 3.4: Análise morfológica de células BM-5 infectadas com diferentes baculovírus.....	91
Figura 3.5: Produção de PIB em três linhagens celulares de inseto infectadas com diferentes baculovírus.....	92
Figura 3.6: Localização da proteína recombinante NSs de TSWV, por imunofluorescência, no citoplasma e no núcleo de três linhagens celulares de inseto, detectada usando anticorpo policlonal anti-NSs conjugado com Alexa 594, 48 h p.i.....	94
Figura 3.7. Efeito da proteína NSs de TSWV em diferentes células de inseto e em hemócitos, na infecção por um vírus que contém EGFP.....	98
Figura 3.8. Modelo proposto por Takeda <i>et al.</i> (2002) para a supressão, mediada por NSs, de PTGS induzido por um transgene, em plantas (adaptado).....	105
Figura 4.1: Esquema mostrando o locus da poliedrina (<i>polh</i>) dos baculovírus recombinante e tipo selvagem usados neste estudo.	112
Figura 4.2: Ilustração do bioensaio com larvas de <i>S. frugiperda</i>	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Seqüência dos oligonucleotídeos desenhados, a partir de acessos depositados no NCBI, utilizados para amplificação dos genes <i>AC2</i> do begomovírus ToSRV, <i>NS1</i> do vírus Influenza A e <i>NSs</i> do tospovírus TSWV.....	61
Tabela 3.1: Título viral (p.f.u.ml ⁻¹) após a infecção de vAcNSs, AcMNPV e AgMNPV com m.o.i. de 10 para cada vírus, a 48 h p.i., em linhagens celulares de inseto.....	90
Tabela 4.1: Dose letal média (DL ₅₀) do vírus vAcNSs em larvas de <i>S. frugiperda</i> por injeção intrahemocélica de BVs.....	114
Tabela 4.2: Tempo letal médio (TL ₅₀) do vírus vAcNSs em larvas de <i>S. frugiperda</i> por injeção intrahemocélica de BVs.....	114
Tabela 4.3: Dose letal média (DL ₅₀) do vírus vAcNSs em larvas de <i>A. gemmatalis</i> por injeção intrahemocélica de BVs.....	115
Tabela 4.4: Tempo letal médio (TL ₅₀) do vírus vAcNSs em larvas de <i>A. gemmatalis</i> por injeção intrahemocélica de BVs.	115

Lista de siglas, abreviaturas, nomes científicos e populares

AcMNPV: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

Acwt: *Autographa californica wild type* – tipo selvagem

AgMNPV: *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*

Agwt: *Anticarsia gemmatalis wild type* – tipo selvagem

Bacmídeo: genoma do AcMNPV na forma de um plasmídeo, isolado de *Escherichia coli*, cepa DH10Bac

BM-5: linhagem celular de inseto derivada de *Bombyx mori* (Lepidoptera: *Bombycidae*), o “bicho-da-seda”

BmNPV: *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*

BSA: albumina sérica bovina

BTI-Tn-5B1-4: linhagem celular de inseto derivada de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: *Noctuidae*), a “lagarta-mede-palmo”

BV: *Budded virus* – vírus brotado

Da: Daltons

DL₅₀: dose letal (microorganismo ou substância tóxica) necessária para provocar a morte de 50% de uma determinada população de um organismo qualquer, em um bioensaio.

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeos

dsRNA: *double strand RNA* – RNA de fita dupla

ECV: *extracellular virus* – vírus extracelulares

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

g: grama

Gp64: proteína do capídeo viral, de 64 Kda

GV: *granulosis virus* – vírus da granulose

h p.i.: horas pós-infecção

h: hora

Helicoverpa zea: a “broca-grande-do-fruto” (Lepidoptera: *Noctuidae*)

Heliothis virescens: a “lagarta-das-maçãs” (Lepidoptera: *Noctuidae*)

ie-1: *immediate early 1 gene* (gene precoce imediato 1)

IgG: imunoglobulina G

IP TG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

KDa: quilodalton - 1000 Da

Kpb: 1000 pb

LdMNPV: *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus*

m.o.i.: *multiplicity of infection* - número de partículas virais por célula

mg: miligrama

μ g: micrograma - 10^{-6} grama

mL: mililitro

μ m: micrômetros

MNPV: *multiple nuclear polyhedrosis virus* – vírus da poliedrose nuclear do tipo múltiplo

mock: célula não-infectada

ng: nanograma - 10^{-9} grama

nm: nanômetros

ODV: *occluded derived virus* – vírus derivado de oclusão

ORF: *open reading frame* - fase de leitura aberta

p.f.u.: *plaque-forming unit* – unidade formadora de placa

pb: pares de base

PBS: *salino phosphate-buffered* - tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PFA: tampão paraformaldeído

pFastBac: plasmídeo de transferência doador utilizado na construção de baculovírus recombinantes pelo sistema de expressão Bac-to-Bac da empresa Invitrogen

pH: potencial de hidrogênio

PIBs: *polyhedral inclusion bodies* – corpos de oclusão poliédricos

polh: gene da poliedrina

ppolh: promotor da poliedrina

PTGS: *pos-transcriptional gene silencing* – silenciamento gênico pós-transcricional

RISC: Complexo de RNA indutor de silenciamento

RNA: ácido ribonucléico

RNAi: *RNA interference* – RNA interferente

RNAm: RNA mensageiro

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado por SDS (dodecilsulfato de sódio)

SF-21: linhagem celular de inseto derivada de *Spodoptera frugiperda*, a “lagarta-do-cartucho” (Lepidoptera: *Noctuidae*)

siRNA: *small interference RNA* – RNA curto de interferência

TBE: Tris-borato-EDTA

TCID₅₀: Tissue Culture Infectious Dose 50 – Dose viral capaz de infectar 50% de uma cultura celular

TL₅₀: tempo necessário (por um microorganismo ou substância tóxica) para causar a morte em 50% de uma determinada população de um organismo qualquer, em um bioensaio

TSWV: *Tomato spotted wilt virus*

UFL-AG-286: linhagem celular de inseto derivada de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: *Noctuidae*), a “lagarta-da-soja”

v: volt

vAcAC2: vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene *AC2* de um begomovírus

vAcNS1: vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene *NS1* do vírus *Influenza*

vAcNS1: vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene *NSs* do vírus TSWV

vHSGFP: vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene *egfp* sob o controle do promotor *heat shock hsp70* de *Drosophila*

vSynNSm: vírus recombinante derivado de vSyn que contém o gene *NSm* de TSWV

vAcCry4Aa: vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene *Cry4Aa* de *Bacillus*

x g: velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

μL: microlitro - 10⁻⁶ litro

RESUMO

O silenciamento gênico, ou RNA de interferência (RNAi), atua como um mecanismo de defesa contra infecções virais em organismos eucarióticos. Ao longo da evolução, os vírus adquiriram proteínas específicas com a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes pontos do processo. Como por exemplo, as proteínas AC2 de begomovírus, NS1 do vírus da gripe (*Influenza A*) e NSs de um tospovírus (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV). Neste estudo, pretendeu-se induzir mecanismos de supressão de silenciamento gênico através da expressão heteróloga de AC2, NS1 e NSs por baculovírus AcMNPV – *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, a fim de analisar o efeito na replicação viral em diferentes células de inseto. Assim, no primeiro capítulo, foi feita uma revisão sobre o silenciamento gênico, a ação de proteínas virais supressoras de RNAi e o uso potencial de baculovírus recombinantes como agentes bioinseticidas melhorados. O segundo capítulo descreve a clonagem dos genes *AC2*, *NS1* e *NSs*, a construção dos baculovírus recombinantes (vAcAC2, vAcNS1 e vAcNSs) e os ensaios preliminares de infecção em célula e em larvas de inseto. Nesses ensaios, o vAcNSs (contendo o gene *NSs*) foi o recombinante com maior influência na replicação do baculovírus selvagem AcMNPV. Por sua vez, o terceiro capítulo relata a ação da proteína supressora de silenciamento *NSs* de TSWV, expressa pelo baculovírus vAcNSs, em três linhagens hospedeiras: uma permissiva, derivada de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4); outra semipermissiva, derivada de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286); e, uma linhagem não-permissiva, derivada de *Bombyx mori* (BM-5). Os resultados mostraram que vAcNSs, em células semipermissivas, obteve maior eficiência na replicação quando comparado ao selvagem, pois produziu mais vírus extracelulares; em uma linhagem celular não-permissiva, causou efeito citopático, enquanto a infecção com o tipo selvagem AcMNPV não provocou nenhuma alteração morfológica; aumentou a produção de poliedros do baculovírus tipo selvagem em todas as linhagens de células testadas; aumentou fortemente a expressão da proteína fluorescente verde (EGFP) nas células semipermissivas e em hemócitos de *A. gemmatalis* quando co-infectado com um AcMNPV recombinante contendo o gene *egfp*. A análise de microscopia confocal revelou que a *NSs* acumulou em abundância no citoplasma de células permissivas e semipermissivas. Em contraste, a *NSs* foi detectada no núcleo da célula não-permissiva. A ausência de moléculas curtas de RNA (siRNA) de transcritos de *egfp* em linhagens semipermissivas e permissivas indica atividade de supressão do

silenciamento gênico. Por outro lado, vAcNSs não suprimiu o RNAi na linhagem celular não-permissiva. Por fim, o quarto capítulo investiga a ação bioinseticida do baculovírus vAcNSs em larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* - um hospedeiro permissivo e outro semi-permissivo, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a DL₅₀ do vAcNSs para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, quando comparada à DL₅₀ observada para o tipo selvagem AcMNPV. Entretanto, o TL₅₀ foi significativamente diferente, com valores menores para vAcNSs em *S. frugiperda* [5,62 dias com 1 p.f.u. e 4,82 dias com 10⁵ p.f.u.] e em *A. gemmatalis* [7,46 dias com 1 p.f.u. e 3,2 dias com 10⁵ p.f.u.] quando em comparação com o TL₅₀ do AcMNPV em *S. frugiperda* [8,5 dias com 1 p.f.u. e 7,52 dias com 10⁵ p.f.u.] e em *A. gemmatalis* [20,11 dias com 1 p.f.u. e 7,34 dias com 10⁵ p.f.u.]. Estes resultados corroboram os dados observados *in vitro*, indicando que a proteína NSs de TSWV aumenta a replicação do baculovírus e pode contribuir para gerar bioinseticidas mais eficientes.

ABSTRACT

Gene silencing, or RNA interference (RNAi), works as a eukaryotic defense mechanism against viral infections. During evolutionary time viruses acquired specific proteins, which are able to halt the silencing process in different steps of its biochemical pathway e.g. the AC2 protein from *Begomovirus*, the NS1 protein from influenza (*Influenza A*) and the NSs protein from *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). In this study we sought generation and evaluation of the gene-silencing suppression effect of three different genes, AC2 from begomovirus, NS1 from *Influenza A* and NSs from TSWV, via heterologous expression by recombinant *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV, genus *Alphabaculovirus*, family *Baculoviridae*) in different insect cell lines. In the first chapter, a review concerning gene silencing, suppression of gene silencing by viral proteins and the potential use of recombinant baculovirus as bio-insecticidal agents suitable for biological control is presented. The second chapter describes the cloning strategies designed for the construction of recombinant baculoviruses carrying the AC2, NS1 and NSs genes (vAcAC2, vAcNS1 and vAcNSs, respectively) as well as the results of preliminary insect cell infection assays. In these preliminary assays, vAcNSs had more influence on wild type AcMNPV replication than vAcAC2 and vAcNS1. The third chapter shows the effect of the protein NSs from TSWV on virus replication in different host insect cell lines: one permissive, *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4); other semi-permissive, *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286); and a non-permissive cell line, *Bombyx mori* (BM-5). Results showed that infection of the semi-permissive cell line by vAcNSs was more efficient than infection by wild type AcMNPV, since production of budded virus was higher. In the non-permissive cell line, vAcNSs was able to produce cytopathic effects whereas no morphological alteration was found when wild type AcMNPV was inoculated. When vAcNSs and wild type AcMNPV were co-inoculated, production of polyhedra was enhanced despite the insect cell line used. Co-infection of vAcNSs and a recombinant AcMNPV carrying the *egfp* gene was also evaluated. In the semi-permissive cell line and in *A. gemmatalis* hemocytes (permissive cell line) co-infection greatly increased enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression. Northern blotting assays showed absence of small interfering RNA (siRNA) molecules associated to *egfp* transcripts in the permissive and semi-permissive cell lines, which indicates suppression

of gene silencing activity by the NSs protein. On the other hand, vAcNSs was not able to suppress the siRNA production in the non-permissive cell line. Confocal microscopy analysis showed that the NSs protein accumulated abundantly in the cytoplasm of permissive and semi-permissive infected cells. In contrast, high amounts of NSs were detected in the nuclei of non-permissive cells. Finally, chapter four presents the study of the bio-insecticidal activity of vAcNSs on *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis* larvae, a permissive and semi-permissive host, respectively. The vAcNSs LD₅₀ for *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* was not statistically different from wild-type AcMNPV. However, the LT₅₀ values were significantly smaller for vAcNSs in *S. frugiperda* [5.62 days with 1 p.f.u. and 4.82 days with 10⁵ p.f.u.] and *A. gemmatalis* [7.46 days with 1 p.f.u. and 3.20 days with 10⁵ p.f.u.) when compared to the LT₅₀ for AcMNPV in *S. frugiperda* [8.5 days with 1 p.f.u. and 7.52 days with 10⁵ p.f.u.] and *A. gemmatalis* [20.11 days with 1 p.f.u. and 7.34 days with 10⁵ p.f.u.]. These *in vivo* results are in accordance with the data observed *in vitro* indicating that the protein NSs from TSWV could efficiently improve baculovirus replication and be used to generate more effective bio-insecticides.

INTRODUÇÃO

A história da descoberta dos baculovírus está relacionada com o desenvolvimento da indústria têxtil, que ocorreu na China por volta de 6000 anos atrás (Steinhaus, 1975). A cultura de larvas do bicho-da-seda *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: *Bombycidae*), usadas na produção de fios do tecido, espalhou-se pela Ásia e chegou até a Europa. Com o advento da microscopia de luz, doenças inerentes à cultura do inseto foram descritas (Rohrmann, 2008). Um dos tipos de doença se caracterizava pela presença de corpos de oclusão com formas de poliedros nos insetos sintomáticos afetados. Em função da peculiaridade dessas estruturas, foi dado à doença o nome de poliedrose. A microscopia eletrônica, por volta de 1940, permitiu a distinção de dois tipos de poliedrose: a poliedrose nuclear (NPVs), na qual a presença desses poliedros foi detectada no núcleo, e a poliedrose citoplasmática (CPVs), com poliedros no citoplasma das células hospedeiras (Bergold, 1947; Xeros, 1952, citado por Rechcigl e Rechcigl, 1998).

Na década de 40, os baculovírus passaram a ser estudados como agentes de controle biológico (Balch, 1946; Steinhaus e Thompson, 1949, citados por Richards *et al.*, 1998). Trinta anos depois, foi registrado o primeiro inseticida viral com intuito comercial, o *Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus* – HzNPV, desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para o controle dos insetos *Heliothis virescens* – praga da cultura do tabaco –, *H. zea* – do milho – e *Heliothis armigera* – do algodão (Ignoffo, 1973, citado por Rechcigl e Rechcigl, 1998).

Desde os anos 80, o inseticida viral de maior sucesso é o baculovírus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus*, uma alternativa biológica ao controle químico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hubner), quando, só no Brasil, foi usado em mais de um milhão de hectares por ano (Moscardi, 1989). A potencialidade do uso dos baculovírus como biopesticida aumentou com a tecnologia do DNA recombinante, que passou a manipular o genoma viral, visando diminuir o tempo de mortalidade dos insetos-praga. Nessa mesma década, os baculovírus foram manipulados geneticamente para o desenvolvimento de vetores de expressão de proteínas heterólogas nas pesquisas médicas e biotecnológicas (Smith *et al.*, 1983; Jasny, 1988). Consequentemente, o estudo da biologia molecular desses vírus e de sua interação com o hospedeiro levou à produção de inúmeros baculovírus recombinantes em laboratórios de todo o mundo (Smith, *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984; Possee, 1986; O'Reilly *et al.*, 1991;

Hajós *et al.*, 1999; Kim, *et al.*, 2000; Pinedo *et al.*, 2003; Gramkow *et al.*, 2010). No entanto, estratégias visando aumentar a eficiência infectiva do vírus e as taxas de replicação viral nas células de insetos hospedeiros não estão disponíveis na literatura.

A replicação eficiente depende da capacidade do vírus de contornar ou bloquear vias de defesa do hospedeiro. Por outro lado, os organismos desenvolveram, evolutivamente, o mecanismo de silenciamento de RNA, que tem sido comprovado como sendo um dos principais sistemas de defesa celular do hospedeiro, via inibição da replicação viral (Al-Kaff *et al.*, 1998; Covey *et al.*, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Venter e Schneemann, 2008).

Em contrapartida, os vírus parecem ter desenvolvido mecanismos alternativos de contra-ataque, em resposta a esse sistema de defesa antiviral. Por exemplo, foram identificadas proteínas virais supressoras do silenciamento gênico celular (Carrington e Whitham, 1998; Li e Ding, 2001; Voinnet *et al.*, 1999). Algumas proteínas, como a B2 do *Flock House virus*, permitem a replicação viral em insetos, plantas (Selling *et al.*, 1990; Dasgupta *et al.*, 2001) e leveduras (Price *et al.*, 1996).

Baseando-se nesse paradigma universal de regulação gênica, este trabalho de tese propõe que o uso de proteínas supressoras de silenciamento gênico de vírus animais e vegetais distintos pode aumentar a replicação e a patogenicidade do baculovírus no inseto hospedeiro, podendo esta estratégia ser usada na obtenção de bioinseticidas mais eficientes.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - BACULOVÍRUS

1.1 A Família *Baculoviridae*

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. O termo baculovírus é oriundo do latim *baculum*, que significa bastão, em representação à forma do nucleocapsídeo viral. A *Baculoviridae* é constituída por vírus de DNA dupla-fita, de 80 a 180 kpb, que causam doenças letais nos artrópodes. Seu capsídeo varia entre 30 e 60 nm de diâmetro e de 250 a 300 nm de comprimento (Harrap, 1972; Jehle *et al.*, 2006). A maioria dos baculovírus tem como hospedeiros insetos da ordem Lepidóptera (Volkman *et al.*, 1995). Inclusive, já foram isolados mais de 500 baculovírus em espécies de lepidópteros (Vardar-Sukan e Sukan, 1992). No ambiente, são encontrados na superfície de plantas e no solo (Blissard e Rohrmann, 1990).

Enquanto a maioria dos vírus é estudada porque causam doenças nos seres humanos ou danificam sistemas de produção de alimento, o baculovírus é estudado por seu potencial de controlar pragas e por seu uso com vetores de expressão de proteínas heterólogas com capacidade de produzir grandes quantidades de proteínas de valor biotecnológico.

Essa família viral era anteriormente dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, também conhecidos como NPVs, e *Granulovirus*, conhecidos como GVs (Murphy *et al.*, 1995, citado por Castro *et al.*, 1999). A principal diferença entre os dois gêneros diz respeito ao modo como os nucleocapsídeos estão envelopados nos corpos de oclusão (os poliedros).

Os vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) possuem corpos de oclusão protéica (OB - *occlusion bodies* ou PIB – *polyhedra inclusion bodies*), também chamados de poliedros, que variam de 0,13 a 15 µm (Bilimoria, 1991) e contêm vários vírions. Sua principal proteína é denominada poliedrina - cerca de 95% do seu conteúdo protéico (Maruniak, 1986) -, com massa molecular em torno de 30.000 Daltons (Summers *et al.*, 1980). Os vírus desse gênero podem

conter apenas um nucleocapsídeo por vírion, *single nucleopolyhedrovirus* – SNPV, ou vários nucleocapsídeos por vírion, *multiple nucleopolyhedrovirus* – MNPV (Bilimoria, 1991).

Uma subdivisão que tem sido observada nos NPVs de lepidópteros resultou na separação desta linhagem em dois grupos: I e II (Zanotto *et al.*, 1993). Esses dois grupos diferem significativamente na presença ou ausência de um gene. O grupo I tem a GP64 como sua proteína de fusão na célula hospedeira; o grupo II, a proteína F (Pearson e Rohrmann, 2002). Aparentemente, outros 11 genes só podem ser encontrados no grupo I (Herniou *et al.*, 2001).

Por sua vez, o gênero *Granulovirus* é caracterizado pela forma ovicilíndrica do corpo de oclusão, denominado grânulo, com cerca de 0,3 x 0,5 µm (Crook, 1991); geralmente possui um vírion por grânulo e excepcionalmente dois ou três. A granulina é o principal componente protéico do grânulo.

Entretanto, estudos posteriores mostraram que a divisão dos baculovírus baseada na morfologia das partículas de oclusão não reflete a história evolutiva dos NPVs (Herniou *et al.*, 2003). Assim, recentemente, Jehle *et al.* (2006) propuseram uma nova classificação e nomenclatura para a família *Baculoviridae* baseadas na análise filogenética comparativa de 29 genomas de baculovírus. A família foi dividida em quatro gêneros de acordo com o hospedeiro (Fig. 1.1). Atualmente, no Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) estão descritos um número maior de espécies para dois gêneros comparada àquela classificação (Jehle *et al.*, 2006):

- a) *Alphabaculovirus*: compreendem os SNPVs e MNPVs de lepidópteros, sendo ao todo 25 espécies;
- b) *Betabaculovirus*: compreendem os GVs de lepidópteros, com 14 espécies;
- c) *Gammabaculovirus*: compreendem os SNPVs de himenópteros, com duas espécies;
- d) *Deltabaculovirus*: compreendem os NVPs de dípteros, com apenas uma espécie.

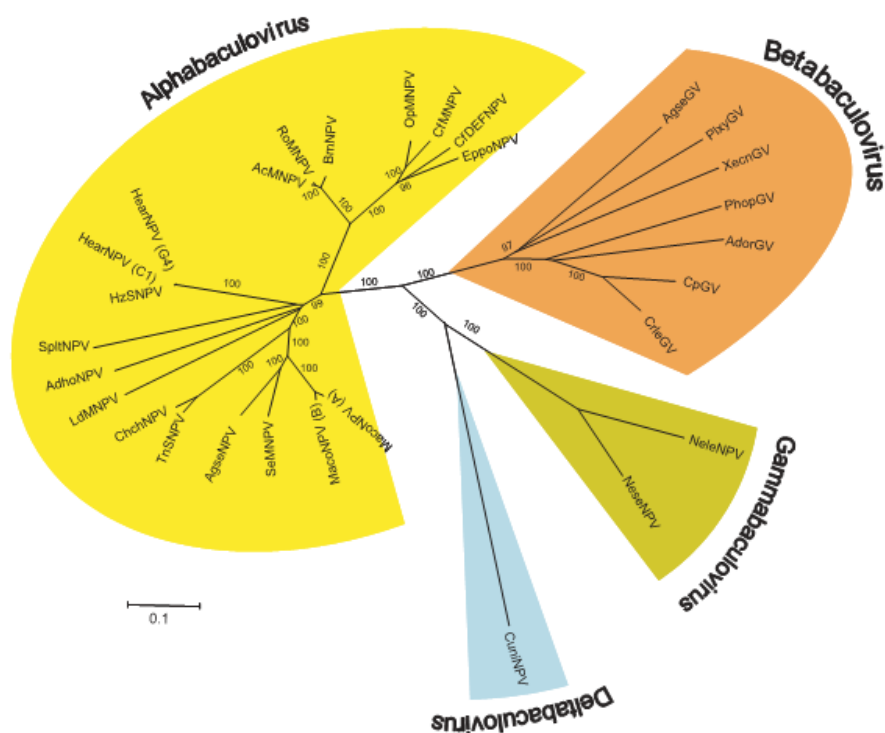


Figura 1.1: Árvore filogenética baseada no alinhamento de 29 genes comuns identificados nos 29 genomas de baculovírus já seqüenciados. Valores de *bootstrap* >95% são dados ao longo dos ramos. (Jehle, 2006, adaptado).

1.2 Fenótipos dos baculovírus

Durante o ciclo de infecção dos baculovírus, que é bifásico, os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas (Haines *et al.*, 2006) (Fig. 1.2):

a) *Budded virus* – BV ou vírus extracelulares - ECV ou vírus não-ocluídos: atuando na fase infectiva inicial, são responsáveis pela transmissão célula-a-célula (Rohrmann, 2008) do vírus que emerge da membrana citoplasmática para o meio extracelular (Fig. 1.2);

b) *Occluded derived virus* – ODV ou vírus ocluídos: atuam no final da infecção, sendo responsáveis pela transmissão do vírus de um inseto hospedeiro para outro. Esse fenótipo adquire uma membrana no núcleo da célula infectada, formando, para cada vírion, um nucleocapsídeo ou

mais. Posteriormente, os vírions são oclusos no OB – corpo de oclusão (Granados e Williams 1986) (Fig. 1.2).

A oclusão numa matriz protéica garante proteção às partículas infectivas na transmissão do vírus de inseto para inseto (Blissard e Rohrmann, 1990, citado por Castro *et al.*, 1999). Assim como os esporos de bactérias ou fungos, as oclusões virais permitem aos baculovírus resistirem a condições ambientais adversas fora do hospedeiro. Além de serem veículos de sobrevivência do vírus no meio exterior ao inseto e funcionarem como agente de dispersão entre insetos, os poliedros podem, ainda, proteger o vírus contra proteólise, durante os estágios finais de infecção (Hu *et al.*, 1999). O principal componente dos corpos de oclusão é a poliedrina, com cerca de 250 aminoácidos (30kDa). Pela análise da sequência de genes da poliedrina de diferentes baculovírus, tem sido possível estabelecer a filogenia molecular deste grupo (Zanotto *et al.*, 1993; Herniou *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006).

Embora sejam considerados genotipicamente idênticos, os fenótipos BV e ODV desempenham papéis distintos no ciclo infectivo viral. São características que os diferenciam: a morfologia, a composição protéica, a origem dos envelopes virais, o modo de penetração na célula hospedeira e a infectividade (Summers e Volkman, 1976; Volkman *et al.*, 1976; Volkman, 1983; Volkman e Goldsmith, 1984; Braunagel e Summers 1994).

Os *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus* e *Deltabaculovirus* produzem ambos os fenótipos virais, *Budded Virus* (BV) e *Occluded Derived Virus* (ODV). Já os *Gammabaculovirus* não possuem genes para formação da partícula BV.

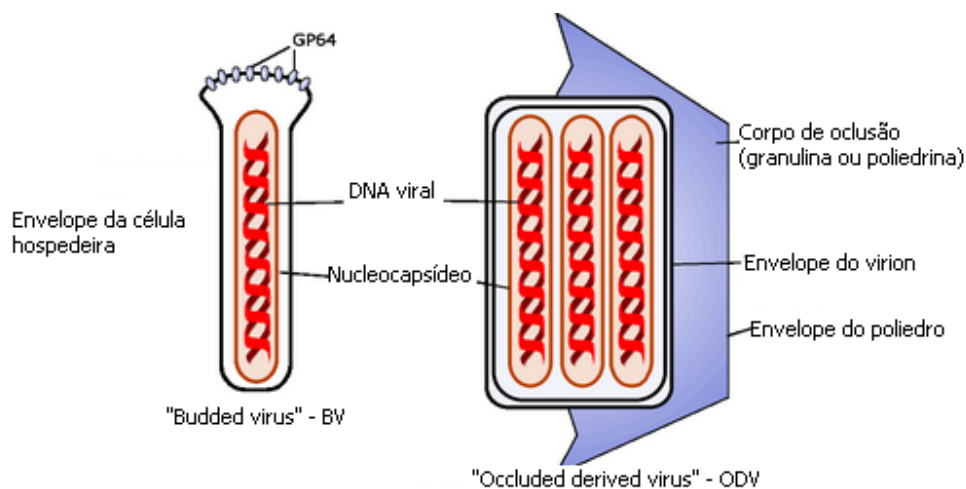


Figura 1.2: Morfologia dos fenótipos do baculovírus. O BV é encontrado no interior do inseto infectado e no sobrenadante de cultura de células de insetos infectadas. Essa forma contém um único nucleocapsídeo que, no momento em que emerge para fora da célula hospedeira, é envolto por um envelope obtido da membrana plasmática. Antes do brotamento do vírus, a membrana celular é modificada pela ligação com a proteína viral GP64. O ODV, envolto por um corpo proteináceo de oclusão, é a forma do vírus produzida nos estágios avançados da infecção. Permite que o vírus se propague horizontalmente, inseto-a-inseto, e que persista por longos períodos no ambiente (Kalmakoff e Ward, do sítio www.microbiologybytes.com/.../baculo/baculo.html - adaptado).

1.3 Infecção *in vivo* por baculovírus

O ciclo bifásico de replicação do baculovírus (Fig. 1.3) inicia-se com a ingestão, pelo inseto, de poliedros do vírus, presentes na superfície das folhas. Poliedros esses que haviam chegado às plantas, principalmente, por meio de chuvas e pelo movimento de artrópodes do solo para o vegetal. Após a ingestão, ao chegar ao intestino médio do inseto, onde encontra pH alcalino e diversas proteinases, a matriz da poliedrina viral é solubilizada, liberando os vírions ODVs – responsáveis pela infecção primária (Harrap e Longworth, 1974), no lúmen digestivo. As partículas infectivas penetram nas células epiteliais, via fusão de membrana, mediada por receptores específicos (Horton e Burand, 1993). Na sequência, os nucleocapsídeos são

transportados ao núcleo, onde são desnudados, liberando o DNA a uma hora pós-infecção (Knudson e Harrap, 1976; Wang e Kelly, 1985). A replicação do DNA viral e a montagem dos novos nucleocapsídeos ocorrem, em seguida, ao longo das primeiras 24 h após a infecção (Granados e Lawler, 1981).

Após a infecção primária pelos vírions, os BVs são produzidos, atravessam a membrana basal e chegam à hemolinfa. A partir daí, espalham-se por todo o inseto, causando uma infecção sistêmica secundária.

Alternativamente, os ODVs podem, em vez de terem seus nucleocapsídeos desnudados no núcleo das células epiteliais, atravessar diretamente para as células colunares e infectar as células da hemolinfa e/ou as células da traquéia (Engelhard *et al.*, 1994).

A larva hospedeira continua se alimentando durante um período de cinco a sete dias e, depois, para de se alimentar, tornando-se letárgica. Ocorre, então, melanização da cutícula, e a musculatura é desintegrada e liquefeita (O'Reilly *et al.* 1994). Conforme sugerem alguns estudos, a liquefação teria como causa a produção de quitinase e catepsina, ambas codificadas por genes virais (Ohkawa *et al.*, 1994; Slack *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997). A larva torna-se um saco cuticular de poliedros, que passam a representar cerca de 25% de seu peso seco. Posteriormente, a cutícula se rompe, liberando os poliedros no meio ambiente, onde podem ser novamente consumidos por outra larva, reiniciando-se o ciclo (O'Reilly *et al.* 1994).

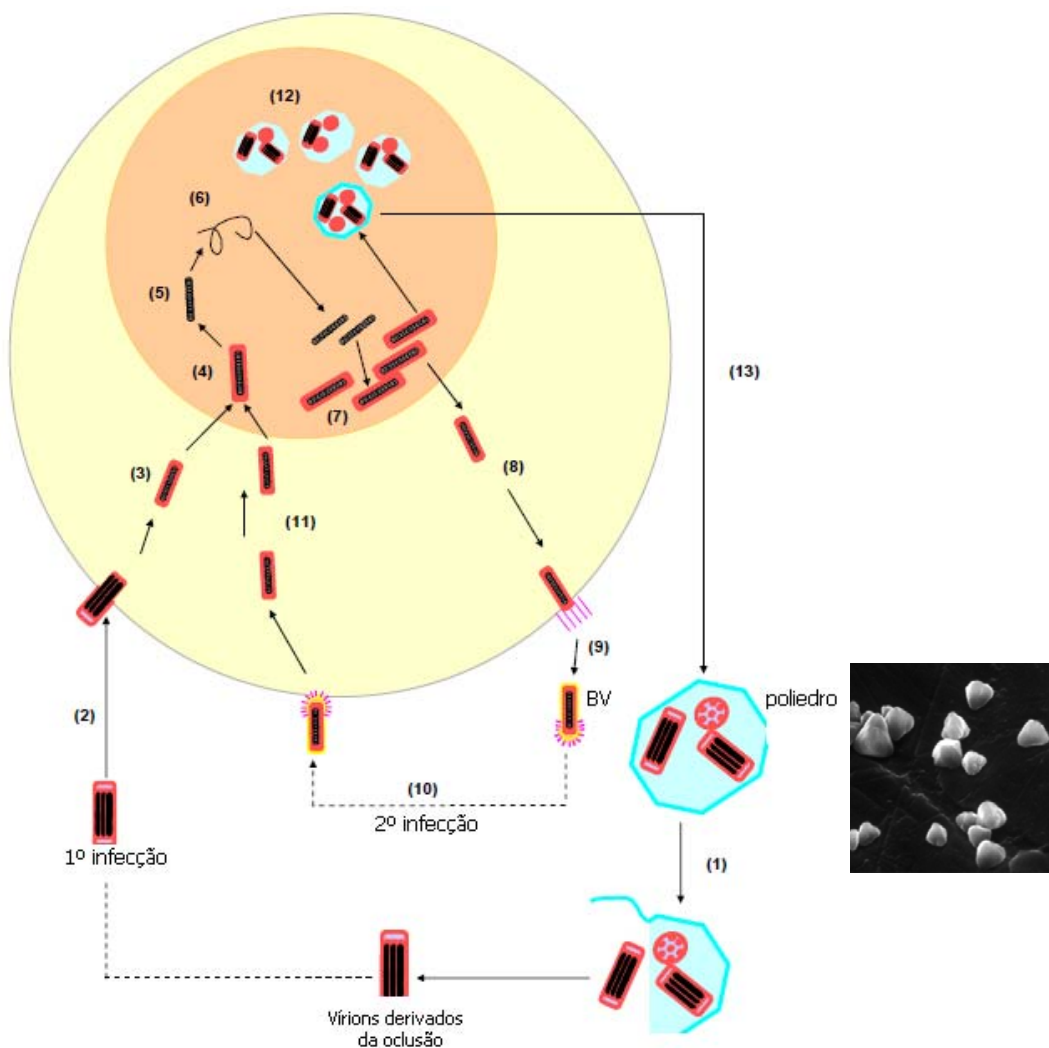


Figura 1.3: Diagrama esquemático do ciclo bifásico da replicação do AcMNPV. Os poliedros persistem no ambiente até serem ingeridos por uma larva hospedeira suscetível. O ambiente alcalino do intestino do inseto dissolve os poliedros (1) para liberar os vírions derivados da oclusão (ODV). ODVs se fundem com células epiteliais do intestino (2) e se incorporam à célula. Nucleocapsídeos (NCs) vão para o núcleo (3), provavelmente através do poro nuclear (4), onde o NC é decapsidado (5) e a transcrição viral se inicia (6). Há produção de novos NCs (7), que, logo depois, deixam o núcleo da célula hospedeira (8) e são transportados para a membrana plasmática. A partir daí, brotam da célula hospedeira, adquirem um envelope, derivado da membrana, formando o fenótipo BV - vírus extracelular (9). O BV ataca, então, outras células suscetíveis (10) e é decapsidado dentro do citoplasma. NCs vão para o núcleo (11), e após a tradução, há outra produção de NCs e BVs (4 - 10). Durante os estágios avançados da infecção, os NCs que permaneceram no núcleo são incluídos nos poliedros (13), finalmente liberados com a lise da célula (Haines et al., 05/05/2010, do sitio <http://www.oetltd.com/downloads/articles/bev-paper.pdf> - adaptado). No detalhe, uma micrografia eletrônica de varredura de corpos de oclusão do baculovírus (Hughes e Addison, 1970).

1.4 Infecção *in vitro* por baculovírus

A ligação na membrana celular e a entrada, por endocitose, da forma BV, infectiva para células em cultura (Fig. 1.2), ocorrem entre cinco a dez minutos (Wang e Kelly, 1985) depois da incubação da célula com o vírus. Em AcMNPV, a proteína GP64, presente no BV, promove a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma da célula hospedeira (Volkman *et al.*, 1995). Inicialmente, o sequenciamento do genoma de diversos membros da família *Baculoviridae*, incluindo os nucleopoliedrovírus (NPVs) e os granulovírus (GVs), indicava que não haveria um homólogo da GP64 nos genomas de *Lymantria dispar* MNPV – LdMNPV (Kuzio *et al.*, 1999), *Spodoptera exigua* – SeMNPV (Ijkel *et al.*, 1999) e *Xestia c-nigrum* GV – XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999). Entretanto, de acordo com outras análises, o genoma de LdMNPV possui uma ORF 130 (*ld130*), que também codifica uma proteína com propriedades de fusão do envelope, dependentente de baixo pH e associada com o fenótipo BV (Kuzio *et al.*, 1999). Homólogos de *ld130* estão presentes em diversos NPVs e GVs, sugerindo que a LD130 é, de fato, uma proteína primordial em alguns baculovírus (Pearson *et al.*, 2000). Recentemente, Yin *et al.* (2008) identificaram, no granulovírus *Agrotis segetum* GV, a proteína F como análoga funcional da GP64. Os vírus pertencentes a esse grupo (GV) não possuem o gene *gp64*, embora os NPVs do grupo II possuam o gene *F* no genoma.

Dentro de uma hora pós-infecção (h p.i.) ocorre a decapsidação do vírus (Wang e Kelly, 1985; Granados e Williams, 1986); imediatamente depois, no núcleo da célula, a transcrição do DNA viral inicia-se, podendo ser detectada a presença de RNAm viral a partir de 2,5 h após a infecção (Jiang *et al.*, 2006).

Durante as próximas seis horas – período que caracteriza a fase *early* ou inicial de infecção e precede a replicação do DNA viral –, os primeiros efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio eletrônico: alterações no arranjo do citoesqueleto e aumento (hipertrofia) do volume celular (Crisholm e Henner, 1988; O'Reilly *et al.*, 1992).

Entre 6 e 12 h p. i., uma estrutura elétron-densa (estroma virogênico), região de alta síntese de DNA, onde os nucleocapsídeos são produzidos, dispersa-se, no núcleo da célula (Granados e Lawler, 1981; Billimoria, 1991; Slack e Arif, 2007).

Em torno de 12 h p.i., os primeiros nucleocapsídeos formados começam a brotar da célula, sendo envelopados e tornando-se BV (Fraser, 1986; Blissard e Rohrmann, 1990).

Por volta de 16 h p.i., o estroma virogênico aparece mais amadurecido, com um aspecto mais condensado e subcompartimentalizado, produzindo grandes quantidades de nucleocapsídeos (Summers, 1971). Ao mesmo tempo, inicia-se a produção de poliedrina, que se acumula no núcleo para a montagem de OB, e da proteína P10, no citoplasma, organizada em estruturas fibrilares no núcleo e citoplasma (Van Der Wilk *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1989). A produção de BV é logarítmica, entre 12 e 20 h.p.i; depois decai e cessa (Volkman *et al.*, 1976).

Após a redução na produção de BVs, na fase *late* ou tardia (aproximadamente 24 h p.i), os nucleocapsídeos são transportados para locais de envelopamento intranuclear, próximos à membrana nuclear interna, denominada *ring zone* (Fig. 1.3), e incorporados à matriz de poliedrina, formando os OBs (Vaughn e Dogherty, 1985; Williams *et al.*, 1989). A presença de poliedros é, então, detectada no núcleo da célula infectada e, à medida em que a infecção progride, acumulam-se no núcleo, comprimindo o citoplasma.

A produção dos poliedros e da proteína P10 segue até o final da infecção e após 48 h, a proteína P10 interage com os microtúbulos da célula hospedeira, promovendo a lise celular (Van Oers *et al.*, 1994). O conteúdo celular é extravasado, juntamente com os poliedros, para o meio extracelular (Slack e Arif, 2007).

1.5 Expressão gênica

A replicação e a expressão gênica do baculovírus são reguladas temporalmente em nível transcricional, no qual os genes expressos em uma classe temporal regulam a expressão dos genes das fases seguintes (Blissard e Rohrmann, 1990; Bashyam *et al.*, 2000) (Fig. 1.4). A expressão temporal pode ser dividida em duas fases:

- a) 1ª – E (*early* ou precoce), que precede a replicação do DNA viral;
- b) 2ª – L (*late* ou tardia), que se inicia a partir da replicação do DNA viral e montagem da estrutura dos BVs.

Na fase *early*, os genes expressos independem da replicação do DNA viral (Kelly e Lescott, 1981). A expressão de muitos desses genes inicia-se imediatamente após a infecção celular, com alguns transcritos, por exemplo, dos genes anti-apoptótico *p35*, polimerase viral *DNA-pol* e *immediate-early ie-1*, que surgem dentro das primeiras duas horas (Friesen e Miller,

1987; Jiang *et al.*, 2006). Genes desta fase são transcritos pela RNA polymerase II do hospedeiro (Grula *et al.*, 1981).

A fase *late* é dependente da expressão dos genes da fase *early* e da replicação do DNA viral (Lu e Carstens, 1993). Ela é subdividida em *late* – que ocorre de 6 a 18 h p. i. – e *very late* (muito tardia) – 18 h p.i. (Blissard e Rohrmann, 1990). A distinção entre esses dois estágios se dá pela atividade apresentada em cada fase. Os mRNAs de genes *late* decaem em estágios avançados de infecção, enquanto os promotores *very late* são hiperexpressos a partir de 18 h p.i., com a expressão de dois produtos principais: a poliedrina e a P10 (Blissard e Rohrmann, 1990; O'Reilly *et al.*, 1992). Os genes do estágio tardio são relacionados à montagem e à oclusão das partículas virais (O'Reilly, *et al.*, 1992).

Jiang *et al.* (2006) analisaram a expressão gênica de AcMNPV ao longo da infecção, por microarranjo de DNA, em células permissivas de SF21 (*S. frugiperda*). O estudo revelou que, aproximadamente, 20% da transcrição no genoma viral ocorria entre 3 a 6 h p.i.; 50 a 60%, entre 6 a 9 h p.i.; e, o restante, 20 a 30%, de 12 a 15 h p.i.

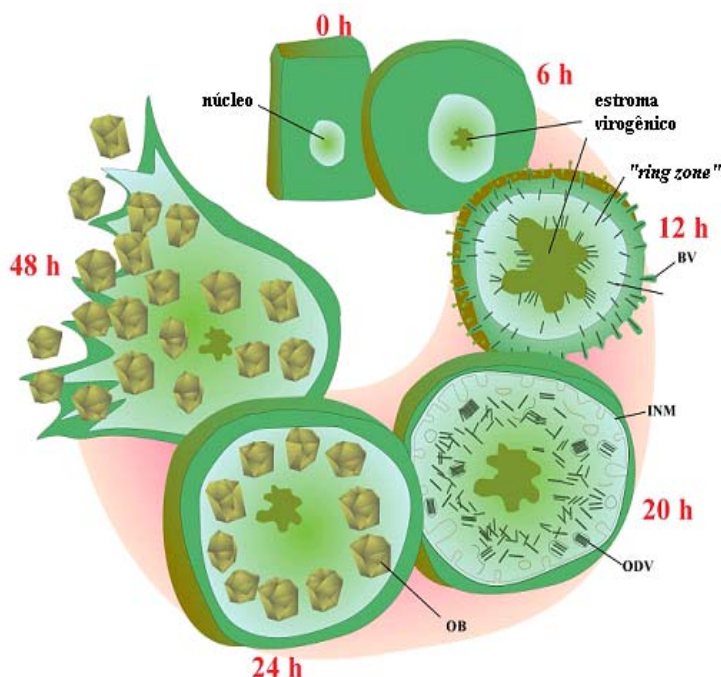


Figura 1.4: Fases de replicação do baculovírus AcMNPV. A fase *early* envolve a liberação do DNA viral do capsídeo e a expressão de genes virais requeridos para sua replicação e para a transcrição de genes *late* e *very late* (0 - 6 h p.i.). A fase *late* se inicia com a replicação do DNA viral (6 h p.i.) e é caracterizada também pela produção de BVs (12 - 18 h p.i.). Nesta fase, nucleocapsídeos são translocados à membrana celular, para promoverem, inicialmente, a liberação de BVs; logo depois, ficam retidos na região nuclear *ring zone*, para a produção de ODVs. INM é uma referência à membrana nuclear interna, que originará o envelope lipoprotéico do ODV. A fase *very late* se caracteriza pela oclusão do vírus (20 – 48 h p.i.). Os nucleocapsídeos se tornam envelopados em estruturas recém sintetizadas *like* membrana, em grupos de 1 a 9, no caso dos vírus MNPVs. O envelopamento é seguido pela incorporação dos nucleocapsídeos dentro de uma matriz protéica predominantemente constituída de poliedrina, formando o corpo de oclusão (Slack e Arif, 2007, modificado).

1.6 Fatores que influenciam no espectro de hospedeiros do baculovírus

Diversas linhagens celulares de insetos têm sido utilizadas para estudos de infecções virais *in vitro* por baculovírus, permitindo avaliar a especificidade dos vírus e o espectro de hospedeiros (Elbashir *et al.*, 2001). Essas linhagens podem ser classificadas, quanto à susceptibilidade e à permissividade à replicação viral, como permissivas, não-permissivas ou semipermissivas (Paraskeva *et al.*, 1982; Vaugh e Dougherty, 1985, citado por Castro *et al.*, 1999).

Uma linhagem é dita permissiva quando há replicação produtiva, isto é, todas as etapas do ciclo viral ocorrem, culminando na produção de corpos de oclusão e eventual lise da maioria das células infectadas (Miller e Lu, 1997; Iwanaga *et al.*, 2004). Experimentos com linhagens permissivas e o vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* – AcMNPV, espécie-tipo do gênero *Alphabaculovirus*, têm sido realizados, na maioria, com células de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Vaughn *et al.*, 1977) e *Trichoplusia ni* Hübner (Hink, 1970).

Linhagens não-permissivas são aquelas que não permitem a replicação produtiva do vírus (Kondo e Maeda, 1991; Miller e Lu, 1997; Katou *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2004).

Já nas linhagens semipermissivas ocorre uma replicação viral limitada e há algumas alterações celulares; porém, na fase final da infecção, observa-se baixa produção de corpos de oclusão (Silveira *et al.*, 2005).

Para centenas de baculovírus existentes, apenas algumas linhagens celulares são suscetíveis à replicação viral, ou seja, a maioria é não-permissiva ou semipermissiva (Volkman *et al.*, 1995).

Uma variedade de fenômenos influencia na infectividade seletiva dos baculovírus (Rohmann, 2008). Ao que parece, todos afetam a interação vírus-hospedeiro. Alguns dos mais estudados serão citados. A habilidade de encapsidação e mielanização de hemócitos de *Helicoverpa zea* torna-os 1.000 vezes menos suscetível à infecção por AcMNPV do que o *Heliothis virescens*, ambos membros da família *Noctuidae* (Trudeau *et al.*, 2001). Embora o RNAi já tenha sido usado como ferramenta para manipular a infecção de células por baculovírus (Means *et al.*, 2003), ainda não há relatos de que a replicação de AcMNPV possa ser afetada por este sistema (Rhormman, 2008). Outro fator já observado é que larvas de *H. virescens* demonstraram resistência crescente às infecções fatais de AcMNPV à medida em que

envelhecem (Kirkpatrick *et al.*, 1998). A membrana peritrófica, uma camada fina que reveste o intestino, também influencia na susceptibilidade à infecção viral. Por exemplo, Levy *et al.*, (2007) demonstraram que larvas de *A. gemmatilis* mais resistente à infecção viral, possuíam um aumento na espessura relativa da membrana peritrófica. Larvas de *S. frugiperda* são extremamente susceptíveis ao BV de AcMNPV quando infectadas pela hemocele, mas são altamente resistentes à infecção oral por ODV do mesmo vírus. Assim, as propriedades de ligação e fusão do ODV nas células epiteliais colunares do intestino de larvas de *S. frugiperda* foi investigada, comparando as infecções por *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* – SfMNPV-UC2, isolado caracterizado como altamente virulento, e por AcMNPV. O estudo revelou que, apesar da eficiência similar de fusão do ODV de ambos os vírus com as células epiteliais, o ODV de SfMNPV se ligou a um receptor específico nas células do intestino, que é ausente quando o ODV de AcMNPV infecta as mesmas células. Essa interação específica foi necessária para a infecção produtiva de células epiteliais colunares de *S. frugiperda* por SfMNPV (Haas-Stapleton *et al.*, 2005).

Avanços na biologia molecular do baculovírus e no desenvolvimento de um sistema eficiente de replicação *in vitro* revelaram alguns mecanismos importantes na replicação viral (Blissard e Rohrmann, 1990; Miller, 1988). Segundo as pesquisas, genes específicos podem afetar a gama de hospedeiros dos baculovírus. O *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* – BmNPV e o AcMNPV são altamente relacionados, pois a maioria de seus genes possuem por volta de ~90% de identidade de nucleotídeos e ~93% de identidade na sequência de aminoácidos das proteínas por eles codificadas (Gomi *et al.*, 1999). Apesar dessa similaridade, AcMNPV e BmNPV diferem no espectro de hospedeiros. BmNPV se replica em células de *Bombyx mori* (BmN), mas não em células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) nem em células de *Trichoplusia ni* (Katou *et al.*, 2006). Por outro lado, AcMNPV se replica em *S. frugiperda* e em *Trichoplusia ni*, mas não em *B. mori*. A membrana de células não-permissivas não atua como barreira à entrada de AcMNPV, pois partículas do vírus foram encontradas em seu interior (Groener *et al.*, 1984). É a GP64, proteína compartilhada tanto pelo BmNPV quanto pelo AcMNPV, que permite a entrada do AcMNPV em linhagens celulares de vertebrados – não-permissivas (Hofmann, 1995). Assim, a limitação na replicação viral em célula não-permissiva de inseto ocorre posteriormente à sua entrada e talvez possa ser controlada ou influenciada por múltiplos fatores linhagem-celular-específicos (Miller e Lu, 1997).

Um fragmento de gene de 572 pb foi encontrado em um variante de AcMNPV. Análises de sequenciamento de nucleotídeos e o mapeamento revelaram que esse fragmento corresponde ao gene da helicase de BmNPV, que permitiu a replicação de AcMNPV em ambas as células, BmN e Sf-21 (Maeda *et al.*, 1993). Outros estudos relataram a replicação do DNA de AcMNPV em células de BmN, mas BVs não foram produzidos. Em contraste, a replicação do DNA de BmNPV e a produção de BV ocorreram somente em células Sf quando foram superinfectadas com AcMNPV (Rahman e Gopinathan, 2003).

Embora todos esses fatores estejam descritos na literatura, os mecanismos exatos da determinação da gama de hospedeiros nos baculovírus ainda são desconhecidos. Assim, a busca de novos fatores que levem aos efeitos sinérgicos ou antagônicos de cada um dos vírus nas suas respectivas linhagens permissivas ou não-permissivas são importantes no entendimento da interação vírus-hospedeiro. No tocante aos baculovírus, os estudos podem também influenciar na aplicação do vírus como um biopesticida e como vetor de expressão de proteínas heterólogas.

1.7 O Baculovírus como uma ferramenta biotecnológica

Summers e Smith inauguraram, em 1987, o uso do baculovírus como vetor de expressão (BEV – *Baculovirus expression vector*) de proteínas recombinantes biológica e funcionalmente ativas, em quantidades elevadas. Esse sistema inclui a presença de promotores fortes e a substituição de genes não-essenciais à replicação viral por genes heterólogos de interesse (Possee, 1997).

Assim, o baculovírus transformou-se em uma ferramenta útil para a produção e a caracterização de uma grande variedade de proteínas recombinantes (O'Reilly *et al.*, 1992; Jarvis, 1997; Possee, 1997; Kamita *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008).

A atividade biológica e funcional da proteína recombinante e a similaridade com as proteínas eucarióticas nativas oferecem uma grande vantagem sobre sistemas convencionais de expressão bacteriana (Fraser, 1992) e sobre outros sistemas. As proteínas expressas em células de insetos possuem frequentemente modificação pós-traducional similar à das células de mamíferos.

A maioria dos vetores de expressão baculovirais não tem o gene da poliedrina (*polh*), responsável pela produção de vírus oclusos (Possee, 1997). Isso é possível, porque o gene da poliedrina não é essencial à replicação do baculovírus. Entretanto, o promotor da poliedrina é

altamente ativo e, portanto, em uma construção eficiente, é desejável que o gene heterólogo de interesse esteja no lugar do gene da poliedrina, sob o comando desse forte promotor.

O baculovirus espécie-tipo é o AcMNPV. As três linhagens celulares de insetos mais amplamente usadas no sistema BEV são: a BTI-Tn5B1-4 (High 5), derivada de *Trichoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994); e, a Sf9 (Summers e Smith, 1987) e a Sf21 (Vaugh *et al.*, 1977), derivadas de *Spodoptera frugiperda*.

A utilização do baculovírus como um sistema de expressão se expandiu para produzir biopesticidas (Tomalski e Miller 1991). Inúmeros recombinantes capazes de expressar proteínas que aumentam o poder bioinseticida desses vírus foram e estão sendo produzidos e testados nas últimas décadas (Smith, *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984; O'Reilly e Miller, 1991; Possee, 1986; Hajós *et al.*, 1999; Kim, *et al.*, 2000; Pinedo *et al.*, 2003; Hong-Lian *et al.*, 2008; Gramkow *et al.*, 2010).

Na área humana, os baculovírus recombinantes têm sido testados como vetores para a terapia gênica e para a produção de vacinas (Kost e Condreay, 2002; Lung *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2008). Esse sistema tem como vantagem a ausência de replicação do vírus e dos efeitos citotóxicos que normalmente ocorrem em células de mamíferos infectadas por outros vírus.

Recentemente, um recombinante expressando a proteína do envelope de retrovírus humano endógeno (*Human endogenous retrovirus* - HERV) foi usado como nano-carreador no desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o papiloma vírus humano (HPV - *Human papillomavirus*) (Lee *et al.*, 2010).

São várias as perspectivas da aplicação para a produção de vacinas em mamíferos, devido às vantagens já citadas e à, talvez, mais importante: a capacidade do baculovírus de induzir a imunidade humoral e celular. A resposta de células-tronco mesenquimais humanas (*Human mesenchymal stem cells* - hMSCs) usando baculovírus como um vetor de DNA viral foi explorada por Chen *et al.* (2009). A transdução de BVs ativou a via do receptor TLR3 (*toll-like receptor 3*) – uma proteína transmembrana que geralmente reconhece vírus derivados de RNA de fita dupla (dsRNA) – e desencadeou respostas específicas e transiente, como a expressão de interleucina 6 (IL-6) e 8 (IL-8), mas não induziu outras citocinas inflamatórias, como interferon beta (IFN-β). Esse tipo de estudo permite avaliar a utilização de vetores virais na estimulação do sistema imune, para serem usados como uma ferramenta segura na terapia gênica.

1.8 O Baculovírus como uma alternativa viável ao controle químico de insetos-praga

O baculovírus AgMNPV é o inseticida biológico viral mais bem sucedido no controle biológico da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Fig. 1.4.), especialmente no Brasil (Moscardi, 1989). No país, o bioinseticida já foi utilizado em mais de um milhão de hectares (Moscardi e Souza, 2002) e constitui uma alternativa real ao controle químico da praga (Ribeiro *et al.* 1998).

Embora o baculovírus selvagem tenha um considerável efeito inseticida, o que ameniza o dano da *A. gemmatalis* na lavoura de soja (Kunimi *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1998), os recombinantes surgiram da necessidade de diminuição do tempo de morte da lagarta (McLeod *et al.*, 1978; Smits *et al.*, 1987). Isso porque, mesmo depois de infectada com o vírus selvagem, a lagarta continua se alimentando da planta, antes de morrer.

Nesse sentido, diversas proteínas recombinantes inseticidas foram expressas com sucesso em insetos infectados, aumentando o poder bioinseticida dos baculovírus (Miller, 1988; Kamita *et al.*, 2005). O êxito desses estudos indica que os recombinantes podem ser dispersos na lavoura e produzir uma infecção fatal mais rápida que a provocada pelo baculovírus selvagem. Importante constar que os baculovírus são altamente específicos contra lepidópteros, não infectando nem vertebrados nem outros invertebrados (Granados e Federici, 1986; Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi, 1999).

Vários exemplos de baculovírus bioinseticidas geneticamente modificados são citados a seguir.

O primeiro é um recombinante AcMNPV que expressa um gene de uma toxina inseticida denominada AaIT, uma proteína do escorpião africano *Androctonus australis*. A AaIT aumentou em 38% a velocidade da ação bioinseticida em relação ao vírus selvagem, melhorando, assim, significativamente o controle do dano causado pelas larvas (Maeda *et al.*, 1991; Mccutchen *et al.*, 1991; Mccutchen *et al.*, 1997).

Outro exemplo envolve a deleção ou inativação de um gene viral com efeito na fisiologia do inseto. O gene ecdisteróide-udp-glicosil-transferase (*egt*), presente no genoma de alguns baculovírus, codifica para a enzima Ecdisteróide UDP-Glicosiltransferase (EGT), catalisadora da transferência de monossacarídeo (UDP-glicose ou UDP-galactose) para o hormônio ecdisona, que provoca a muda do inseto. Pinedo *et al.* (2003) inativaram esse gene no baculovírus AgMNPV, reduzindo em até 30% o tempo necessário para o vírus recombinante matar o inseto

hospedeiro em relação ao vírus selvagem. Desse modo, o inseto infectado pelo vírus com o gene *egt* inativo, já que tem menor tempo de sobrevivência, consome menos alimento que o infectado pelo vírus selvagem.

Exemplo recente da introdução de genes com atividade tóxica é o uso de dois baculovírus recombinantes: um contém o gene *ScathL* do inseto *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL) e o outro, o gene da Keratinase do fungo *Aspergillus fumigatus* (vSynKerat). Esses dois recombinantes diminuíram o tempo de morte necessário para matar os insetos infectados, quando comparado ao tipo selvagem do vírus. A mortalidade foi devido à expressão dessas proteases (*ScathL* e Keratinase) nas larvas infectadas, o que conduziu à destruição de tecidos internos (Gramkow *et al.*, 2010).

Outro relato foi o silenciamento do gene da esterase do hormônio juvenil (*ehj*) por RNA antisenso. A atividade desse hormônio está relacionada à metamorfose do inseto. Infecção com um AcMNPV recombinante com o gene *ehj* da lagarta do tabaco *Heliothis virescens* na orientação antisenso inibiu drasticamente o nível desse hormônio na hemolinfa da lagarta. Consequentemente, larvas de *H. virescens* no penúltimo ínstar, tiveram morfogênese aberrante e morreram antes de puparem (Hajós *et al.*, 1999). Larvas infectadas com o selvagem AcMNPV demonstraram as formas larva e pupa.



Figura 1.5: Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner). A: forma verde da larva; B: forma escura da larva; C: larva no último ínstar (Buss, L. J., Universidade da Flórida: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/velvetbean07.htm>).

2. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ou “vira-cabeça”, espécie-tipo do gênero *Tospovirus* (Samuel *et al.*, 1930), está disseminado nos quatro continentes. Possui partícula esférica de 80 a 120 nm, revestida por uma membrana lipoprotéica, provavelmente derivada da membrana do Complexo de Golgi do hospedeiro (Fig. 1.6a). É transmitido por dez espécies de insetos da Ordem *Thysanoptera* (Jones, 2005) – popularmente chamado de tripes –, sendo que a espécie *Frankliniella occidentalis* Pergande é o mais importante vetor (Wijkamp *et al.*, 1995). Esse vírus apresenta um impressionante círculo de hospedeiros, infectando 1090 espécies botânicas: 15 famílias de monocotiledôneas, 69 famílias de dicotiledôneas e uma família de pteridófitas (Parrella *et al.*, 2003). A espécie hospedeira economicamente mais importante é o tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill).

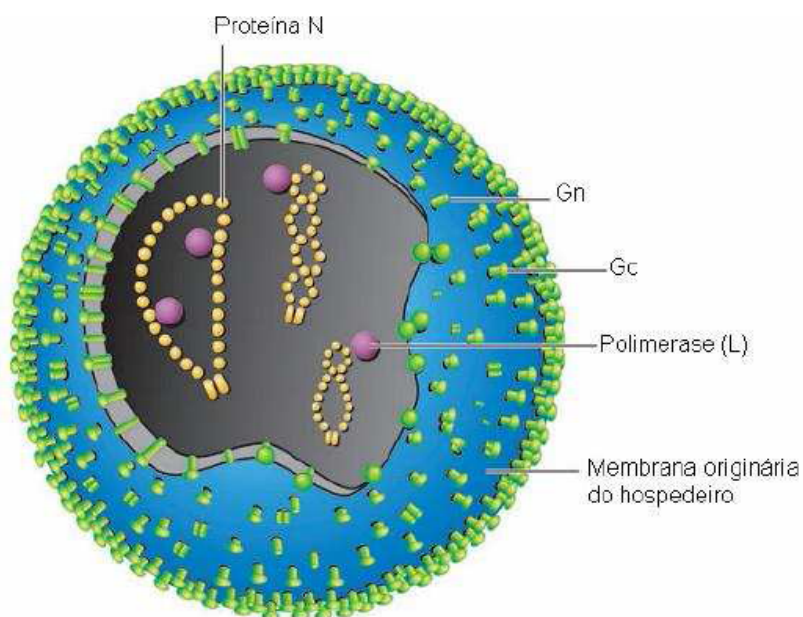
Os sintomas mais característicos da infecção por tospovírus são anéis cloróticos e necróticos nas folhas jovens, que adquirem cor bronzeada e exibem distorções foliares. Numa fase mais avançada da doença, as folhas e o caule apresentam áreas necróticas, além de drástica redução do crescimento com consequente redução da produtividade. O arqueamento das folhas superiores e do topo apical é responsável pela denominação dada aos sintomas causados pelo vírus nos tomateiros. A figura 1.7 mostra frutos maduros com manchas anelares cloróticas ou necróticas, com cor vermelho-pálido e manchas amarelas, além de anéis concêntricos (Colariccio *et al.*, 2001).

Na década de 90, com a elucidação do seu genoma, o vírus TSWV foi reclassificado no gênero *Tospovirus*, na família *Bunyaviridae* (De Haan *et al.*, 1990), composta até então, exclusivamente, por quatro gêneros que infectam animais: *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus* (Calisher, 1991). Assim, o *Tospovirus* é, entre os demais de sua família, o único gênero cujos membros infectam plantas (Fauquet *et al.* 2005) e se replicam no inseto vetor (Medeiros *et al.*, 2004). A maioria dos vírus da família *Bunyaviridae* é transmitida por artrópodes, primariamente mosquitos, carrapatos, flebotomíneos. Os hantavírus, por outro lado, são transmitidos por aerossol das excretas de roedores contaminados com tais vírus.

O genoma do TSWV consiste em três fitas simples de RNA designadas como L (8.9 kb), M (4.8 kb) e S (2.9 kb). O RNA L é senso negativo e contém um gene que codifica a proteína L (RdRP - RNA polimerase dependente de RNA) (De Haan *et al.*, 1991) (Fig. 1.6b). O RNA

ambisenso M codifica a proteína NSm – proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula – e uma poliproteína precursora das glicoproteínas Gn (amino-terminal) e a Gc (carboxi-terminal) – ligadas à transmissão pelo vetor tripes (Kormelink *et al.*, 1993; Kormelink, 1994). O RNA ambisenso S codifica a proteína N, que forma o nucleocapsídeo viral, e a proteína não estrutural NSs (De Haan *et al.*, 1990; Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003).

(a)



(b)

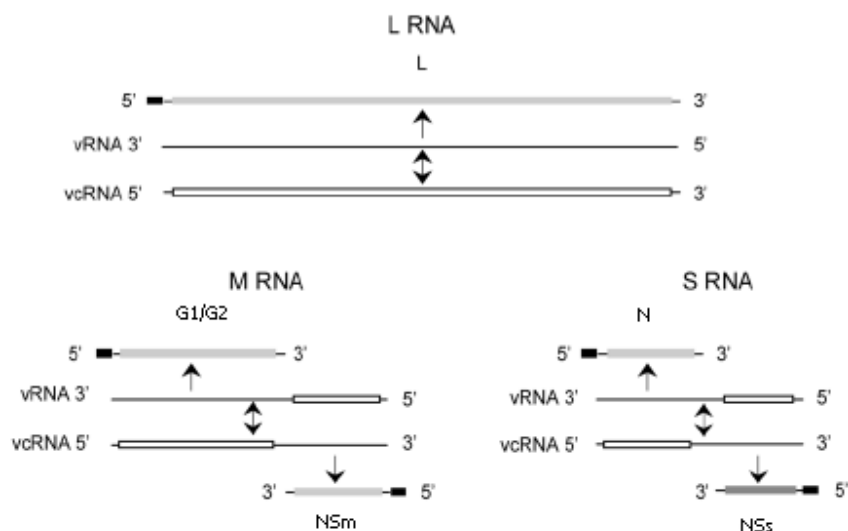


Figura 1.6: (a). Representação da estrutura da partícula de um tospovírus. A partícula viral é composta por três complexos ribonucleoprotéicos (RNP) localizados na parte interna: segmentos genômicos de RNA, proteína do capsídeo (proteína N) e uma polimerase (proteína L). O genoma está envolto por um envelope derivado da membrana do Complexo de Golgi do hospedeiro e das glicoproteínas virais Gn e Gc emergentes do envelope (Hogenhout *et al.*, 2008, adaptado por Dianese, 2009). **(b). Organização genômica e estratégia de expressão de TSWV.** O genoma do vírus consiste em três fitas simples de RNA: L (large), M (medium) e S (small). O RNA L é de polaridade negativa e codifica a polimerase viral; os RNAs S e M contêm duas fases de leitura, em um arranjo ambisenso do gene, que são expressos via síntese de RNAsm subgenômicos. O RNA M codifica o precursor das glicoproteínas Gn e Gc do envelope e a proteína não-estrutural NSm. O RNA S codifica uma proteína não-estrutural, a NSs, e a proteína estrutural N do nucleocapsídeo (Adaptado de Hemmes, 2007).



Figura 1.7: Sintomas de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) no tomateiro. (<http://fitodisease.blogspot.com/2009/04/vira-cabeca-do-tomateiro.html>)

3. O SILENCIAMENTO GÊNICO

3.1 Histórico

O fenômeno denominado silenciamento gênico foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas, a partir da avaliação do aumento na expressão dos genes envolvidos na pigmentação da flor de *Petunia* híbrida (Napoli *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990).

O estudo tinha como objetivo criar petúnias transgênicas, cujas flores apresentassem uma coloração mais intensa. A estratégia consistia em superexpressar o gene que codifica a chalcone sintase (CHS), uma enzima chave na biossíntese de antocianinas. Para isso, foi introduzida uma cópia extra do gene *Chs* sob o controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Entretanto, na maioria dos transformantes, não houve aumento da expressão. Ao contrário, surpreendentemente, em aproximadamente 25% dos transformantes, foi observada a redução da pigmentação floral, acompanhada de uma redução dramática da expressão do gene *Chs* transferido, inclusive algumas linhagens apresentaram flores totalmente brancas, ou seja, sem pigmento floral.

A análise molecular das linhagens transgênicas comprovou que a introdução da cópia extra havia efetivamente bloqueado a biossíntese de antocianinas, inibindo, simultaneamente, a expressão do gene endógeno pré-existente e da cópia introduzida. A inibição da pigmentação das flores foi diretamente correlacionada com uma redução específica no acúmulo de RNAm do gene *Chs*.

Napoli *et al.* (1990) sugeriram o termo “co-supressão” para descrever a perda de RNAs mensageiros decorrente da introdução de transgenes em *Petunia*.

Alguns anos após a descrição, fenômeno semelhante foi observado durante a infecção viral em plantas. Conforme observado, genes endógenos ou transgenes eram silenciados após a infecção por vírus recombinantes contendo parte da seqüência do gene ou transgene. Esse mecanismo foi denominado *virus-induced gene silencing* – VIGS (Kjemtrup *et al.*, 1998; Ratcliff *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 1998).

Outro fenômeno semelhante à co-supressão na *Petúnia* foi relatado no fungo *Neurospora crassa*: *quelling* – supressão (Cogoni *et al.*, 1996; Romano e Macino, 1992).

Após anos de relatos da supressão gênica em vários organismos, ainda não se sabia, especificamente, a causa do silenciamento de RNA em células.

A evidência veio com o estudo do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Em seus experimentos, Fire *et al.* (1998) testaram o efeito fenotípico do dsRNA (*double-strand* RNA ou RNA fita dupla) correspondente ao gene *unc-22*, codificante de uma proteína do miofilamento que impede contrações musculares constantes. Foi observada, após a injeção de dsRNA na gônada de *C. elegans*, a indução de contrações musculares severas na progênie do nematóide. Esse efeito não ocorreu quando foi injetado RNA fita simples correspondente ao *unc-22*. Então, somente a injeção de dsRNA conduziu a uma perda eficiente do RNAm alvo.

Observou-se, também, que o silenciamento foi específico para um RNAm, homólogo ao dsRNA introduzido; outros mRNAs não foram afetados. O RNAm alvo desapareceu, sugerindo que estivesse degradado. Somente algumas moléculas de dsRNA por célula foram suficientes para realizar completamente o silenciamento, o que indica que o dsRNA foi amplificado e/ou atuou cataliticamente. Esse efeito se espalhou entre os tecidos da progênie, evidência clara de que houve transmissão entre as células.

O estudo desse mecanismo, denominado silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi – *RNA interference*), finalmente forneceu uma explicação para o fenômeno outrora descrito, rendendo aos autores o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006. O ponto em comum dos diferentes fatores que levam ao silenciamento é o RNA de fita dupla (dsRNA).

Atualmente, o silenciamento gênico está descrito para vários dos organismos eucarióticos, incluindo protozoários, nematóides, insetos e parasitas (Agrawal *et al.*, 2003). Conforme já foi citado, diferentes termos foram utilizados na caracterização do silenciamento gênico: “co-supressão” (English, *et al.*, 1996); *virus-induced gene silencing* – VIGS, nas plantas (Lindbo e Dougherty, 1992; Baulcombe, 2004); *quelling*, supressão nos fungos (Wang *et al.*, 2000); RNA interferente – RNAi, em nematóides, insetos e animais (Elbashir *et al.*, 2001). Os procariotos não apresentam esse mecanismo, considerado, portanto, uma aquisição ou inovação eucariótica (Hannon, 2002).

Além disso, descobriu-se que o silenciamento por RNA está envolvido em modificações epigenéticas como metilação do DNA genômico direcionada por RNA (*RNA-directed DNA methylation* ou RdDM) (Wassenegger *et al.*, 1994), formação de heterocromatina (Kennerdell *et al.*, 2002) e eliminação de DNA (Covey e Al-Kaff, 2000) como defesa contra transposons – manutenção da integridade do genoma (Baulcombe, 2002).

Algumas pesquisas levam a crer que o silenciamento gênico tem como função principal prevenir a superexpressão gênica, controlando o número de cópias de determinado gene ou transgene (Wassenegger e Pélissier, 1998; Kooter *et al.*, 1999; Wassenegger, 2000). De acordo com as descobertas, os mecanismos de silenciamento por RNA controlam a expressão em nível transcricional e pós-transcricional, e que a maquinaria de silenciamento pode operar nos compartimentos nuclear e citoplasmático.

O papel do silenciamento por RNA foi consideravelmente ampliado com a descoberta dos micro-RNAs (miRNAs), estabelecendo-se o envolvimento do mecanismo na regulação pós-transcricional de genes endógenos (Bartel, 2004). Os miRNAs são moléculas endógenas de 22 nt, derivadas de longas fitas simples de RNAs (*ss-single stranded*) não codantes (Bartel, 2004). Em animais, os miRNAs surgem, principalmente, como controladores de genes relacionados ao desenvolvimento do organismo (Lee *et al.*, 1993; Hannon, 2002; Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Agrawal *et al.*, 2003).

Resultados recentes revelam que alguns vírus codificam seus próprios miRNAs, que são processados pela maquinaria celular de RNAi. Esses miRNAs interferem no mecanismo de defesa celular para favorecer a replicação viral. Várias hipóteses, algumas já confirmadas, suportam essa teoria (Masic, 2007). Primeiro, os miRNAs não são antigênicos. Seu tamanho pequeno evita o caminho induzido por INF/PKR (Inteferon/proteína kinase), provocado por dsRNAs longos. Em segundo lugar, os miRNAs podem reduzir a expressão dos produtos gênicos do hospedeiro, influenciando, assim, os estágios do ciclo de vida viral (Sullivan e Ganem, 2005; Pfeffer e Voinnet, 2006; Scaria *et al.*, 2006).

Outros processos biológicos, incluindo o controle da apoptose (Brennecke *et al.*, 2003), o metabolismo de lipídeos (Xu *et al.*, 2003), a supressão de tumores e a resistência a estresses oxidativos (Lewis *et al.*, 2003) estão também envolvidos com miRNAs.

Conclui-se, portanto, que o silenciamento gênico, com suas várias denominações e origens, é um fenômeno molecular bastante similar nos diferentes organismos. Trata-se, pois, de um sistema fundamental e universal de regulação gênica em processos biológicos (Tan e Yin, 2004).

3.2 Bases moleculares do silenciamento gênico

Independentemente do organismo estudado, os componentes comuns da via de silenciamento (Agrawal *et al.*, 2003) são:

- (a) o indutor, que é o dsRNA;
- (b) o RNA alvo, que é degradado em uma forma homóloga-dependente;
- (c) a maquinaria da degradação, que requer um grupo de proteínas estrutural e funcionalmente similares;
- (d) a degradação seqüência-específica do RNA mensageiro no citoplasma da célula, que pode ser induzida por RNA ou dupla fita de RNA (Sharp, 2001).

A descoberta de moléculas-chave que medeiam o processo de silenciamento por RNA veio com estudos em plantas. Hamilton e Baulcombe (1999) identificaram produtos da degradação do RNA, pequenos RNAs de 21-25 nucleotídeos (nt), como resultantes do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) induzido por vírus. Essas pequenas moléculas denominadas *small interfering RNAs* – siRNA ou RNA interferente –, de orientação senso e anti-senso, apresentam homologia com o RNA silenciado e estão associadas ao processo. O acúmulo de siRNAs sugere que a formação de dsRNA ocorre antes da degradação do RNAm.

RNAs interferentes foram também descobertos em células de *Drosophila*, nas quais foram introduzidas longos dsRNA (500 nt) exógenas. Os siRNAs resultaram da degradação do dsRNA injetada (Hammond *et al.*, 2000).

Assim, a geração de siRNA se tornou um fator comum de qualquer evento homólogo-dependente de silenciamento por RNA.

3.3 Etapas do silenciamento por RNA

Após a identificação dos siRNAs como moléculas-chave, a busca foi em torno dos polipeptídeos que poderiam gerar tais moléculas. Dessa busca resultou a divisão do mecanismo de silenciamento em duas etapas, descritas a seguir.

3.3.1 Dicer

A primeira proteína Dicer foi isolada em *Drosophila* (Hammond *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001). Neste trabalho, longos dsRNAs foram clivados, por uma ribonuclease do tipo RNase III, em fragmentos de 21-23 nucleotídeos (nt), tamanho similar ao produzido durante o processo de RNAi. Os autores demonstraram que essa enzima está envolvida no início do processo de RNAi. O nome Dicer (DCR) foi devido à sua capacidade para clivar dsRNA em pequenos RNAs de tamanhos uniformes (siRNA).

Proteínas Dicer contem múltiplos domínios e são caracterizadas pela presença de um domínio amino-terminal helicase, seguido por um domínio de função desconhecida (DUF283), um domínio PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE (PAZ), dois domínios próximos RNase III e um domínio que se liga ao dsRNA – dsRBD (Catalanotto *et al.*, 2000; Tabara *et al.*, 1999).

Membros da família RNase III estão entre as poucas nucleases que demonstram especificidade para dsRNAs (Nicholson, 1999).

A enzima Dicer é conservada evolutivamente, com homólogos presentes em fungos, plantas e animais superiores (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Knight e Bass, 2001). A conservação funcional desta família de proteínas e seu requerimento para RNAi veio com as demonstrações de que a Dicer de humanos também cliva dsRNAs em siRNAs (Bernstein *et al.*, 2001) e de que mutantes de *C. elegans* em ortólogos a Dicer (DCR-1) não ativam o sistema de RNAi induzido por dsRNA (Grishok *et al.*, 2001; Knight e Bass, 2001).

3.3.2 RISC

A atividade nuclease sequência-específica, observada em extratos de célula de *Drosophila*, responsável por incorporar os siRNAs produzidos pela Dicer foi denominada complexo de RNA indutor de silenciamento ou *RNA-induced silencing complex* – RISC (Hammond *et al.* 2000).

Noutro trabalho, os mesmos autores (Hammond *et al.* 2001) purificaram uma proteína identificada como membro da família das Argonautas, a Argonauta 2 (AGO2). A AGO2 é uma proteína de 130-kDa que contém resíduos de poliglutamina e domínios PAZ e PIWI

característicos dos membros da família Argonauta (Lingel *et al.*, 2004). O domínio PAZ se liga preferencialmente ao RNA e reconhece a extremidade 3' de siRNAs fita simples (Lingel *et al.*, 2004). Os membros dessa família de proteínas estão ligados ao mecanismo de silenciamento gênico e ao controle do desenvolvimento em diversas espécies.

Em estudos subseqüentes, demonstrou-se que proteínas Argonauta também são componentes do RISC em mamíferos, fungos, nematóides, protozoários e plantas (Djikeng, *et al.*; Martinez *et al.*, 2002; Carmell e Hannon, 2004; Jin *et al.*, 2009). Em humanos, a AGO2 possui atividade de RNase III, que medeia a clivagem do mRNA alvo após sua associação ao siRNA no complexo RISC (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004).

Somando-se os conhecimentos acerca dos componentes e etapas da maquinaria do RNAi, o mecanismo foi se tornando mais claro (Fig. 1.8).

Na primeira etapa, longas moléculas de dsRNA são reconhecidas pela enzima Dicer, que as cliva em siRNA. Esses fragmentos curtos gerados contém 2 nucleotídeos protudentes na extremidade 3' e um fosfato na extremidade 5', produtos característicos de clivagem por enzimas RNase-III da família de proteínas Dicer (Bernstein *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Esta clivagem requer ATP (Bernstein *et al.*, 2001).

Na etapa efetora da via de silenciamento de RNA, uma fita do duplex de siRNA, derivada do processamento de dsRNA, é levada para um complexo de ribonucleoproteínas, o complexo de RNA indutor de silenciamento (RISC), para identificação seqüência-específica de RNAs alvos (Khvorova *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2003; Tomari e Zamore, 2005). A atividade enzimática de membros da família Argonauta (AGO) programa o RISC para direcionar a clivagem seqüência-específica de mRNAs complementares e impedir a sua tradução (Fagard *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2000).

Uma das muitas características do RNAi é sua natureza catalítica. Poucas moléculas de dsRNA são o suficiente para degradar continuamente um RNAm alvo transcrito. Embora a conversão de longos dsRNAs em muitos siRNAs pequenos conduza a algum grau de amplificação, não é o bastante para tal degradação contínua do RNAm. Mutações nos genes que codificam para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) afetam o mecanismo de RNAi. Inferiu-se que esse tipo de polimerase pode replicar siRNAs, gerando um RNA complementar (dsRNAs), através da molécula de siRNA, que dará início novamente ao processo permitindo sua

propagação em plantas e entre gerações de *C elegans* (Fire *et al.*, 1998; Lipardi *et al.* 2001; Sijen *et al.* 2001).

Existem três vias de silenciamento por RNA (Xie *et al.*, 2004).

A primeira é a de silenciamento citoplasmático via siRNAs, envolvida na degradação de RNA viral, que influencia, ou mesmo bloqueia, a tradução gênica.

A segunda é a de silenciamento de mRNAs endógenos via miRNAs. Os miRNAs regulam a expressão gênica negativamente, por meio do pareamento de bases específicas aos mRNAs alvo, resultando na clivagem do mRNA ou na repressão de sua tradução (Lee *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2002; Bartel, 2004; Baulcombe, 2004). A maioria dos miRNAs já identificados em plantas possui como alvo mRNAs que codificam fatores de transcrição, particularmente aqueles envolvidos na regulação de genes que controlam o desenvolvimento (Kasschau *et al.*, 2003; Rhoades *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003).

Por último, a terceira via é nuclear e está associada à metilação de DNA e à formação de heterocromatina e/ou reorganização genômica (Volpe *et al.*, 2002).

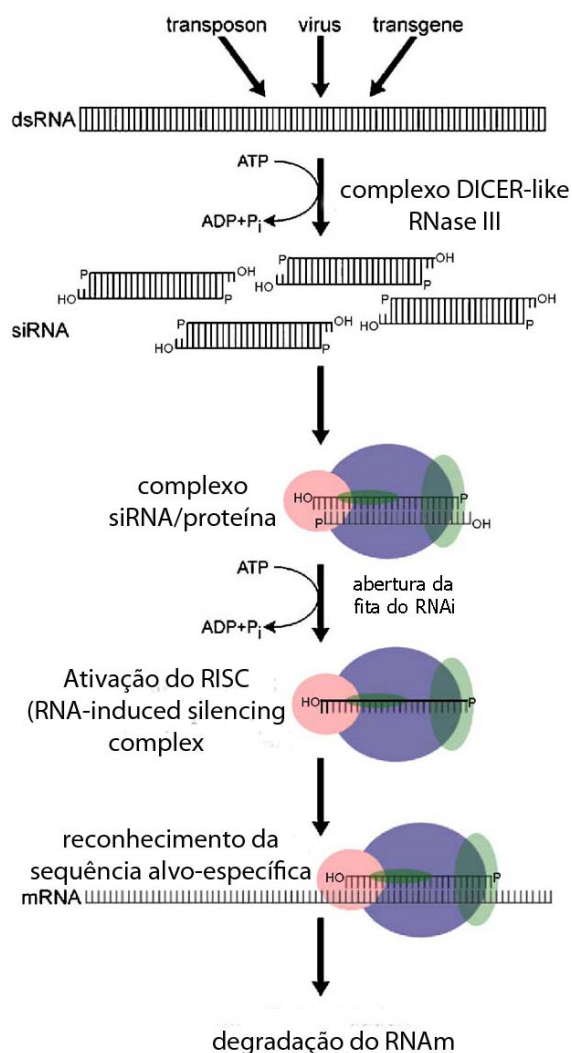


Figura 1.8: Modelo de mecanismo geral para via de silenciamento por RNA. O processo é provocado inicialmente pelo dsRNA, que pode ser introduzido experimentalmente ou surgir de transposons endógenos, da replicação de vírus de RNA ou da transcrição de transgenes. O dsRNA é clivado por uma ribonuclease III (RNase III) – Dicer – em duplex de RNAs de 21 a 24 nucleotídeos, nomeados RNAs curtos de interferência (siRNAs). O siRNA pode igualmente ser sintetizado fora da célula e, depois, introduzido em uma célula, ferramenta com o nome de “tecnologia de RNAi”. A produção de siRNAs pela Dicer é uma etapa dependente de Adenosina Trifosfato (ATP) e provavelmente envolve interações com outras proteínas, que se ligam ao dsRNA. Os siRNAs produzidos pela clivagem de longos dsRNAs por Dicer têm uma característica distinta: possuem 2 nt expostos na extremidade 3'. Em outra etapa igualmente dependente de ATP, os siRNAs são desnaturados por endonucleases, uma delas é a proteína Argonata e, posteriormente, incorporados ao complexo indutor de silenciamento gênico (RISC). Dentro do RISC ativado, o siRNA fita-simples atua como guia para identificar o RNAm complementar ao contato do complexo. Após a formação de duplex entre a fita de siRNA e o RNA de fita simples (RNAm), RISC (especificamente a proteína Argonata) facilita, desse modo, a clivagem do referido RNAm – alvo, resultando em uma degradação sequência-específica (Adaptado de Roth *et al.*, 2004).

3.4. O silenciamento por RNA como mecanismo de defesa da célula contra os vírus

Uma das principais funções do RNAi é a defesa contra a infecção viral. Essa função foi estabelecida em plantas durante estudos sobre a “resistência derivada ao patógeno”, mecanismo de resistência à uma doença, induzida pelo próprio vírus (Muangsan *et al.*, 2004). Foi demonstrado que a expressão de um fragmento do genoma viral em plantas transgênicas com sequência homóloga as tornava resistentes ao vírus (Lindbo e Dougherty, 1992). Plantas transgênicas de feijoeiro que continham uma construção do tipo intron-hairpin (hpRNAi) correspondente ao fragmento de um gene *ACI*, essencial à replicação do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), foram resistentes a esse vírus. As plantas transformadas passaram a expressar um RNA de fita dupla que pode ser reconhecido pelo mecanismo de silenciamento gênico e produzir small interfering RNA (siRNA) (Bonfim *et al.*, 2007).

O silenciamento citoplasmático via siRNAs está envolvido na degradação de RNA viral, interferindo no ciclo de infecção (Fig. 1.9). Os siRNAs podem originar-se de um transgene, de extensas estruturas secundárias do RNA viral ou de um intermediário da replicação de vírus (de genoma composto ou por RNA ou por DNA). Em vírus com genoma de DNA, o dsRNA pode ser formado por meio do anelamento de transcritos sobrepostos complementares (Baulcombe, 2004).

A observação de que plantas recuperadas de uma primeira infecção viral tornavam-se resistentes à reinfeção, pelo mesmo vírus, devido à ativação e à manutenção do silenciamento por RNA, levou à hipótese de que esse mecanismo seria uma resposta adaptativa de defesa contra vírus (Al-Kaff *et al.*, 1998; Covey *et al.*, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997).

Em hospedeiros animais, o RNAi é uma ferramenta a mais no combate a diversas doenças causadas por vírus, possibilitando, assim, alternativas terapêuticas viáveis de resistência às infecções.

Kim *et al.* (2010) demonstraram a aplicabilidade do potencial *in vivo* da entrega direcionada de siRNA de LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) – uma integrina presente nas células T e em macrófagos – por nanopartículas siRNA/LFA-1 I-tsNPs [*Integrin-targeted and stabilized nanoparticles*] como uma medida de profilaxia anti-HIV. A administração de anti-CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) siRNA/LFA-1 I-tsNPs conduziu ao silenciamento gênico leucócito-específico, que foi sustentado por 10 dias. Finalmente, ratos imunizados, quando desafiados com HIV, logo após o tratamento por siRNA anti-CCR5 mostraram aumento na

resistência à infecção, avaliada pela redução da carga viral no plasma e da perda de células T CD4, associada a doença.

Células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram transformadas com um plasmídeo contendo um dsRNA que transcreve uma seqüência invertida de RNA (irRNA) derivada do genoma da dengue virus type 2 (DEN-2). 44% da linhagem celular foi resistente à infecção por esse vírus (Adelman *et al.*, 2002). Khoo *et al.* (2010) mostraram que mosquitos de *Aedes aegypti* transgênicos, defectivos em RNAi, reduziram fortemente as barreiras intestinais à infecção por um *Sindbis virus* (SINV) recombinante (SINV-TR339EGFP). Isso confirma que a via endógena de RNAi de *Aedes aegypti* modula a competência do vetor para SINV no intestino, afetando a taxa e a intensidade da infecção e a disseminação viral pelos tecidos secundários.

A proteína IE-1 é uma ativadora transcricional essencial à replicação do baculovírus. Introduziu-se em células Sf21 e em larvas de *Tenebrio molitor* o dsRNA correspondente a uma seqüência do gene *ie-1* de baculovírus (Flores-Jasso *et al.*, 2004). Essa estratégia preveniu contra a infecção pelo baculovírus AcMNPV *in vitro* e *in vivo*. Cerca de 95% das células Sf21 transfectadas com dsRNA correspondente ao gene *ie-1* não foram infectadas com o baculovírus.

Portanto, os vírus podem interagir de várias formas com o mecanismo de RNAi. Essa resposta antiviral ao RNAi pode representar um fenômeno geral.

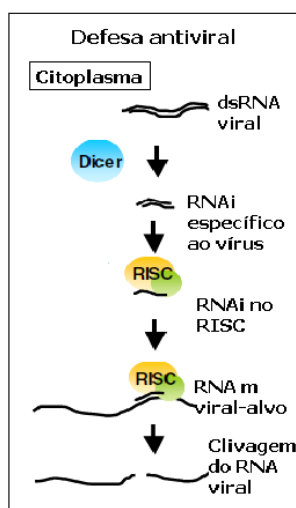


Figura 1.9: Esquema que mostra uma das principais funções do RNAi: inibir infecções virais pela produção de RNAs de interferência (siRNAs). Os siRNAs podem-se originar de estruturas secundárias longas do RNA viral ou de dsRNAs intermediários da replicação, podendo, ainda, ser complementares ao RNAm viral. Após entrar no RISC, os siRNAs induzem a clivagem do RNAm (Adaptado de Berkhout e Haasnoot, 2006).

3.4.1 Supressores virais do silenciamento gênico

A importância do silenciamento como mecanismo de defesa antiviral em plantas se reflete na evolução dos genomas virais, que adquiriram, ao longo do processo evolutivo, proteínas com função de supressão de silenciamento gênico (Ding *et al.*, 2004).

Em contrapartida aos mecanismos celulares do hospedeiro que impedem a multiplicação viral (Llave *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2004; Li e Ding, 2001; Roth *et al.*, 2004), muitos vírus de plantas codificam proteínas que interferem em um ou em vários aspectos da via de silenciamento.

Tais proteínas virais têm a capacidade de suprimir o silenciamento (Lichner *et al.*, 2003; Vance e Vaucheret, 2001; Waterhouse *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001). Algumas dessas proteínas, descritas inicialmente como fatores de virulência ou determinantes de patogenicidade, são necessárias para a infecção sistêmica do hospedeiro (Kormelink *et al.*, 1991; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Vanitharani *et al.*, 2003).

Os supressores virais de silenciamento têm como alvo a maquinaria de RNAi desde a geração dos siRNAs até depois de sua incorporação ao RISC, permitindo, assim, replicações e acúmulos virais mais altos (Franz *et al.*, 2006; Bouloy *et al.*, 2001; Lindbo e Dougherty, 1992; Pruss *et al.*, 1997; Ullman *et al.*, 1993; Billecocq *et al.*, 2004; Yokotaa *et al.* 2005; Ikegami *et al.*, 2005).

A seguir, será feito um breve relato de algumas das proteínas relacionadas à supressão do silenciamento gênico.

A proteína AC2, encontrada em todas as espécies do gênero *Begomovirus*, foi identificada como um fator de transcrição requerido para ativar a expressão de genes virais tardios (Sunter e Bisaro, 1992, 1997, 2003) como por exemplo, dos genes que expressam a proteína capsidial e a proteína de movimento BV1, e, por isso, é chamada também de proteína ativadora transcricional – TrAP (*transcriptional activator protein*). Usando o vetor *Potato virus X* (PVX) contendo os transgenes GFP e AC2 de *African cassava mosaic virus* (ACMV), Voinnet *et al.* (1999) mostraram que AC2 foi capaz de inverter o silenciamento para GFP, em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Esse dado foi corroborado por estudos similares com o tipo-selvagem e o mutante da proteína AC2 de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que confirmaram a supressão (Dong *et al.*, 2003; Van Wezel *et al.*, 2002). Entretanto, a AC2 dos vírus TYLCV e ACMV não se liga a siRNA ou miRNA (Chellappan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Assim, sugere-se que aquela

proteína atue no núcleo por um mecanismo dependente da interação com DNA e da atividade de ativação transcricional.

O perfil transcricional de protoplastos de *Arabidopsis*, após a expressão transiente de AC2 de ACMV e de *Mungbean yellow mosaic virus-Vigna* (MYMV), mostrou que essa proteína induziu a expressão de aproximadamente 30 genes, incluindo o *WEL1* (*Werner exonuclease-like 1*). Análise posterior indicou que a proteína WEL1 é capaz de suprimir o silenciamento de RNA em linhagens transgênica de *N. benthamiana* contendo GFP (Trinks *et al.*, 2005). Conclui-se, então, que AC2 suprime o silenciamento indiretamente, ativando a expressão de uma proteína celular que funciona como um regulador negativo endógeno do sistema (Bisaro, 2006).

Recentemente, foi reportado que AC2 de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) forma um complexo com o *PPD2*, um fator de transcrição de *Arabidopsis*, e o promotor da capa protéica (*CP*). Essa interação conduz a ativação da expressão do gene *CP* (Lacatus e Sunter, 2009).

A NS1 do vírus *Influenza A* é uma proteína não estrutural, expressa em altos níveis em células infectadas, que tem sido relacionada à inibição da defesa antiviral mediada por interferons α e β (Garcia *et al.*, 2001), à regulação da tradução viral (Aragon *et al.*, 2000; Enami e Enami, 2000) e à inibição do RNAm do hospedeiro por mecanismos de supressão de RNA (Qian *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1995; Krug *et al.*, 2003). Bucher *et al.* (2004) demonstraram que, em plantas, a proteína NS1 tem atividade de supressão de silenciamento de RNA, por se ligar ao siRNA.

Segundo os relatos de Takeda *et al.* (2002), a proteína NSs de TSWV foi o primeiro supressor de silenciamento gênico encontrado em um vírus de RNA fita-negativa, de plantas de *N. benthamiana*. No trabalho, sugere-se que a ação de supressão de silenciamento de RNA pela proteína NSs de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) pode ocorrer na etapa Dicer, durante a geração de dsRNA, ou posteriormente, na etapa Risc, ligando-se ao siRNAs. Em experimentos de co-infiltração com *Agrobacterium* contendo os genes *NS_M*, *NS_S*, *G1* e *G2* de TSWV, apenas o *NSs* suprimiu o silenciamento por GFP em plantas de *N. benthamiana* transgênicas (Bucher *et al.*, 2003).

Células de carrapato (Arachnida: *Ixodidae*) co-infectadas com um *Semliki Forest virus* recombinante expressor de luciferase (SFV-Luc) e outro SFV recombinante expressor de NSs de TSWV (SFV-TSWVNSs) também mostraram atividade de supressão do silenciamento gênico, ao aumentar a atividade de luciferase nessas células (Garcia *et al.*, 2006). De acordo com Blakqori *et al.* (2006), células U4.4 de *Aedes albopictus* co-infectadas com os mesmos recombinantes

descritos acima (SFV-Luc + SFV-TSWVNSs) também resgataram, mesmo que pouco, a atividade de luciferase. No inseto vetor *Frankliniella occidentalis*, a NSs é indicadora da infecção viral, uma vez que essa proteína não-estrutural foi detectada em células e em tecidos infectados do inseto (Ullman *et al.*, 1993). Porém, a função dessa proteína no inseto vetor ainda não foi elucidada. Assim, estudos com a NSs de TSWV poderão fornecer mais informações sobre sua função e esclarecer os mecanismos de defesa na infecção viral de plantas e animais.

A proteína *helper* HC-Pro do vírus *Tobacco etch* foi identificada como o primeiro supressor de PTGS (Lindbo e Dougherty, 1992). Essa proteína reduz, nas plantas, a degradação do RNA alvo e o acúmulo de siRNAs (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau e Carrington, 1998; Llave *et al.*, 2000). Há relatos de que HC-Pro inibe parcialmente o dsRNA processado pela Dicer e interfere na desnaturação do siRNA (e do miRNA), impedindo, desse modo, a incorporação do RNA alvo ao RISC (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). A mesma ação foi atribuída à proteína p19 do *Cymbidium ringspot virus*, que tem a capacidade de se ligar aos siRNA, impedindo sua incorporação ao RISC (Lakatos *et al.*, 2004; Silhavy *et al.*, 2002; Vargason *et al.*, 2003).

A proteína B2 do *Flock House Virus*, isolado do coleóptero *Costelytra zealandica* (*Coleoptera: Scarabaeidae*), suprime o silenciamento de RNA em células de planta (Dasgupta *et al.*, 2001) e *Drosophila* (Li *et al.*, 2002). Prova de que vírus de animais também possuem a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA como estratégia de elevar sua concentração em diversas células hospedeiras.

Em síntese, há cada vez mais evidências da conservação do silenciamento gênico tanto no reino animal quanto no reino vegetal.

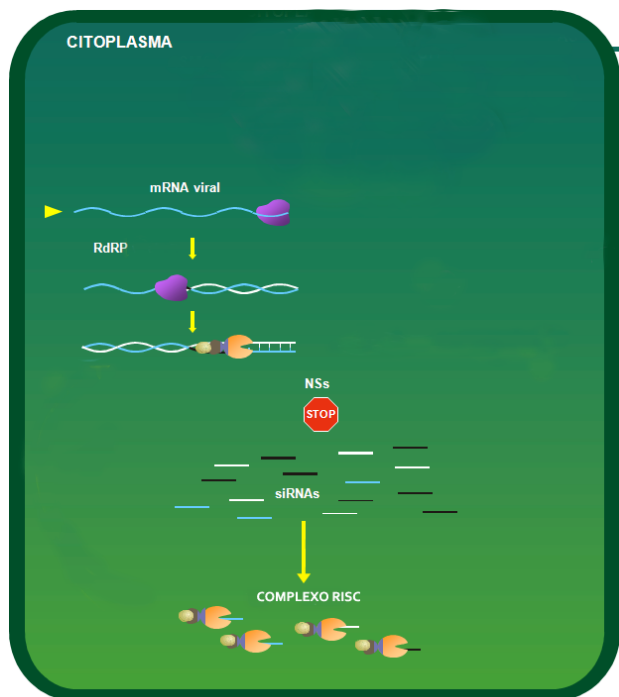


Figura 1.10: Esquema que mostra a ação da proteína NSs de TSWV no mecanismo de silenciamento de RNA (Adaptado de Prins, M., Universidade de Wageningen, comunicação pessoal). A proteína supressora NSs se liga aos RNAs curtos de interferência (siRNA), impedindo, desse modo, a formação do complexo RISC e consequentemente o silenciamento gênico.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

As proteínas virais supressoras de silenciamento gênico, quando expressas nas células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes, atuam bloqueando etapas do silenciamento gênico e aumentando, pois, a capacidade infectiva e o efeito patogênico desse vírus contra seu hospedeiro.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Produzir baculovírus recombinantes contendo genes supressores de silenciamento gênico provenientes de diferentes vírus, para avaliação do efeito na replicação viral em insetos e na capacidade bioinseticida.

Objetivos específicos:

- a) Clonar os genes *NSs* de TSWV, *AC2* de *Tomato severe rugose virus* (TSRV) e *NS1* de *Influenza A virus*, em vetores de clonagem e vetores de transferência;
- b) A partir dos vetores de transferência recombinantes, construir os baculovírus recombinantes vAcNSs, vAcAC2 e vAcNS1;
- c) Avaliar, inicialmente, em ensaios pilotos, o efeito citopático dos baculovírus recombinantes (vAcNSs, vAcAC2 e vAcNS1) nas linhagens BTI-Tn-5B-1-4, permissiva ao AcMNPV, e UFL-AG-286, semipermissiva. Dentre os recombinantes, selecionar, para experimentos posteriores, aquele capaz de induzir um maior efeito citopático nas linhagens de células analisadas;
- d) Avaliar a replicação viral do recombinante selecionado nas linhagens hospedeiras BTI-Tn-5B-1-4 (permissiva), UFL-AG-286 (semipermissiva) e BM-5 (não-permissiva) e em hemócitos de *A. gemmatalis*;
- e) Detectar a expressão e a localização intracelular nas três linhagens estudadas da proteína expressa pelo recombinante selecionado;
- f) Avaliar a atividade dessa proteína como supressora de silenciamento gênico por ensaios de RNAi;
- g) Avaliar a atividade bioinseticida do baculovírus recombinante selecionado em larvas de *Spodoptera frugiperda*, hospedeiro permissivo, e *A. gemmatalis*, hospedeiro semi-permissivo ao baculovírus AcMNPV.

CAPÍTULO II

CONSTRUÇÃO DE BACULOVÍRUS RECOMBINANTES CONTENDO GENES SUPRESSORES DE SILENCIAMENTO GÊNICO

RESUMO

Este capítulo descreve a construção de baculovírus recombinantes contendo os genes supressores do silenciamento gênico *AC2* do *Tomato severe rugose virus*, *NS1* do vírus *Influenza A* e *NSs* do *Tomato spotted wilt virus* e a posterior análise dos efeitos desses genes durante a infecção de células de inseto. A partir da construção dos recombinantes – vAcAC2, vAcNS1 e vAcNSs –, realizaram-se experimentos preliminares de infecção para avaliar o efeito citopático de cada vírus em células e em larvas de inseto. Nesses experimentos, o baculovírus vAcNSs aumentou consideravelmente a produção de poliedros (PIB's) do baculovírus selvagem AcMNPV durante infecções mistas em células de BTI-Tn-5B-1-4. No bioensaio preliminar, uma dose de 10^7 p.f.u./ml⁻¹ dos três baculovírus recombinantes expressando os supressores de silenciamento gênico mostrou atividade bioinseticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. Porém, o vAcNSs apresentou 80% de mortalidade no período de 120 h pós-infecção quando comparado a 58% por vAcAC2 e 70% por vAcNS1, nesse mesmo tempo. O selvagem AcMNPV apresentou 60% de mortalidade. Assim, através dos resultados preliminares, *in vitro* e *in vivo*, o vAcNSs foi selecionado para os experimentos posteriores.

ABSTRACT

This chapter describes the construction of recombinant baculovirus containing suppressors silencing gene of the begomovirus, *AC2* of *Tomato severe rugose virus*, *NS1* of virus *Influenza A* and the *NSs* of the *Tomato spotted wilt virus* and, then, analysis of the effect of these genes during infection of the insect cells. After the constructions the viruses – vAcAC2, vAcNS1 and vAcNSs – were tested in preliminary experiments of infection to evaluate the cytophatic effect of each virus on cell lines BTI-Tn-5B-1-4 and on *S. frugiperda* caterpillars. In these experiments, the baculovirus vAcNSs enhanced considerably PIB production of the wild type virus AcMNPV during the mixed infections in cells of BTI-Tn-5B-1-4. In preliminary bioassays with a dose of 10^7 p.f.u./ml⁻¹ of three recombinant baculovirus expressing suppressors silencing gene showed bioinsecticide activity against larvae of *S. frugiperda*. However, vAcNSs showed 80% of mortality with 120 h pos-infection when compared with 58% for vAcAC2 and 70% for vAcNS1, in the same time. The AcMNPV wild type showed 60% of mortality. Thus, through these preliminary results, *in vitro* and *in vivo*, vAcNSs was selected for the posterior experiments.

1. Introdução

No controle de pragas, principalmente em sistemas de produção agrícola, o método predominante para reduzir o risco de danos econômicos em lavouras são as aplicações frequentes de inseticidas químicos. Os efeitos adversos ao meio ambiente e ao homem provocam a busca de soluções mais sustentáveis ao meio ambiente.

Moscardi (1977) desenvolveu no Brasil um dos programas mais bem sucedidos no mundo para o controle biológico da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), desde o início da década de 1980. O agente biológico é o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV).

Dois fatores contribuíram para o sucesso do uso do baculovírus como um bioinseticida: a alta virulência contra o hospedeiro (*A. gemmatalis*) e a transmissão eficiente do vírus nas

populações do hospedeiro, por fatores bióticos e abióticos (Moscardi e Souza, 2002). Por outro lado, um dos fatores importantes que limitam o seu uso por agricultores é a ação lenta desses agentes para matar o inseto alvo. Isso porque, após a aplicação do vírus, a lagarta continua se alimentando, causando danos na cultura, até em torno de 5 a 7 dias antes de morrer (Moscardi, 1986).

Nos anos 90, foi demonstrado que a velocidade de ação dos baculovírus poderia ser geneticamente aumentada. Esse foi um fator que estimulou o interesse na manipulação genética de baculovírus como meio para controlar pestes de lepidópteros (Wood e Granados, 1991; Bonning e Hammock, 1996).

Assim, o aumento da patogenicidade dos baculovírus pela modificação genética se tornou objeto de estudo em diversos laboratórios pelo mundo. Essas modificações envolvem a eliminação ou a incorporação de um ou mais genes no genoma viral que interferem na fisiologia do inseto ou expressam toxinas de outros organismos.

Por exemplo, o gene *egt* (ecdisteróide UDP-glicosiltransferase) foi deletado do genoma viral, resultando numa redução em torno de 30% do tempo para matar o inseto (Pinedo *et al.*, 2003). Em baculovírus, esse gene é responsável pela inativação do hormônio ecdisona, bloqueando, portanto, a capacidade de a lagarta infectada passar para o estágio seguinte e de o vírus obter uma grande quantidade de progênie. Dessa forma, sem o *egt*, deletado do genoma viral, o inseto infectado muda prematuramente para o estágio seguinte, morrendo em menos tempo. Larvas infectadas por baculovírus sem o gene *egt* mostraram uma degeneração precoce dos túbulos de Malpigh (Cordeiro, 2008).

Os resultados mais significativos no aumento da virulência dos baculovírus foram obtidos com a inserção, no genoma do baculovírus, de toxinas inseticidas, como a AaIT do escorpião africano, *Androctonus australis*, e a neurotoxina TxP1 do ácaro *Pyemotes tritici*. (Maeda *et al.*, 1991; Mccutchen *et al.*, 1991; Mccutchen *et al.*, 1997). Em relação ao vírus selvagem, a AaIT diminuiu em 38% o tempo de morte do inseto *Heliothis virescens*, infectado pelo recombinante, melhorando, assim, significativamente o controle do dano causado pelas larvas (Mccutchen *et al.*, 1991).

A ação das proteínas virais supressoras do silenciamento gênico oferece uma nova ferramenta para contra-atacar o sistema de defesa antiviral do hospedeiro.

Assim, este trabalho teve como objetivo a construção de baculovírus recombinantes que expressem as proteínas supressoras de silenciamento gênico AC2 de um begomovírus (ToSRV), NS1 do vírus Influenza A e NSs do tospovírus TSWV. Na literatura não há relato de baculovírus recombinantes expressando proteínas supressoras de RNAi. Pretende-se, com essa estratégia, avaliar o efeito da expressão desses genes na virulência do baculovírus em células e larvas de inseto.

2. Materiais e Métodos

2.1 Prospecção dos genes AC2, NS1 e NSs e desenho dos oligonucleotídeos

Utilizou-se o GenBank (*National Center for Biotechnology Information*) para a busca das seqüências dos genes AC2, NS1 e NSs, que foram utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos específicos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Sequências dos oligonucleotídeos desenhados, a partir de acessos depositados no NCBI, utilizadas para amplificação dos genes AC2 do begomovírus ToSRV, NS1 do vírus Influenza A e NSs do tospovírus TSWV.

Gene	Nº do Acesso no GenBank	Seqüência 5'>3'
AC2	AF291705	F: ATGCAAAATTCATCTTCCTCAAC R: CTATTTAAATATATCAGCCCAGAAGCTC
NS1	J02150	F: ATGCAAAAGCAGGGTGACAAA R: AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT
NSs	D13926	F: ATGTCTTCAAGTGTTTATGAGTC R: TTATTTTGATCCTGAAGCATGTG

Após o desenho dos oligonucleotídeos, verificou-se a ausência de dímeros, heterodímeros e *self*-dímeros, no software OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., Illinois, USA).

2.2 Amplificação e clonagem dos genes *AC2*, *NS1* e *NSs* nos vetores de clonagem e transferência

Reações em cadeia da polimerase foram feitas a partir de plasmídeos que continham as ORF's dos respectivos genes. O gene *NSs* de TSWV foi amplificado a partir do vetor binário pgR107, recombinante de PVX de *Agrobacterium tumefaciens* (LOVATO et al., 2008). O gene *AC2* foi amplificado de um clone do DNA A do isolado DF-M7 de ToSRV (Franco *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2009) – cedido gentilmente pela Dra Alice Inoue-Nagata, Embrapa Hortaliças. *NS1* de *Influenza A* foi amplificado a partir de um plasmídeo pBluescript SK (+) (Stratagene La Jolla, CA, USA) – cedido gentilmente pelo Prof Dr Tatsuya Nagata, Universidade de Brasília.

PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (Integrated DNA Technologies, Inc., Illinois, USA) (Tabela 2.1), foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo: 400µM de dNTP; 2,5 µl da solução tampão 1 X; 2,5mM de MgCl₂; 1,25U de *Taq* Polimerase Platinum® High Fidelity (Invitrogen, Ca, USA); 200 nM do oligonucleotídeo F/R; 10 a 20ng/µL de DNA; e, água Milli-Q. Os ciclos para as reações de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, uma etapa de anelamento a 50°C, para *AC2* e *NS1*, e 55°C, para *NSs*, por 1 min e uma etapa de extensão a 72°C por 1 min. Após 29 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 min. As reações de amplificação, realizadas em termociclador Gene Amp 2400 (Applied Biosystems), permitiram a obtenção de fragmentos de DNA em torno de 1.404pb do gene *NSs*, 1.021pb do gene *NS1* e 404pb do gene *AC2* (Fig. 2.1). Esses produtos foram eluídos e purificados do gel de agarose, utilizando-se o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences).

Para todos os experimentos de clonagem, o tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com os marcadores moleculares de 1kb DNA ladder (Promega), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder e Lambda DNA/PstI Marker (Fermentas, Life Sciences, Inc. CANADA). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação (Eagle Eye, Stratagene).

Os fragmentos purificados foram clonados em pGEMT-Easy, usando *Escherichia coli* DH5α, de acordo com instruções do fabricante (Promega). O DNA dos plasmídeos recombinantes pGemAC2-1, pGemNS1-1 e pGemNSs-1 foram purificados (Sambrook *et al.*, 2000) e digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Fig. 2.2). Os fragmentos de DNA foram,

então, clonados no vetor de expressão viral pFastBac™1 (Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems, Invitrogen), sob o controle do promotor do gene da poliedrina (*polh*), no sítio de restrição *EcoRI*, de acordo com instruções do fabricante.

Os produtos de amplificação e digestão foram separados em gel de agarose a 1,0% (com exceção dos produtos gerados pelo gene AC2, os quais foram separados em gel a 1,2%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE 0,5X (Tris Borato 90,0mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) a 80 V (Fig. 2.1 e 2.2).

Os plasmídeos recombinantes pFastAC2, pFastNS1 e pFastNSs foram confirmados por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 2.1), bem como por ensaios de digestão (Fig. 2.3).

2.3 Obtenção dos vírus recombinantes

Os plasmídeos pFastAC2, pFastNS1 e pFastNSs foram transformados em células DH10Bac™ (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante.

Os bacmídeos recombinantes nomeados BacAC2, BacNS1 e BacNSs foram confirmados por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse* do bacmídeo (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') e AC2/R, NS1/F e NSs/F (Tabela 2.1) para os genes clonados, seguindo o mesmo ciclo de amplificação descrito acima. A temperatura de anelamento utilizada para as reações foi de 56°C para amplificar BacNS1 e BacNSs e 57 °C para amplificar BacAC2 (Fig. 2.4). O DNA dos bacmídeos recombinantes foi transfectado nas células de inseto *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4), usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA), como descrito em O'Reilly *et al.* (1992).

O sobrenadante das células transfectadas (7 dias após a transfecção) foi usado para identificação dos vírus recombinantes vAcAC2, vAcNS1 e vAcNSs via PCR, com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 2.1) para identificação da presença do gene heterólogo no DNA viral. Para tanto, as células infectadas de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) 48 h.p.i foram coletadas, centrifugadas (2.000 g por 4 min) e o sobrenadante coletado. O DNA viral foi extraído com tampão de lise salina (0,4 M NaCl 10 mM, Tris-HCl pH 8,0 e EDTA pH 8,0 2 mM), seguindo protocolo de Aljanabi e Martinez (1997). Efetuada a extração, o *pellet* foi ressuspenso

em 20 µl de H₂O milli-Q. As reações de amplificação, os reagentes, as quantidades de reagentes e os ciclos foram os mesmos descritos para a amplificação dos genes a partir dos plasmídeos de origem. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose e visualizados como descrito acima para os produtos de amplificação e digestão (Fig. 2.5).

O nome dos vírus recombinantes com as iniciais Ac é em função de que eles são derivados de um genoma viral de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), presente no bacmídeo pFastBac™1.

2.4 Linhagem celular e propagação dos vírus recombinantes

Células BTI-Tn5B1-4 (Granados *et al.* 1994) foram mantidas a 27° C em meio TC-100 (Gibco-BRL), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, e usadas para a propagação dos vírus AcMNPV, vAcAc2, vAcNS1 e vAcNSs, de acordo com o protocolo descrito em O'Reilly *et al.* (1992.).

BVs em uma concentração de 10⁷ p.f.u./ml⁻¹ foram usados para os ensaios preliminares.

2.5 Insetos

Para a análise da virulência dos recombinantes, foram utilizadas larvas de *Spodoptera frugiperda*, no 3° estágio de desenvolvimento, obtidas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). Essas populações foram mantidas em uma dieta artificial, segundo os procedimentos de Greene *et al.* (1976).

2.6 Infecção viral e efeito citopático

Nesse experimento, analisou-se o efeito citopático dos vírus recombinantes construídos bem como o efeito das proteínas recombinantes co-infectadas com o vírus selvagem AcMNPV. Para tanto, células BTI-Tn5B-1-4 foram sedimentadas em placas de 35 mm numa densidade de 1 × 10⁶/placa e infectadas com vAcAc2, vAcNS1 e vAcNSs numa multiplicidade de infecção

(m.o.i.) de 20 unidades de infecção (IU) por célula. Para os ensaios de co-infecção, o m.o.i. foi de 10 unidades de infecção (IU) para cada vírus. A 48 h e 96 h p.i. pós-infecção, as células infectadas foram visualizadas e fotografadas em microscópio invertido (Axiovert 100, Zeiss).

2.7 Bioensaios preliminares – injeção intrahemocélica

Bioensaios preliminares foram feitos para avaliar a atividade bioinseticida dos três baculovírus recombinantes para larvas de *S. frugiperda*. As larvas foram infectadas (90 larvas/vírus) via intrahemocélica, com a ajuda de uma microseringa de insulina. 10µl do inóculo viral na dose de 10^7 p.f.u./ml⁻¹ /larva de cada vírus – vAcAc2, vAcNS1, vAcNSs e AcMNPV (selvagem) – foram usados. Os controles foram obtidos pela inoculação de 10µl de meio TC-100. Os insetos foram mantidos, individualmente, entre 24° e 28 °C, em copos plásticos, contendo dieta artificial (Greene *et al.*, 1976). As avaliações quanto à mortalidade das larvas foram realizadas diariamente até 120 h p.i. Os indivíduos que puparam foram considerados resistentes à infecção. As mortes atribuídas ao traumatismo (24 h p.i.) não foram consideradas. Os dados da mortalidade foram expressos em porcentagem em relação ao número total de lagartas infectadas.

3. Resultados

3.1 Amplificação e clonagem dos genes *AC2*, *NSI* e *NSs*, nos vetores de clonagem e transferência

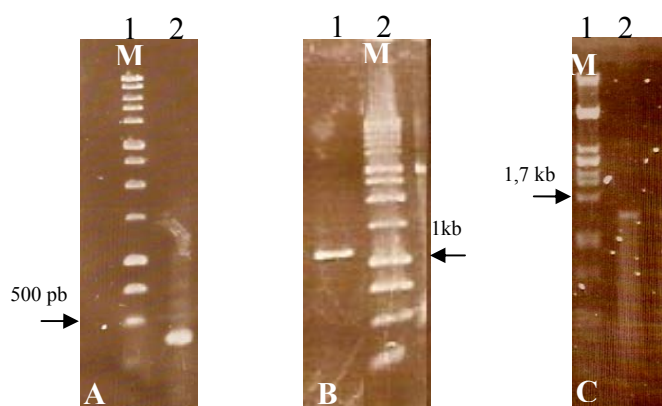


Figura 2.1: Produtos da amplificação dos genes *AC2*, *NSI* e *NSs* com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2.1), analisados pela eletroforese em gel de agarose. A. fragmento de DNA contendo o gene *AC2* de 404pb (poço 2) amplificado do DNA A do isolado DFM7 de ToSRV (Franco *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2009); B. fragmento de DNA contendo o gene *NSI* de Influenza de 1,021pb (poço 1) amplificado de um plasmídeo BlueScript KS + (Stratagene). C. fragmento de DNA contendo o gene *NSs* de TSWV de 1,404pb (poço 2) amplificado do vetor PVX pgR107 (Lovato *et al.*, 2008). M em A (poço 1) e B (poço 2), marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Promega); M em C (poço 1), lambda DNA/PstI Marker (Fermentas Life Science). As setas indicam os tamanhos (em pares de bases, pb ou pares de quilobases, kpb) de alguns fragmentos do DNA do marcador de massa molecular.

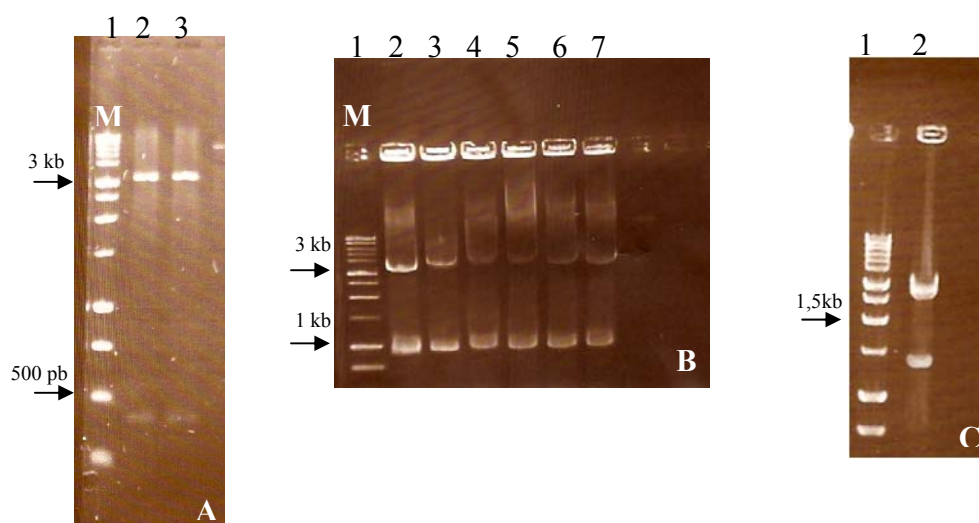


Figura 2.2: Confirmação da clonagem dos genes *AC2*, *NS1* e *NSs* no vetor de clonagem pGEM-Teasy. A, B e C, eletroforese em gel de agarose mostrando o perfil de restrição dos DNAs dos vetores de clonagem pGemAC2, pGemNS1 e pGemNSs com a enzima *EcoRI*. Em A, B e C, padrão esperado do vetor pGEMTeasy: 3.018pb (seta superior). A. DNA de dois clones do plasmídeo pGemAC2 mostrando um fragmento esperado de 404pb (poços 2 e 3); B. DNA de seis clones do plasmídeo pGemNS1 mostrando um fragmento esperado de 1.021pb (poços 2 a 7). C. DNA de um clone do plasmídeo pGemNSs mostrando um fragmento esperado de 1.404pb (poço 2). M (poço 1) em A, B e C, marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Promega). As setas indicam os tamanhos (em pares de bases, pb ou pares de quilobases, kpb) de alguns fragmentos do DNA do marcador de massa molecular.

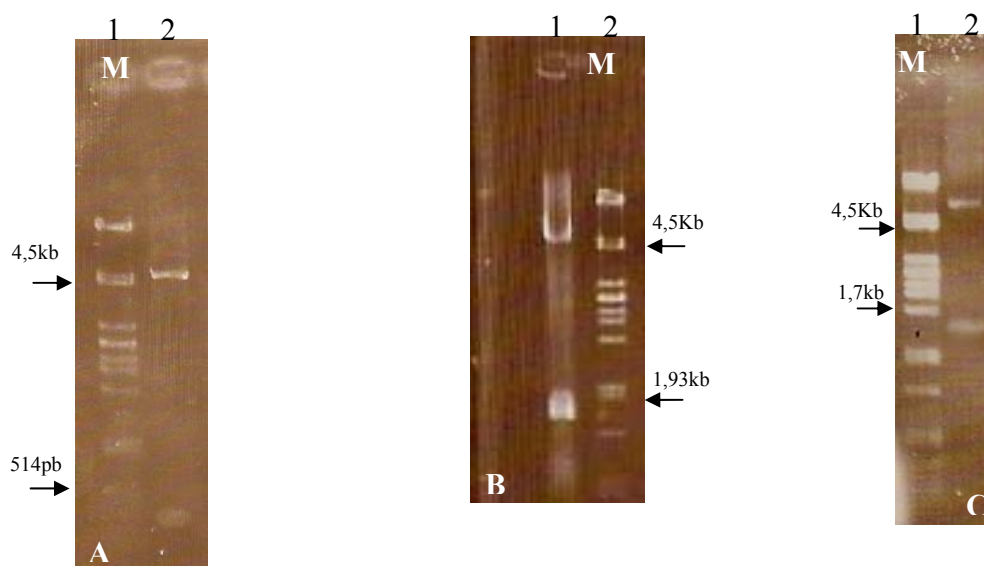


Figura. 2.3: Confirmação da clonagem dos genes *AC2*, *NSI* e *NSs* no vetor de transferência pFastBacTM1. Em A, B e C, eletroforese em gel de agarose mostrando o perfil de restrição dos DNAs dos vetores de transferência contendo, respectivamente, os genes *AC2*, *NSI* e *NSs*, digeridos com a enzima *EcoRI* (4,8kb). A. DNA de um clone do plasmídeo pFastAC2 mostrando um fragmento esperado de 404pb (poço 2); B. DNA de um clone do plasmídeo pFastNSI mostrando um fragmento esperado de 1.021pb (poço 1); C. DNA de um clone do plasmídeo pFastNSs mostrando um fragmento esperado de 1,404pb (poço 2). M, em A (poço 1), B (poço 2) e C (poço 1), lambda DNA/PstI Marker (Fermentas Life Science). As setas indicam os tamanhos (em pares de bases, pb ou pares de quilobases, kpb) de alguns fragmentos do DNA do marcador de massa molecular.

3.2 Obtenção dos baculovírus recombinantes

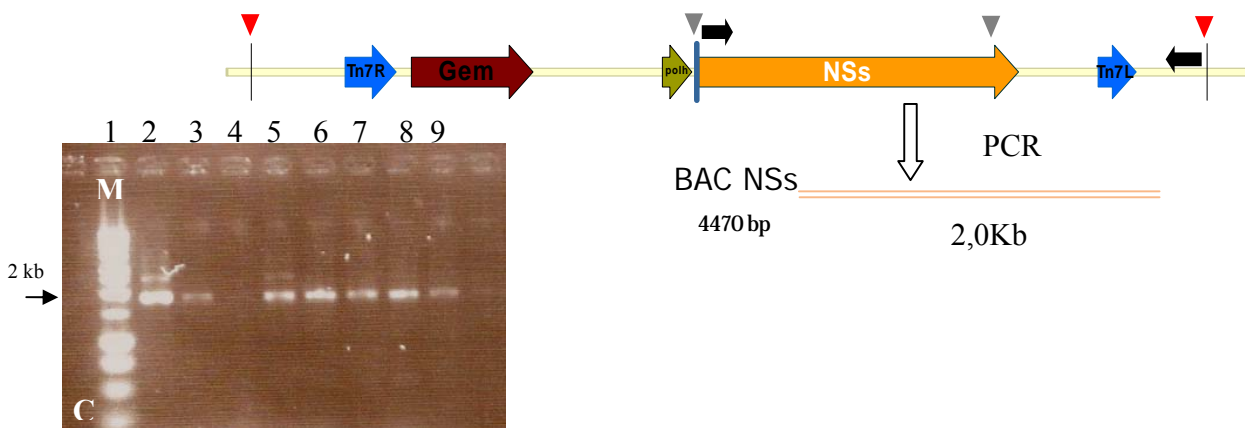
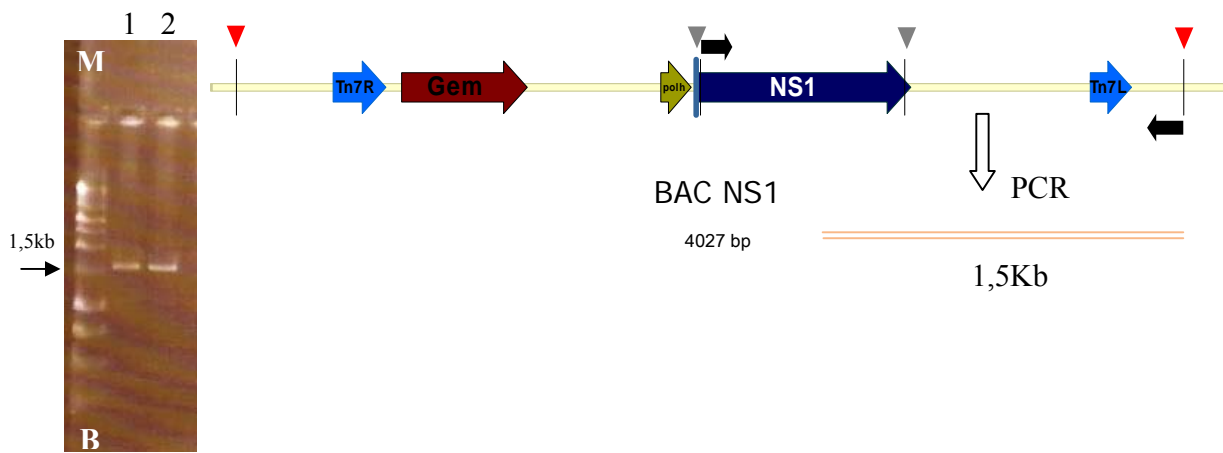
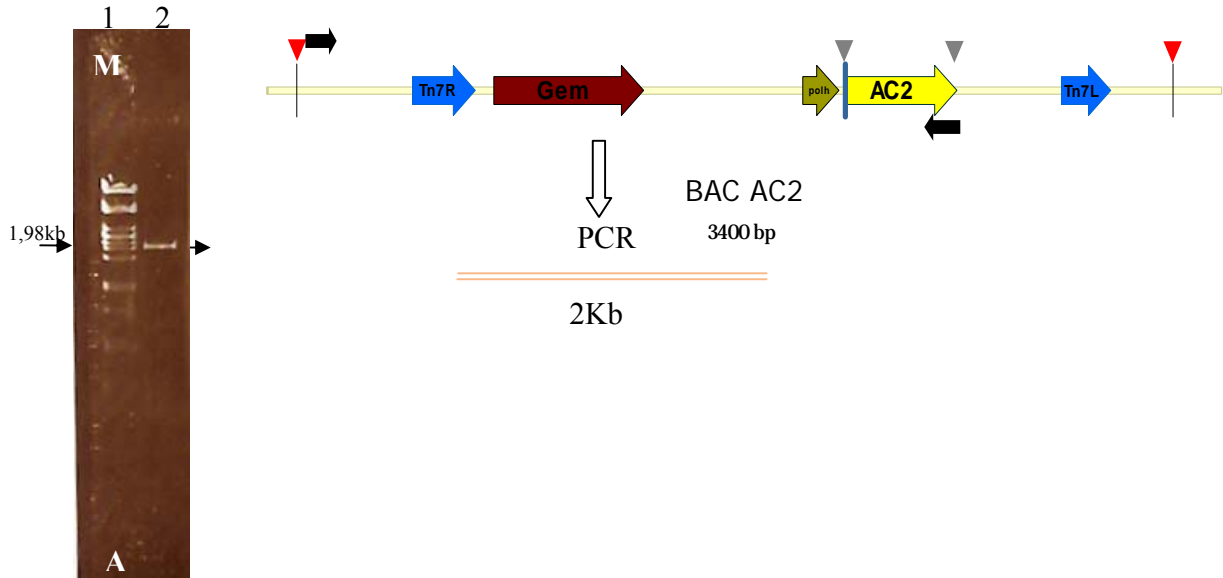


Figura 2.4: Confirmação dos bacmídeos recombinantes BacAc2, BacNS1 e BacNSs por PCR e à direita, representação esquemática do fragmento amplificado, no genoma do bacmídeo, feita pelo programa Vector NTI (Invitrogen). A, B e C, eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA dos bacmídeos recombinantes contendo os genes AC2 (A), NS1 (B) e NSs (C). Os oligonucleotídeos M13/F e M13/R, que se anelam no DNA do bacmídeo, e os oligonucleotídeos específicos, AC2/R, NS1/F e NSs/F (Tabela 2.1), foram utilizados para a amplificação dos fragmentos. Poço M em A (poço 1), DNA do fago lambda digerido com *Pst*I (Fermentas Life Science); B (poço 2) e C (poço 1), marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Promega). Os fragmentos esperados de 2 kb (poço 2 em A), 1,5kb (poço 1 e 2 em B) e 2kb (poços 2 a 9 em C) foram amplificados a partir do DNA de bacmídeos recombinantes.

*Os esquemas mostram os bacmídeos recombinantes com a presença da região que foi transposta pelo plasmídeo doador, o vetor de transferência pFastBacTM1, contendo os genes heterólogos AC2, NS1 e NSs. O sítio de transposição é composto por mini elementos Tn7 (Tn7R e Tn7L, setas azuis) – que permitem a transposição sítio-específica do gene de interesse no genoma do baculovírus –, pelo gene de resistência à gentamicina (seta marron) – que permite a seleção do bacmídeo recombinante em *E. coli* DH10BacTM – e pelo promotor da poliedrina *ppolh* (seta verde). Triângulos vermelhos indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos M13F e M13R no genoma do bacmídeo. Triângulos cinzas indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos específicos AC2F/R, NS1F/R e NSsF/R, nos respectivos genes. As setas pretas flanqueiam a região que foi amplificada nos bacmídeos recombinantes, utilizando os oligonucleotídeos específicos AC2F, NS1F, NSsF e M13R.

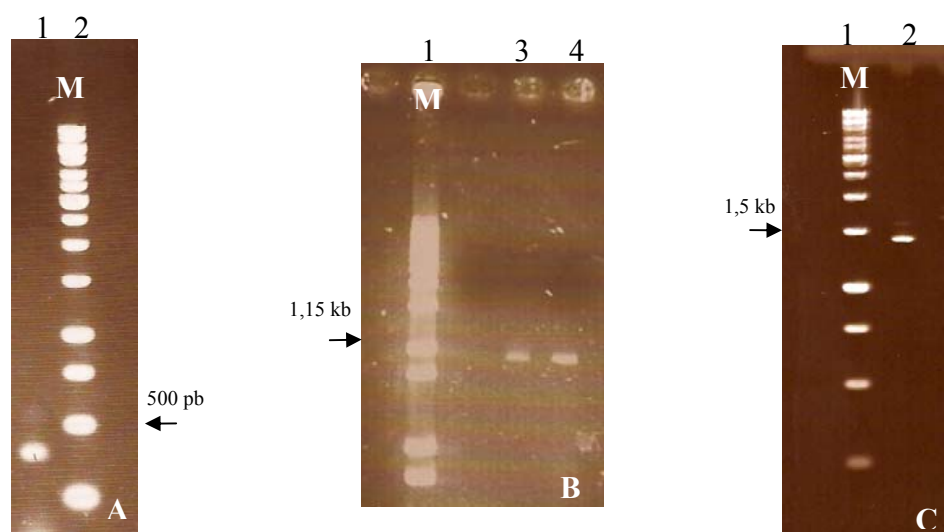


Figura 2.5: Confirmação da presença dos genes AC2, NS1 e NSs no genoma dos baculovírus recombinantes. Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 2.1) para cada gene, a partir do DNA dos baculovírus recombinantes vAcAC2 (A), vAcNS1 (B), vAcNSs (C). Os fragmentos esperados foram encontrados: 404pb (poço 1 em A), 1.021pb (poços 3 e 4 em B) e 1.404pb (poço 2 em C). M em A (poço 2) e C (poço 1), GeneRuler 1 kb DNA Ladder. M em B (poço 1), DNA do fago lambda digerido com a a enzima *Pst*I (Fermentas Life Science). As setas indicam os tamanhos (em pares de bases, pb ou pares de quilobases, Kpb) de alguns fragmentos do DNA dos marcadores de massa molecular.

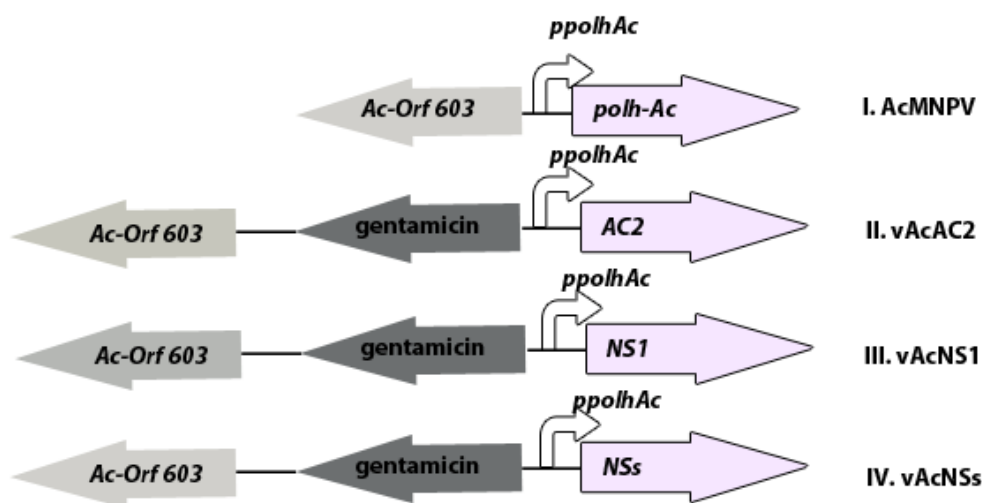


Fig. 2.6: Esquema mostrando o *locus* da poliedrina (*polh*) dos baculovírus selvagem e recombinantes. I, tipo selvagem AcMNPV. II, III e IV, recombinantes vAcAC2, vAcNS1 e vAcNSs, respectivamente. Os genes *AC2*, *NS1* e *NSs* estão sob o controle do promotor viral do gene da polyhedrina (*ppolh*). A posição do gene de resistência à gentamicina e do gene viral *Ac-orf603*, à esquerda do gene do *ppolh* em todos os vírus, é mostrada na figura.

3.3 Infecção viral e efeito citopático

Os três baculovírus recombinantes apresentaram efeitos citopáticos típicos de infecção por baculovírus nas células infectadas, como arredondamento celular e hipertrofia nuclear (Fig. 2.7). Essas células infectadas não apresentam poliedros porque os baculovírus recombinantes foram construídos com vetores de transferência baseados em pFastBacTM1. O DNA do vírus AcMNPV na forma de um plasmídeo (bacmídeo), em *E. coli* (células DH10-Bac), possui o gene *Lac-Z* no lugar do gene da poliedrina selvagem. O gene heterólogo, então, ao ser transposto do vetor de transferência para o genoma do bacmídeo, interrompe a ORF do gene *Lac-Z* (Fig. 2.4 e 2.6).

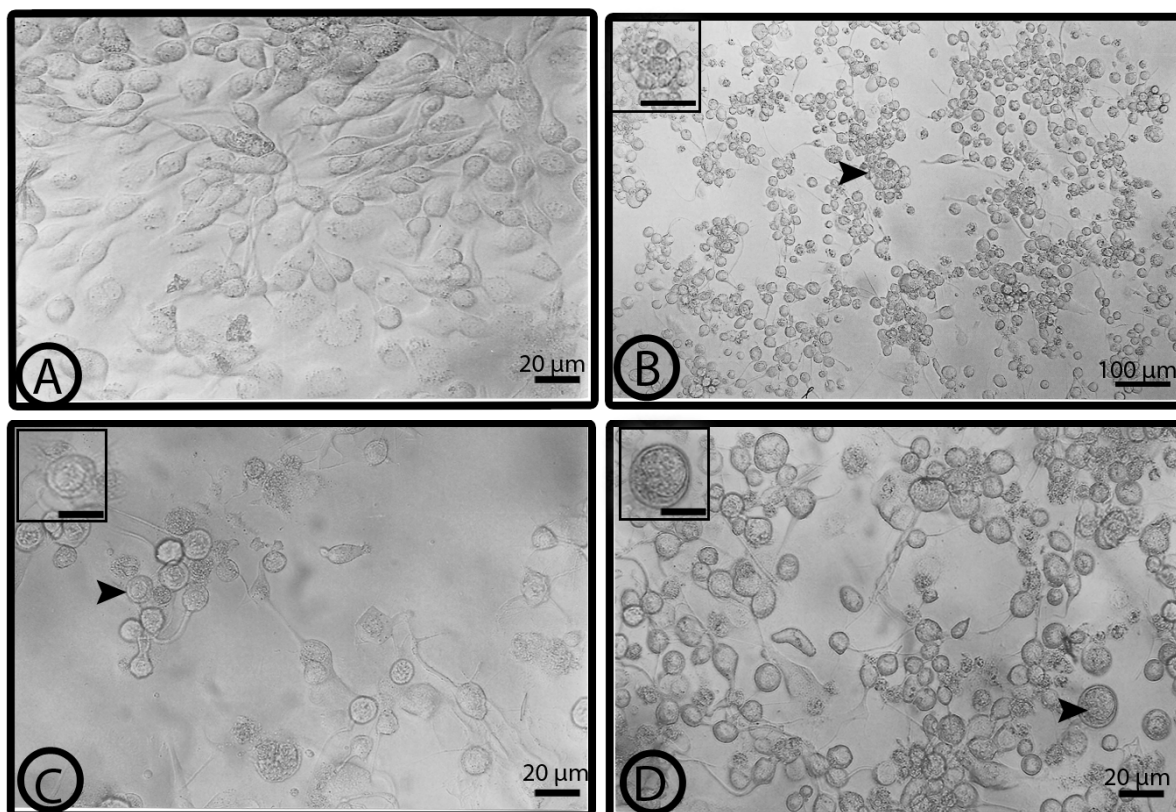


Figura 2.7: Análise microscópica do efeito citopático dos baculovírus recombinantes vAcAC2 (B), vAcNS1 (C) e vAcNSs (D) 48 h p.i. A, células BTI-Tn-5B-1-4 não infectadas. Em B, C e D, setas mostram células BTI-Tn-5B-1-4 permissivas arredondadas e com o núcleo hipertrofiado.

Nos ensaios de co-infecção com os recombinantes vAcAC2, vAcNS1 e vAcNSs e com o baculovírus selvagem AcMNPV, o vAcNSs mostrou ter maior influência na produção de poliedros nas células BTI-Tn5B-1-4. Houve um aumento do número de poliedros nessas células, quando comparado com a infecção apenas pelo selvagem (Fig. 2.8). Assim, dentre os três baculovírus recombinantes testados, concluiu-se que o vAcNSs permitiu uma maior expressão tardia do AcMNPV, sendo, pois, selecionado para os experimentos posteriores, descritos nos capítulos à seguir.

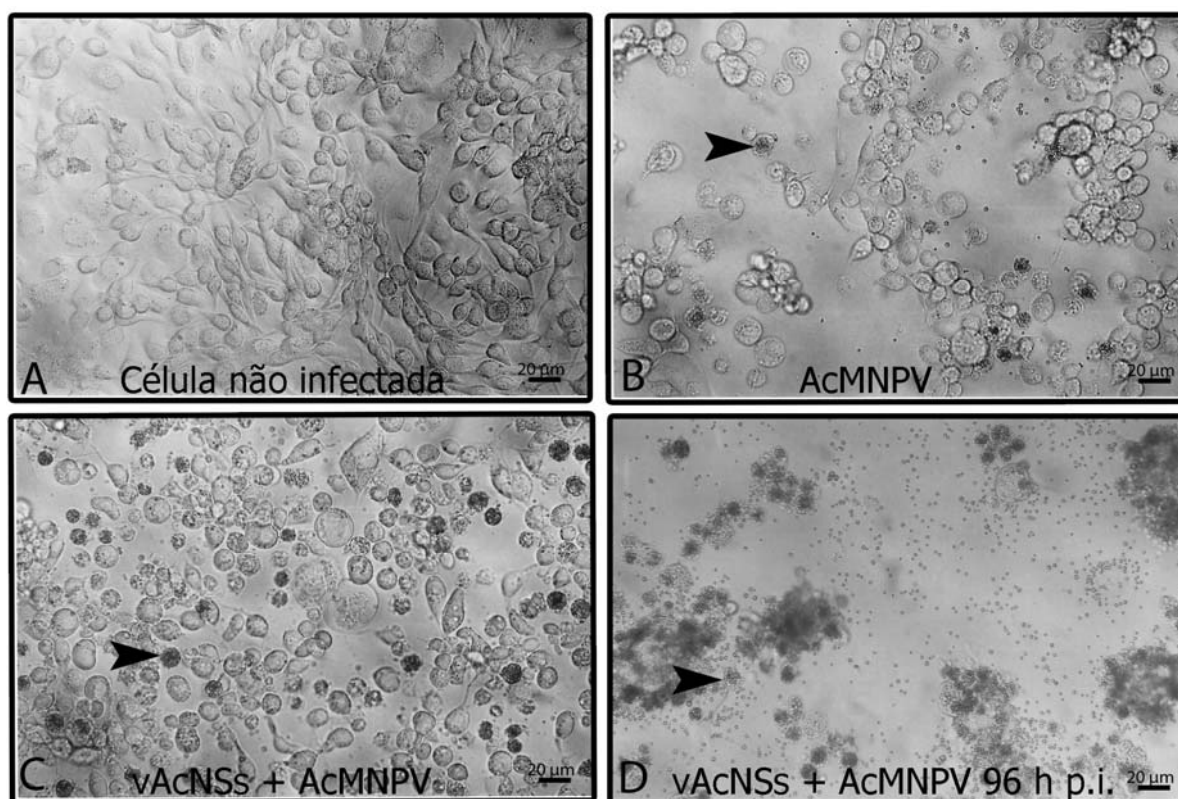


Figura 2.8: Efeito do baculovírus vAcNSs no aumento da produção de poliedros (PIBs) do baculovírus selvagem AcMNPV na célula BTI-Tn-5B-1-4. A. micrografia de luz de célula não-infectada. B. célula infectada com o baculovírus selvagem AcMNPV 48 h p.i.. C e D, célula co-infectada com AcMNPV e vAcNSs, 48 h p.i. (C) e 96 h p.i. (D). Setas indicam os poliedros (corpos de oclusão) produzidos.

3.4 Bioensaios preliminares

Nos bioensaios preliminares, os três baculovírus recombinantes expressando os supressores de silenciamento gênico se mostraram promissores quanto à atividade bioinseticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. Os resultados, no período avaliado de 120 h pós-infecção, em ordem crescente de porcentagem de mortalidade de larvas de *S. frugiperda* em relação ao total de larvas infectadas foram: vAcAC2, 58%; vAcNS1, 70%; e, vAcNSs, 80%. O baculovírus selvagem AcMNPV apresentou 60% de mortalidade de larvas infectadas.

4. Discussão

Após a realização dos testes preliminares, o baculovírus recombinante que expressa a proteína supressora do silenciamento gênico NSs de TSWV foi o que mais se destacou em relação à extensão dos efeitos citopáticos observados *in vitro*. Nos testes, observou-se que esse baculovírus parece influenciar na expressão tardia ou na replicação do baculovírus selvagem, uma vez que houve um aumento no número de poliedros na célula quando o vAcNSs foi co-infectado com o baculovírus selvagem (Fig. 2.8).

Baseando-se na expressão *late* da NSs em células BHK21 de camundongo, Simons *et al.* (1992) sugeriram que essa proteína pode estar envolvida na replicação de Uukuniemivirus (UUK), um flebovírus. Nagata *et al.* (1997), comparando a infecção por TSWV em culturas de células de duas espécies de tripes, *Frankliniella occidentalis* e *Thrips tabaci*, relataram que a NSs, e não a N do nucleocapsídeo viral, foi a proteína responsável pela replicação eficiente do genoma viral nessas células. Anos depois, a NSs-TSWV foi relatada como supressora de silenciamento gênico, em células de *Nicotiana benthamiana* (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003).

As funções já estudadas da proteína NSs de TSWV podem ter um papel similar em células de planta e de animal. Entretanto, o estabelecimento de linhagens celulares contínuas de tripes e de outras espécies de vetores para estudar as interações planta-vírus-vetor encontra dificuldades. Como alternativa, outras culturas de células de inseto podem ser exploradas para estudar essas interações no nível celular.

Portanto, o vAcNSs foi selecionado para os próximos experimentos, descritos nos capítulos a seguir, nos quais se avaliará o efeito da proteína NSs na virulência do baculovírus *in vitro* – utilizando-se três linhagens celulares de inseto – e *in vivo* – em larvas de *S. frugiperda* e de *A. gemmatilis*.

CAPÍTULO III

A PROTEÍNA SUPRESSORA DE SILENCIAMENTO GÊNICO DE UM TOSPOVÍRUS AUMENTA A REPLICAÇÃO DO BACULOVÍRUS EM LINHAGENS CELULARES DE INSETO PERMISSIVAS E SEMIPERMISSIVAS

RESUMO

A proteína não-estrutural NSs de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi identificada como supressora de RNAi em células de planta. Um recombinante derivado do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), denominado vAcNSs, contendo o gene NSs sob o controle do promotor viral do gene da poliedrina (*polh*), foi construído. O efeito da expressão da NSs em três linhagens celulares de inseto (uma permissiva, uma semipermissiva e outra não-permissiva), durante a infecção por vAcNSs, foi avaliado. Mostrou-se que o vAcNSs produziu mais vírus extracelular quando comparado ao selvagem, em célula permissiva e semipermissiva. Além disso, vAcNSs causou efeito citopático em uma linhagem celular não-permissiva, enquanto a infecção com o tipo selvagem AcMNPV não mostrou nenhuma alteração estrutural. A co-infecção das diferentes linhagens celulares com vAcNSs e com cada uma das três espécies (uma por vez) de baculovírus do tipo selvagem (AcMNPV, AgMNPV e BmNPV) aumentou claramente a produção de poliedros oriundos dos vírus selvagens em todas as células hospedeiras. Conforme análise de microscopia confocal, a NSs acumulou-se em abundância no citoplasma de células permissivas e semipermissivas. Em contraste, a NSs foi detectada no núcleo da célula não-permissiva. A co-infecção por vAcNSs com um AcMNPV recombinante que contém a proteína fluorescente verde (EGFP) aumentou fortemente a expressão de GFP na célula semipermissiva e em hemócitos de *Anticarsia gemmatalis*. A ausência de moléculas curtas de RNA (siRNAs) de transcritos de *egfp* nessa linhagem celular e em uma linhagem celular permissiva indica atividade de supressão do silenciamento gênico. Por outro lado, vAcNSs não suprimiu o RNAi na linhagem celular não-permissiva. Esses dados indicam que a proteína NSs de TSWV facilita a expressão gênica do baculovírus em diferentes linhagens celulares de inseto bem como que a NSs pode ter uma função similar durante a infecção por TSWV em seu inseto-vetor, o tripses.

ABSTRACT

The nonstructural protein (NSs) of The *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) has been identified as an RNAi suppressor in plant cells. A recombinant derived from *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) denominated vAcNSs, containing the NSs gene under the control of the viral polyhedrin (*polh*) gene promoter, was constructed and the expression effect of NSs in three different insect cells line (permissive, semipermissive and nonpermissive) during vAcNSs infection was evaluated. We showed that vAcNSs produced more budded virus when compared to wild type in permissive and semipermissive cells. Furthermore, vAcNSs caused cytopathic effects in a nonpermissive cell line whereas infection with wild type AcMNPV showed no cytopathic effects. Co-infection of different cell lines with vAcNSs and with each one of three wild type baculoviruses-species (AcMNPV, AgMNPV and BmNPV) (one for time) clearly enhanced wild types-polyhedra production in all host cells. Confocal microscopy analysis showed that NSs accumulated in abundance in the cytoplasm of permissive and semipermissive cells. In contrast, high amounts of NSs were detected in the nucleus of nonpermissive cells. Co-infection of vAcNSs with a recombinant AcMNPV containing the enhanced green fluorescent protein (EGFP), strongly increased GFP expression in semipermissive cells and in *Anticarsia gemmatalis*-hemocytes. Absence of small RNA molecules (siRNAs) of *egfp* transcripts in this cell line and in a permissive cell line indicates the suppression of gene silencing activity. On the other hand, vAcNSs was not able to suppress RNAi in a nonpermissive cell line. Our data supported that NSs protein of TSWV facilitates baculovirus gene expression in different insect cells lines, as well that NSs could play a similar role during TSWV-infection in its thrips vector.

1. Introdução

A replicação viral eficiente em células hospedeiras depende da capacidade do vírus de contornar os mecanismos celulares de defesa. Em estudos com baculovírus e seus hospedeiros, uma compreensão da relação entre a replicação viral e a patogênese e dos fatores que influenciam na especificidade de hospedeiro é essencial para a sua aplicação biotecnológica.

Sabe-se que o baculovírus é capaz de entrar em vários tipos celulares de vertebrados e invertebrados e não se replicar (Groener *et al.*, 1984; Volkman e Knudson, 1986). Porém, a transcrição de genes sob o controle de promotores *early* e *late* pode ocorrer em algumas dessas células (Rice e Miller, 1986; Woo *et al.* 2007), indicando que produtos gênicos eventualmente são expressos mesmo na ausência de replicação viral. Assim, a limitação da replicação viral em células não-permissivas de inseto ocorre posteriormente à sua entrada e talvez possa ser controlada ou influenciada por múltiplos fatores linhagem celulares-específicos (Miller e Lu, 1997).

O silenciamento de RNA nas plantas e o RNAi nos animais têm uma função bem conhecida como mecanismo de defesa antiviral (Lindbo e Dougherty, 1992; English *et al.*, 1996; Fire *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Em resposta a esse tipo de defesa do hospedeiro, os vírus, principalmente os de RNA, adquiriram proteínas supressoras para neutralizar o silenciamento de RNA em células de plantas (Carrington e Whitham, 1998; Li e Ding, 2001; Voinnet *et al.*, 1999) e de animais (Cullen, 2002; Gitlin *et al.*, 2002). Esses supressores têm como alvos componentes intermediários da via de silenciamento, cujo conhecimento, em suas especificidades, é imprescindível para a compreensão do mecanismo como um todo.

Assim como os genes NSs dos flebovírus e dos ortobuniavírus influenciam a infectividade de tais vírus para seus hospedeiros (Elliott, 1990; Vialat *et al.*, 2000; Bridgen *et al.*, 2001; Billecocq *et al.*, 2004; Le May *et al.*, 2004; Ikegami *et al.*, 2005; Blakqori *et al.*, 2007), especula-se que a NSs de TSWV, uma proteína supressora de silenciamento gênico (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2006), pode igualmente ter uma função importante durante a infecção do tripe por esse vírus, haja vista a acumulação elevada dessa proteína nas glândulas salivares do inseto-vetor (Wijkamp *et al.*, 1993).

Baseando-se nesse processo de regulação gênica e na ação da proteína NSs como supressora do silenciamento gênico, foi construído um baculovírus derivado do AcMNPV

contendo o gene não-estrutural NSs de TSWV em seu genoma. Neste trabalho, demonstrou-se que a infecção por esse recombinante (vAcNSs) – pela expressão heteróloga da proteína NSs de TSWV – e a sua co-infecção com outras espécies de baculovírus foram capazes de aumentar a eficiência de sua própria expressão gênica e a dos outros baculovírus, respectivamente. A capacidade de replicação também foi potencializada, principalmente na linhagem semipermissiva de *A. gemmatalis* (UFL-Ag-286). As possíveis funções da proteína NSs durante a infecção com baculovírus nas três linhagens celulares diferentes usadas serão discutidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Células e vírus

Três linhagens celulares derivadas de insetos lepidópteros foram usadas: BTI-Tn-5B1-4, de *T. ni* (Granados *et al.*, 1994); UFL-Ag-286, de *A. gemmatalis* (Sieburth e Maruniak, 1988), e BM-5, de *B. mori* (Grace, 1967).

As células BTI-Tn-5B1-4 e UFL-Ag-286 foram mantidas a 27 °C no meio TC-100 (Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Células de *B. mori* (BM-5) (fornecidas gentilmente por Maria Elita B. Castro, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil) foram mantidas a 27 °C no meio Grace's (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, NY), suplementado com 10% de soro bovino fetal (meio TNM-FH).

Os baculovírus recombinantes vAcNSs, vHSGFP (Clarke e Clem, 2002), vAcCry4Aa e vSynNSm (B. Ribeiro, não-publicado) e o tipo selvagem isolado L-1 de AcMNPV (Lee e Miller, 1978) foram propagados em células BTI-Tn-5B1-4 (O'Reilly *et al.*, 1992). O isolado 2D de AgMNPV (Johnson e Maruniak, 1989) foi propagado na célula UFL-AG-286. Um isolado de BmNPV-I-01 (fornecido gentilmente por Rosana M. C. Brancalhão, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brasil) foi obtido numa indústria têxtil brasileira a partir de lagartas *B. mori* infectadas e propagado em células BM-5 (Castro M. E., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil) (Fig. 3.1).

O vírus vHSGFP foi derivado do isolado AcMNPV L1 e tem o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (EGFP), que emite a luminescência quando irradiada luz UV, sob o controle do promotor constitutivo *hsp70* de *Drosophila melanogaster* (Clarke e Clem, 2002). O

vSynNSm foi derivado da recombinação homóloga entre o DNA do plasmídeo pSynXIVVI+X3 e o DNA do vSynVIgal (derivado de AcMNPV, Wang *et al.*, 1991) e tem o gene NSm de TSWV sob o controle de dois promotores em tandem (P_{syn} e P_{XIV}). O vAcCry4Aa recombinante possui o gene Cry4Aa de *Bacillus thuringiensis* sob o controle do promotor *polh*. Os estoques dos vírus foram titulados pelo método TCID₅₀ – *Tissue Culture Infectious Dose 50*, dose viral capaz de infectar 50% de uma cultura celular, seguindo o protocolo descrito por O'Reilly *et al.* (1992).

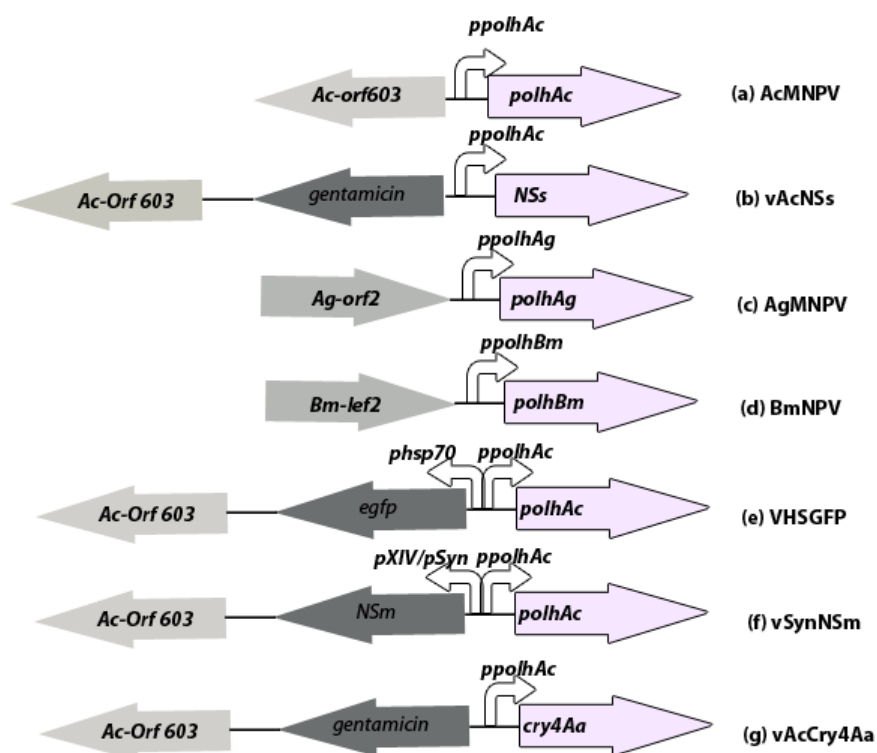


Figura 3.1: Esquema mostrando o locus da poliedrina (*polh*) nos diferentes baculovírus usados neste estudo. (a) Tipo selvagem AcMNPV. (b) Recombinante vAcNSs; esse vírus tem o gene *NSs*, sob o controle do promotor viral do gene da poliedrina (*ppolh*). (c) e (d) Tipos selvagens AgMNPV e BmNPV, que exibem o promotor do gene da poliedrina (*ppolh*) e o gene viral da poliedrina (*polh*), respectivamente. (e) Vírus repórter vHSGFP, que contém o gene *egfp* sob o controle do promotor *heat shock hsp70* de *Drosophila* e o gene *polhAc* e seu promotor *ppolhAc*. (f) Recombinante vSynNSm tem o gene *NSm* de TSWV sob o controle de dois promotores em tandem (p_{syn} and p_{XIV}). (g) Recombinante vAcCry4Aa; esse vírus tem o gene *Cry4Aa* de *B. thuringiensis* sob o controle do promotor *ppolh*. A posição do gene de resistência à

gentamicina e dos genes virais (*Ac-orf603*, *Ag-orf2* e *Bm-lef2*) à esquerda do gene *polh* é mostrada.

2.2 Insetos

Larvas de *A. gemmatalis*, no 3º estágio de desenvolvimento, obtidas da Embrapa Biotecnologia e Recursos Genéticos (Brasília-DF) foram utilizadas. Essas populações foram mantidas em uma dieta artificial, segundo os procedimentos de Greene *et al.* (1976).

2.3 Construção do baculovírus recombinante vAcNSs

Conforme procedimentos detalhadamente descritos nos itens 2.2 e 2.3 do capítulo anterior, o vAcNSs foi obtido. Nestes experimentos, o recombinante foi usado na infecção de uma linhagem celular permissiva (BTI-Tn-5B1-4), uma semipermissiva (UFL-Ag-286), outra não-permissiva (BM-5) e de larvas de *A. gemmatalis*, a fim de se monitorarem seus efeitos citopáticos e patogênicos.

2.4. Análise de Western-blot

A análise da expressão da proteína NSs, em células infectadas, e da proteína do envelope de AcMNPV, GP64, no sobrenadante viral, foi realizada através de Western-blot.

Na primeira análise, da expressão da NSs, as células BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram sedimentadas individualmente, em placas de cultura, à densidade de 4×10^6 células por 25 cm². Logo após, foram infectadas e co-infectadas à multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10 unidades infectivas (IU) por célula de cada vírus: AcMNPV, AgMNPV, BmNPV e vAcNSs. Depois, as células foram coletadas, 48 h p.i., por centrifugação a 5000 x g por 5 min, e os extratos celulares, analisados por meio de SDS-PAGE (12%) (Laemmli, 1970) e Western-blot.

Para a análise da expressão da GP64, as células BTI-Tn-5B1-4 e BM-5 foram sedimentadas e infectadas da mesma forma acima descrita. O sobrenadante viral foi coletado 48 h p.i.; as proteínas dos BVs, purificadas (O'Reilly *et al.* (1992); e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e à análise de Western-blot (SDS - PAGE 16%).

As proteínas celulares e as proteínas dos BVs foram separadas através do sistema Tetra Mini-PROTEAN (Bio-Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) por um Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Após o bloqueio com PBS 1x a 3% de leite desnatado, as membranas de nitrocelulose foram incubadas, por 1 h à temperatura ambiente, com anti-NSs, anticorpo policlonal (diluição 1:1000 em PBS 1 x, 0.5% de leite desnatado) feito em coelho, e com anti-GP64 (AcV5), anticorpo monoclonal (diluição 1:500 em PBS 1 x a 0.5% de leite desnatado) feito em camundongo. As IgGs anti-coelho e anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina foram usadas na detecção enzimática da NSs e da GP64, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Diagnostics).

2.5 Titulação de BVs (“Budded virus”)

As células BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram sedimentadas individualmente a uma densidade de 4×10^6 células por 25 cm^2 em placas de cultura e, logo após, inoculadas separadamente a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10 unidades infectivas (IU) por célula de cada vírus: AcMNPV, AgMNPV-2D, BmNPV e vAcNSs. Após o período de 1 h da adsorção viral, o inóculo residual foi removido, e as placas, lavadas duas vezes com meio de cultura sem o soro fetal bovino. O meio fresco foi adicionado e as células foram incubadas a 27°C . Células *mock* foram tratadas exatamente como as células infectadas, à exceção de que não houve inoculação por qualquer vírus. Após 48 h p.i., o sobrenadante foi coletado e usado para titulação pelo método TCID_{50} , como descrito em O'Reilly *et al.* (1992). O experimento foi repetido três vezes, em três garrafas de cultura diferentes para cada vírus analisado. Após 7 dias p.i. sob condições normais de cultura, os efeitos citopáticos foram visualizados por um microscópio invertido (Axiovert 100, Zeiss), fotografados por uma câmera AxioCam, e as imagens, analisadas pelo software de AxionVision (Zeiss).

2.6 Efeito da proteína NSs na produção de corpos de oclusão (PIB) dos baculovírus tipo selvagem

Células BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram sedimentadas em uma densidade de célula de 4×10^6 por 25 cm^2 em placas de cultura. Após a sedimentação, foram infectadas separadamente com AcMNPV, AgMNPV-2D e BmNPV em m.o.i. de 10 ou co-infectadas com vAcNSs. Como controle, um recombinante derivado de AcMNPV contendo o gene *NSm* de TSWV sob o controle de dois promotores *very late*, P_{syn} e P_{XIV} , foi também co-infectado. A expressão da proteína NSm foi observada em células de inseto infectadas com vSynNSm (dado não-publicado Ribeiro, B.). As co-infecções foram feitas usando m.o.i. de 5 de cada vírus. Após 48 h p. i., as células foram coletadas, centrifugadas ($8000 \times g$ por 5 min) e ressuspendidas em $200 \mu\text{l}$ de tampão de lise celular (20 mmol.L^{-1} de Tris-HCl pH 7.5; 150 mmol.L^{-1} de NaCl; 1 mmol.L^{-1} de Na_2EDTA ; 1% de Triton; 1 mmol.L^{-1} de Glicerol). O número de poliedros (PIBs) produzidos foi determinado por mililitro de meio, usando-se um hemacitômetro e um microscópio invertido (Axiovert 100, Zeiss). As contagens foram fotografadas por uma câmera AxioCam e as imagens, analisadas pelo software AxionVision (Zeiss). A contagem foi repetida quatro vezes em quatro placas de cultura diferentes para cada vírus analisado.

2.7 Imunofluorescência e análise de microscopia confocal

A microscopia de imunofluorescência foi utilizada para localizar a proteína NSs em diferentes linhagens celulares de inseto. Para isso, células UFL-Ag-286, BTI-Tn-5B1-4 e BM-5 infectadas (em um m.o.i. de 10) e células não-infectadas foram cultivadas em placas de seis poços sobre lamínulas estéreis. Em 48 h p.i., as células foram coletadas e fixadas com 2% de paraformaldeído diluído em tampão PBS (140 mmol.L^{-1} de NaCl, 40 mmol.L^{-1} de KCl, 1 mmol.L^{-1} de H_2HPO_4 , $10,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KH_2PO_4) por 15 min. Depois da remoção do fixador, as células sobre as lamínulas foram solubilizadas com 0.5% de Triton X-100, diluído em PBS por 10 min e, então, lavadas duas vezes com PBS. As lamínulas foram bloqueadas por 1 h com 0.5% de BSA diluído em PBS e incubadas por 1 h com o anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-NSs, fornecido gentilmente pelo Dr. Richard Komerlink, Wageningen, Holanda), diluído 1:1.000

em PBS com 0.01% de BSA. Após a lavagem, as lamínulas foram incubadas por 1 h com IgG anti-coelho conjugada com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) na diluição de 1:500 em 0.5% de PBS.

Foram usados dois tipos de controles: uma linhagem celular infectada com o vírus vAcNSs, mas que não foi incubada com o anticorpo secundário, e células não-infectadas (*mock*) submetidas aos mesmos procedimentos.

Todas as células foram coradas por 5 min com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 0.1 µg/ml diluído em tampão PBS e lavadas por duas vezes. As lamínulas foram montadas para a visualização, sobre uma lâmina, usando uma solução *anti-fade* com 90% de glycerol, 10% de PBS e 0.1% de n-propil-galato. As lâminas foram visualizadas e fotografadas com um microscópio confocal SP-5 Leica, equipado com laser UV e Argônio/Kriptônio, e um sistema de espectrofotômetro com prisma que permite coletar dados nos comprimentos de onda de 488 e 594 nm. A lente objetiva utilizada foi a de 40 x, com óleo de imersão. O software LAS AF (Leica Microsystems CMS GmbH) foi usado para analisar as imagens de duas cores, calculando-se reconstruções tridimensionais por uma projeção vertical de 71 a 150 secções de 0.1 µm das células analisadas.

2.8 Expressão de EGFP em células de inseto infectadas por baculovirus

A expressão do gene repórter foi determinada em 12, 24 e 48 h p.i. nas linhagens celulares BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 e nos hemócitos (12, 24, 48 e 72 h p.i) de larvas de *A. gemmatalis*, para avaliar o efeito da proteína NSs na infecção do recombinante vHSGFP. As células foram sedimentadas em placas de seis poços (60 mm) a uma densidade de 1×10^6 /placa. Algumas dessas células foram infectadas apenas com vHSGFP; outras, co-infectadas com vAcNSs. Como AcMNPV não se replica na linhagem BM-5, o tipo selvagem BmNPV foi usado para a infecção e co-infecção nessas células. Como controle adicional, foi feita uma co-infecção com vHSGFP e um recombinante do AcMNPV contendo o gene da toxina cry4Aa de *B. thuringiensis* sob o controle do promotor *polh*. O vírus (vAcCry4Aa) foi caracterizado por Ribeiro B. (dados não-publicados), e a proteína cry4Aa, expressa em células de inseto. As infecções foram realizadas em m.o.i. de 10 para cada vírus; as co-infecções foram executadas

usando m.o.i. de 5 para cada vírus e a atividade de EGFP foi monitorada até três dias após a infecção. As células foram coletadas, sedimentadas ($8000\text{ g} \times 5\text{ min}$) e ressuspensas em $50\ \mu\text{l}$ de tampão paraformaldeído (PFA) (1% de NaOH 1 mol.L^{-1} , dissolvido em dH_2O e [PBS $1 \times$, NaCl 137 mmol.L^{-1} , PO_4 10 mmol.L^{-1} , KCl 2.7 mmol.L^{-1} , pH 7,4]). A fluorescência EGFP da amostra ($150\ \mu\text{l}$) foi analisada com o software MultiSET BD, em um citômetro de fluxo FACSCalibur, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences).

As medidas da expressão de EGFP em hemócitos infectados apenas com vHSGFP ou co-infectados com vAcNSs foram feitas a partir do sangramento das larvas. Nesses experimentos, larvas de *A. gemmatalis* foram infectadas por meio de uma microseringa, com $10\ \mu\text{l}$ do inóculo viral, entre o primeiro e terceiro segmento abdominal, diretamente na hemocele. A dose viral de $1.000\text{ p.f.u.ml}^{-1}$ foi usada para cada vírus. Em cada ensaio, 30 lagartas foram examinadas a 12, 24, 48 e 72 h.p.i. quanto à fluorescência de EGFP. As lagartas foram anestesiadas, em gelo, por 10 min antes da extração da hemolinfa, que foi coletada, cortando-se uma proleg anal, que permitiu que a lagarta sangrasse. $50\ \mu\text{l}$ de hemolinfa foram transferidos para o tampão de PFA, e a fluorescência de EGFP foi medida, como descrito acima para as linhagens celulares.

2.9 Ensaio de detecção de RNAi

Células BTI-TN-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5, sedimentadas em placas de seis poços (60 mm) à densidade de 1×10^6 /placa, foram infectadas separadamente com vHSGFP ou co-infectadas com vAcNSs. As infecções foram realizadas em m.o.i. de 10 para cada vírus, e co-infecções, m.o.i. de 5 para cada vírus. Em 48 h.p.i., as células foram coletadas ($8000 \times g\ 5\text{ min}$), e o RNA, isolado pela extração com Trizol (Invitrogen), como recomendado pelo fabricante. O RNA total foi analisado por eletroforese em gel desnaturante de agarose (EDTA 0.1 mol.L^{-1} , MOPS $10 \times$ [MOPS 0.2 mol.L^{-1} , NA_2Ac , 0.01 mol.L^{-1} , pH 5.5]), com 1% de formaldeído, H_2O 0.1% dietil pirocarbonato (DEPEC) e $1 \times$ Tris-borato-EDTA – TBE. O gel foi corado com brometo de etídeo ($0.5\ \mu\text{g/ml}^{-1}$) em TBE $1 \times$ e fotodocumentado para verificação da integridade do RNA. RNAs curtos (siRNAs) foram precipitados com polietilenoglicol a 5% e NaCl 0.5 mol.L^{-1} (Hamilton e Baulcombe, 1999), fracionados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) 16% e uréia a 7 mol.L^{-1}

e, logo após, transferidos para uma membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). Um oligonucleotídeo de 24 pb foi usado como marcador molecular na análise do gel de RNAi.

Os siRNAs foram hibridizados a 65°C com uma sonda de DNA amplificada por PCR, que corresponde ao gene *egfp*, cujo fragmento foi amplificado, tendo sido utilizado, para tanto, os pares dos oligonucleotídeos EGFPF – 5'CCATGGTGAGCAAGGGGGA3' – e EGFPR – 5'CCATGGGAATACTTGTAAGCTGG3' – em uma reação que continha 50 ng do DNA viral do genoma de vHSGFP com 2.5 mmol.L⁻¹ de digoxigenina-11-dUTP-peroxidase (Roche Diagnostics). A amplificação foi realizada com *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen) nas seguintes condições: uma etapa a 95 °C por 2 min; 29 ciclos (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min); e, uma última etapa de 72 °C por 5 min. As lavagens da reação de hibridização e pós-hibridização foram conduzidas seguindo o protocolo de Brasileiro e Carneiro (1998). Para a visualização da quimioluminescência foi utilizado o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Scientific Life Science). Typhoon 8600 imager (Molecular Dynamics) foi usado para a fotodocumentação.

3. Resultados

3.1 Replicação do baculovírus recombinante vAcNSs em diferentes linhagens de célula de inseto

Através do sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) foi gerado um baculovírus recombinante contendo o gene NSs de TSWV (Fig. 3.1b). A expressão da proteína NSs, sob o controle do gene promotor da poliedrina (*polh*), em células infectadas com vAcNSs foi mostrada em SDS-PAGE nas linhagens BTI-Tn-5B1-4 e UFL-Ag-286 (Fig. 3.2a). Na linhagem BM-5 infectada por vAcNSs não foi possível a identificação da expressão da proteína. Entretanto, pela imunodeteção com anticorpo policlonal anti-NSs, foi identificada uma banda de aproximadamente 52 kDa, correspondente à proteína NSs de TSWV, tanto em extratos de célula não-permissiva quanto nas linhagens permissiva e semipermissiva infectadas com vAcNSs (Fig. 3.2b).

As linhagens BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram infectadas com os diferentes baculovírus (Fig. 3.1), e o título viral, determinado a partir do sobrenadante de células de inseto infectadas, coletadas a 48 h p.i. Como mostrado na tabela 3.1, vAcNSs produziu mais BVs, principalmente na linhagem semipermissiva UFL-Ag-286, quando comparado aos tipos selvagens AcMNPV e AgMNPV. Esses resultados indicam que a expressão da NSs favorece a infecção de AcMNPV na célula UFL-Ag-286. Em 48 h.p.i., o vAcNSs, na linhagem semipermissiva UFL-AG-286, alcançou um título de 1.02×10^9 p.f.u./ml⁻¹, que representou um aumento de 500 vezes quando comparado ao tipo selvagem AcMNPV. Mesmo quando comparado à célula de UFL-Ag-286 infectada com AgMNPV, que é permissiva a esse vírus, os títulos do vAcNSs foram significativamente mais elevados. Embora AcMNPV não seja capaz de se replicar na célula BM-5, efeitos citopáticos causados pela infecção do vírus recombinante foram observados nessa linhagem celular não-permissiva (Fig. 3.4). As células de BM-5 infectadas com vAcNSs exibiram arredondamento, inchaço e expansão nuclear, similares às modificações citopáticas causadas por baculovírus (Fig. 3.4, painéis B e C). Por outro lado, a infecção nas células de BM-5 por AcMNPV não mostrou nenhum efeito citopático (Fig. 3.4, painel D), expondo morfologia idêntica às células não infectadas (Fig. 3.4, painel A).

O acúmulo da proteína viral do envelope, GP64, nas células BM-5, não-permissivas ao vírus AcMNPV, e BTI-Tn-5B1-4, permissiva, foi comparado por SDS-PAGE e análise de Western-blot (Fig. 3.3) 48 h p.i. No SDS-PAGE não foi detectada expressão da GP64 entre as bandas protéicas nas linhagens infectadas. Entretanto, por Western-blot com o anticorpo monoclonal anti-GP64, evidenciou-se uma banda de aproximadamente 64 kDa, correspondente à proteína GP64 nas duas linhagens analisadas. Isso foi um indicativo da expressão da GP64 na linhagem não-permissiva BM-5 infectada por vAcNSs e AcMNPV ou a presença de vírus extracelular derivado da infecção inicial. As linhagens permissivas aos vírus utilizados apresentaram um acúmulo maior dessa proteína nas células infectadas.

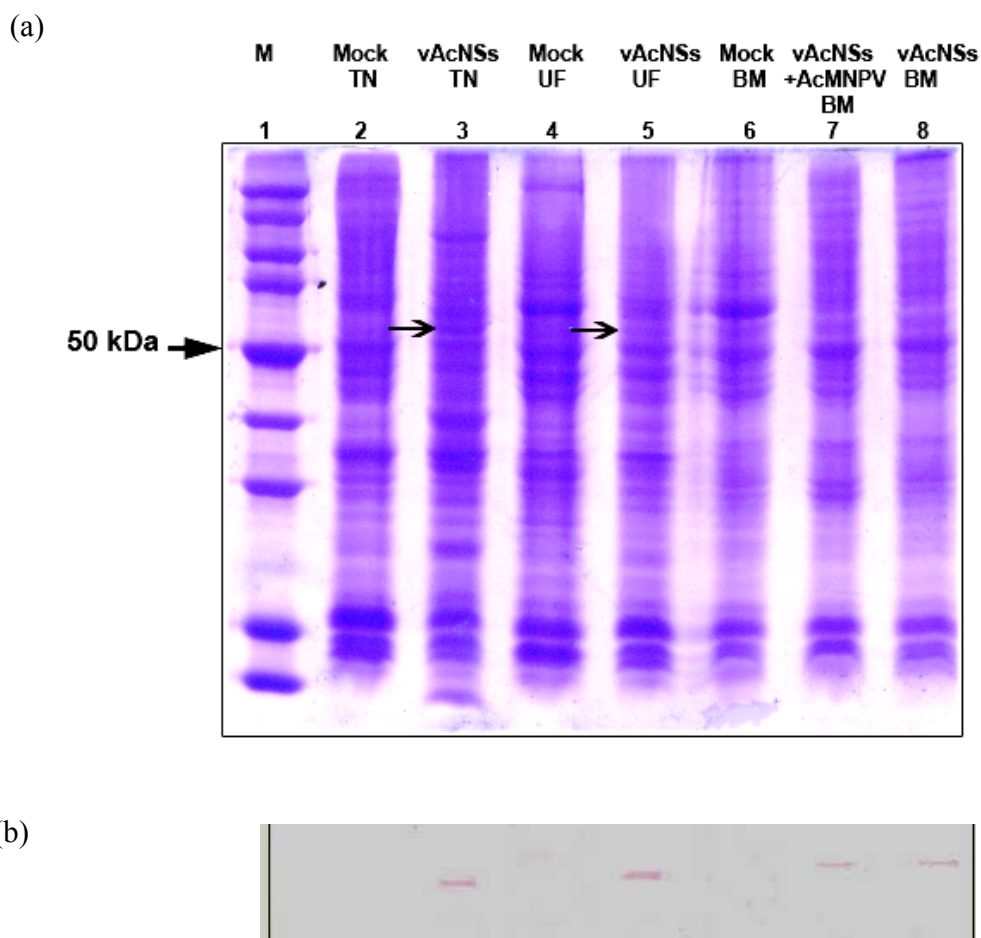


Fig. 3.2: Análise da expressão da proteína NSs em diferentes linhagens de células de inseto infectadas com o baculovírus vAcNSs. Gel de poliacrilamida-SDS (a) e análise de Western-blot (b) com anticorpo policlonal contra NSs em células BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 infectadas com o baculovírus recombinante vAcNSs ou co-infectadas (vAcNSs + AcMNPV), a 48 h p.i.. 1 – M: marcador de massa molecular broad range protein molecular (Biolabs). 2 – Célula *mock* (não-infectada) BTI-Tn-5B1-4; 3 – células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com vAcNSs; 4 – célula *mock* (não-infectada) UFL-Ag-286; 5 – células UFL-Ag-286 infectadas com vAcNSs; 6 – *mock* célula BM-5; 7 – células BM-5 co-infectadas com vAcNSs e AcMNPV; 8 – células BM-5 infectadas com vAcNSs. Setas indicam a presença da banda correspondente à proteína NSs em extratos de células BTI-Tn-5B1-4 e UFL-Ag-286 infectadas.

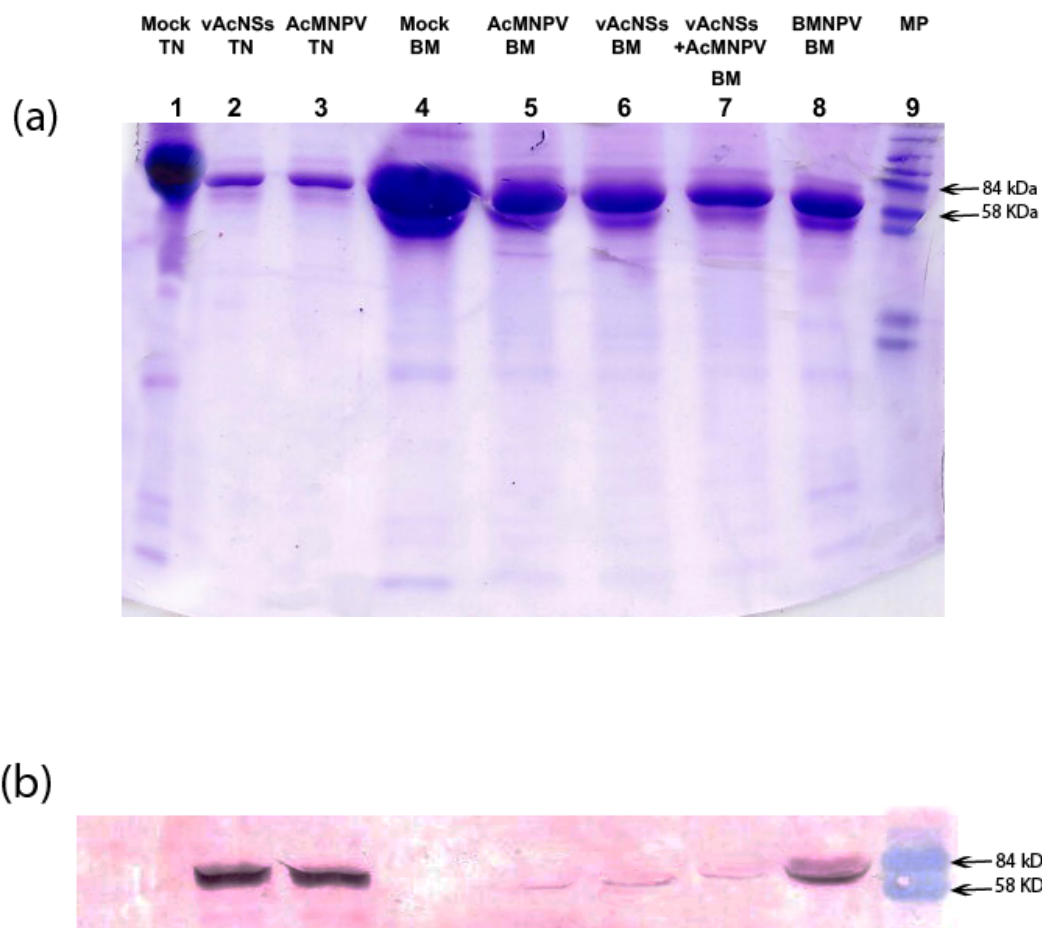


Fig. 3.3: Análise da presença de BVs no sobrenadante de diferentes células de inseto infectadas por diferentes baculovírus. Gel de poliacrilamida-SDS (a) e análise de Western-blot (b) com anticorpo monoclonal contra GP64, em células BTI-Tn-5B1-4 e BM-5 coletadas a 48 h p.i.. 1 – Célula *mock* (não-infectada) BTI-Tn-5B1-4; 2 – células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com vAcNSs; 3 – células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com AcMNPV; 4 – célula *mock* (não-infectada) BM-5; 5 – células BM-5 infectadas com AcMNPV; 6 – células BM-5 infectadas com vAcNSs; 7 – células BM-5 co-infectadas com vAcNSs e AcMNPV; 8 – células BM-5 infectadas com BmNPV; 9 – MP, marcador de proteína pré-corado Prestained Molecular Weight Marker (Sigma).

Tabela 3.1: Título viral (p.f.u./ml⁻¹) após a infecção por vAcNSs, AcMNPV e AgMNPV com m.o.i. de 10 para cada vírus a 48 h pós-infecção, em diferentes linhagens celulares de inseto.

Inóculo viral (m.o.i.: 10)	Linhagem celular ^b	Título (pfu/ml) ^a	± DP ^a
vAcNSs	BTI-Tn-5B1-4	8.06 x 10 ⁸	4.92 x 10 ⁸
	UFL-Ag-286	1.02 x 10 ⁹	1.14 x 10 ⁸
AcMNPV	BTI-Tn-5B1-4	2.63 x 10 ⁷	3.55 x 10 ⁶
	UFL-Ag-286	2.31 x 10 ⁶	2.21 x 10 ⁵
AgMNPV	BTI-Tn-5B1-4	4.29 x 10 ⁶	3.8 x 10 ⁶
	UFL-Ag-286	1.03 x 10 ⁸	8.34 x 10 ⁷

^a Os valores correspondem à média e ao desvio padrão para três repetições.

^b Replicação do baculovírus em três linhagens celulares de inseto. Os sobrenadantes das células infectadas foram usados para a titulação do vírus pelo método TCID₅₀/ml⁻¹. AcMNPV, *A. californica multiple nucleopolyhedrovirus*; AgMNPV, *A. gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*; vAcNSs, vírus recombinante derivado de AcMNPV que contém o gene NSs de TSWV sob o controle do promotor da poliedrina. A linhagem celular de inseto BTI-Tn-5B-1-4 é derivada de *T. ni* e UFL-Ag-286, é uma linhagem celular derivada de *A. gemmatalis*.

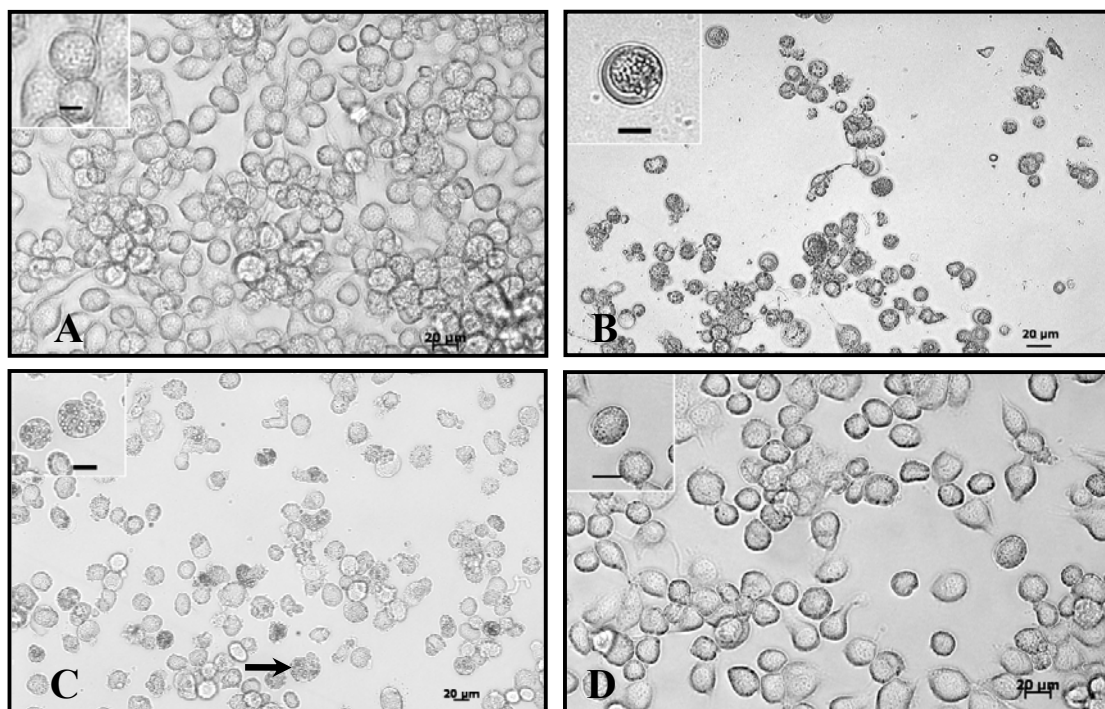


Figura 3.4: Análise morfológica de células BM-5 (não-permissivas) infectadas com diferentes baculovírus. A, células BM-5 não-infectadas. B, células BM-5 infectadas com vAcNSs (48 h p.i.). C, células BM-5 infectadas com BmNPV (48 h p.i.). D, células BM-5 infectadas com AcMNPV (48 h p.i.).

A seta indica célula com poliedros.

3.2 Produção de PIBs de baculovírus do tipo selvagem em células permissiva, semipermissiva e não-permissiva

Nesse experimento, infecções isoladas com os tipos selvagem AcMNPV, AgMNPV e BmNPV e co-infecções com o vírus recombinante vAcNSs em células hospedeiras permissivas foram analisadas, a fim de se determinar o efeito da NSs na produção de PIBs. Comparando com a concentração obtida na infecção apenas pelo vírus tipo selvagem, a proteína NSs aumentou significativamente a produção de PIBs em todas as células hospedeiras co-infectadas com um dos selvagens e o recombinante vAcNSs (Fig. 3.5). Esse aumento foi ainda mais notável na célula BM-5 quando o BmNPV foi co-infectado com vAcNSs. Na infecção somente com BmNPV, o número de poliedros na célula BM-5 foi 6.13×10^6 PIBs/ml⁻¹, aumentando para 4.61×10^7

PIBs/ml⁻¹ quando a célula foi co-infectada com vAcNSs (Fig. 3.5). Para a comparação, células BM-5 foram co-infectadas igualmente com BmNPV e um outro AcMNPV recombinante que expressa a proteína não-estrutural NSm de TSWV (vSynNSm). Nenhum aumento significativo na produção de poliedro foi observado (8.11×10^6 PIBs/ml⁻¹), na comparação com a infecção apenas por BmNPV. A co-infecção com o vírus AcMNPV e vAcNSs, em BTI-Tn-5B1-4 (3.07×10^7 PIBs/ml⁻¹), o número de PIBs duplicou em relação à infecção apenas com AcMNPV (1.47×10^7 PIBs/ml⁻¹). Similarmente, a co-infecção com vAcNSs e com o tipo selvagem AgMNPV produziu aproximadamente duas vezes (4.82×10^7 PIBs/ml⁻¹) o número de PIBs produzidos na infecção somente com o AgMNPV (1.95×10^7 PIBs/ml⁻¹) na célula UFL-Ag-286.

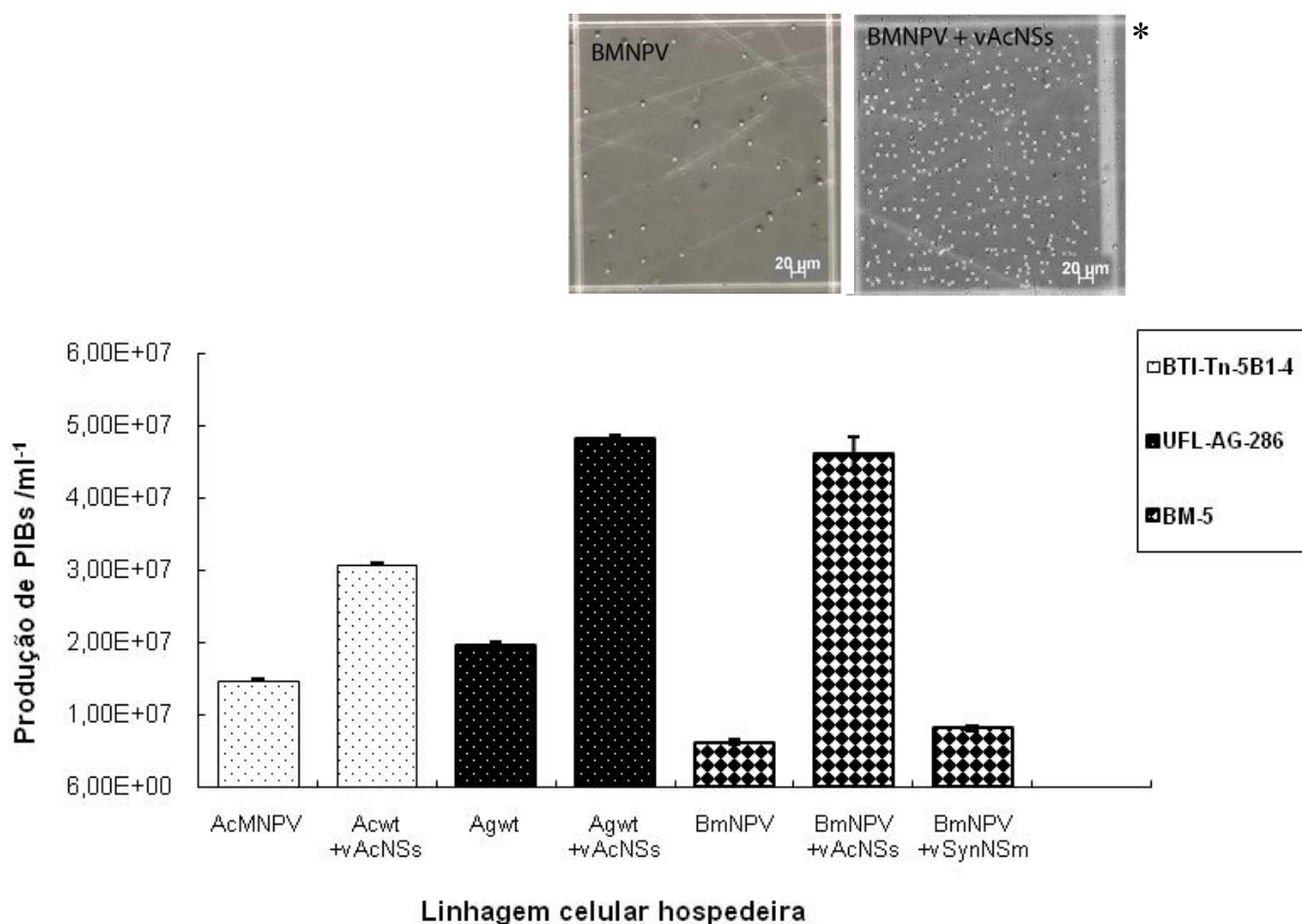


Figura 3.5: Produção de poliedros (PIBs) em três linhagens celulares de inseto infectadas com diferentes baculovírus. A proteína NSs de TSWV aumentou a produção de PIBs dos tipos selvagem AcMNPV, AgMNPV e BmNPV, em todas as linhagens celulares hospedeiras. Células BTI-Tn5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram infectadas

com AcMNPV, AgMNPV e BmNPV e co- infectadas com vAcNSs (um vírus ooc⁺) ou vSynNSm (um vírus ooc⁺) (em células BM-5). A formação de PIB foi monitorada por microscópio a 48 h p.i.

*Imagem da contagem de poliedros na linhagem BM-5 capturada pela câmera AxioCam e analisada pelo software AxionVision (Zeiss).

3.3 Localização da proteína NSs em células de inseto infectadas por baculovírus

A proteína NSs, expressa pelo recombinante vAcNSs, nas três linhagens celulares de inseto foi localizada por imunofluorescência. Células BTI-Tn-5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 foram cultivadas sobre lamínulas, infectadas com vAcNSs, coletadas 48 h pós infecção e incubadas com um anticorpo policlonal anti-NSs, produzido em coelho, e, posteriormente, com a IgG anti-coelho conjugada com o Alexa 594. A microscopia confocal mostrou que a NSs foi localizada em todas as linhagens celulares de inseto infectadas (Fig. 3.6a, b e c). Contudo, a proteína foi mais abundante no citoplasma das células BTI-Tn-5B1-4 (permissiva) e UFL-Ag-286 (semipermissiva) infectadas (Fig. 3.6d e f). Surpreendentemente, a NSs foi detectada predominantemente na região perinuclear da linhagem celular BM-5 (não-permissiva) infectada (Fig. 3.6h). Essas duas visualizações (da NSs no citoplasma e na região perinuclear) foram realizadas após a reconstrução tridimensional pelo software (Fig. 3.6d, f e h). A análise assim descrita foi feita para todas as linhagens celulares hospedeiras. As células de inseto do controle com e sem a presença do anticorpo secundário não mostraram fluorescência (Fig. 3.6e, g e i).

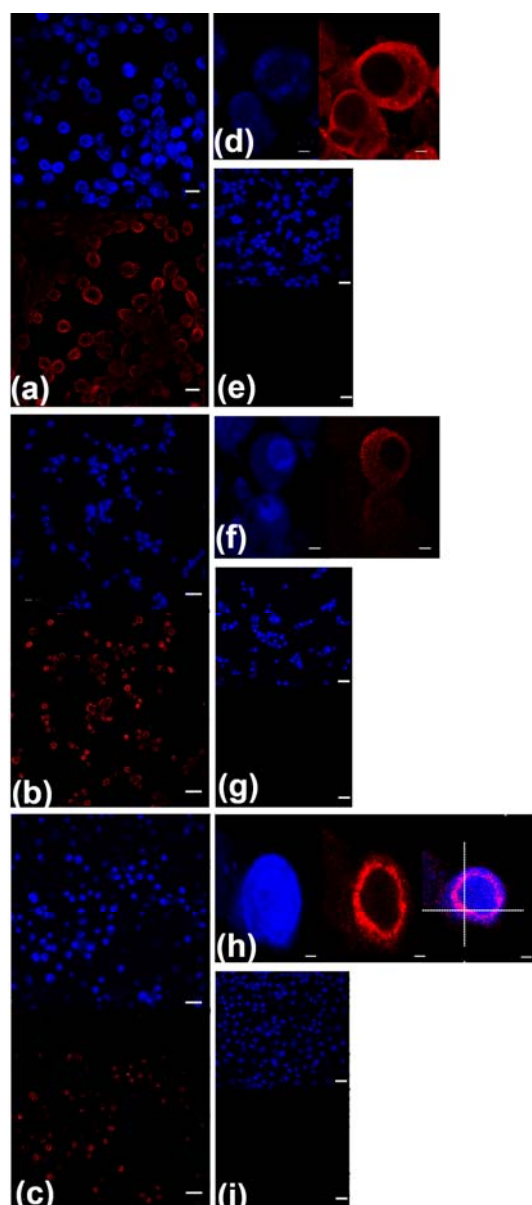


Figura 3.6: Localização da proteína recombinante NSs de TSWV, por imunofluorescência, no citoplasma e na região perinuclear de três linhagens celulares de inseto, detectada com anticorpo policlonal anti-NSs conjugado com Alexa 594 (vermelho), a 48 h p.i. Dapi cora o DNA no núcleo (azul). (a) BTI-Tn-5B-1-4, (b) UFL-Ag-286 e (c) BM-5. (d), (f) e (h) representam secções tridimensionais das células; nas células BTI-Tn-5B-1-4 (d) e UFL-Ag-286 (f), a localização da NSs foi predominantemente confirmada no citoplasma; na célula BM-5 (h), a NSs foi detectada principalmente na região perinuclear. (e) BTI-Tn-5B1-4, controle infectado, sem o anticorpo fluorescente anti-coelho. (g) UFL-Ag-286, controle não infectado, corado com o anticorpo primário e o anticorpo fluorescente anti-coelho. (i) controle da célula BM-5, infectado, sem o anticorpo primário. Barras da escala: (a) 20 μm . (b) e (c) 34 μm . (d) 2 μm . (f) 3 μm . (h) 2 μm . (e), (g) e (i) 31 μm .

3.4 Expressão de EGFP em células de inseto infectadas por baculovírus

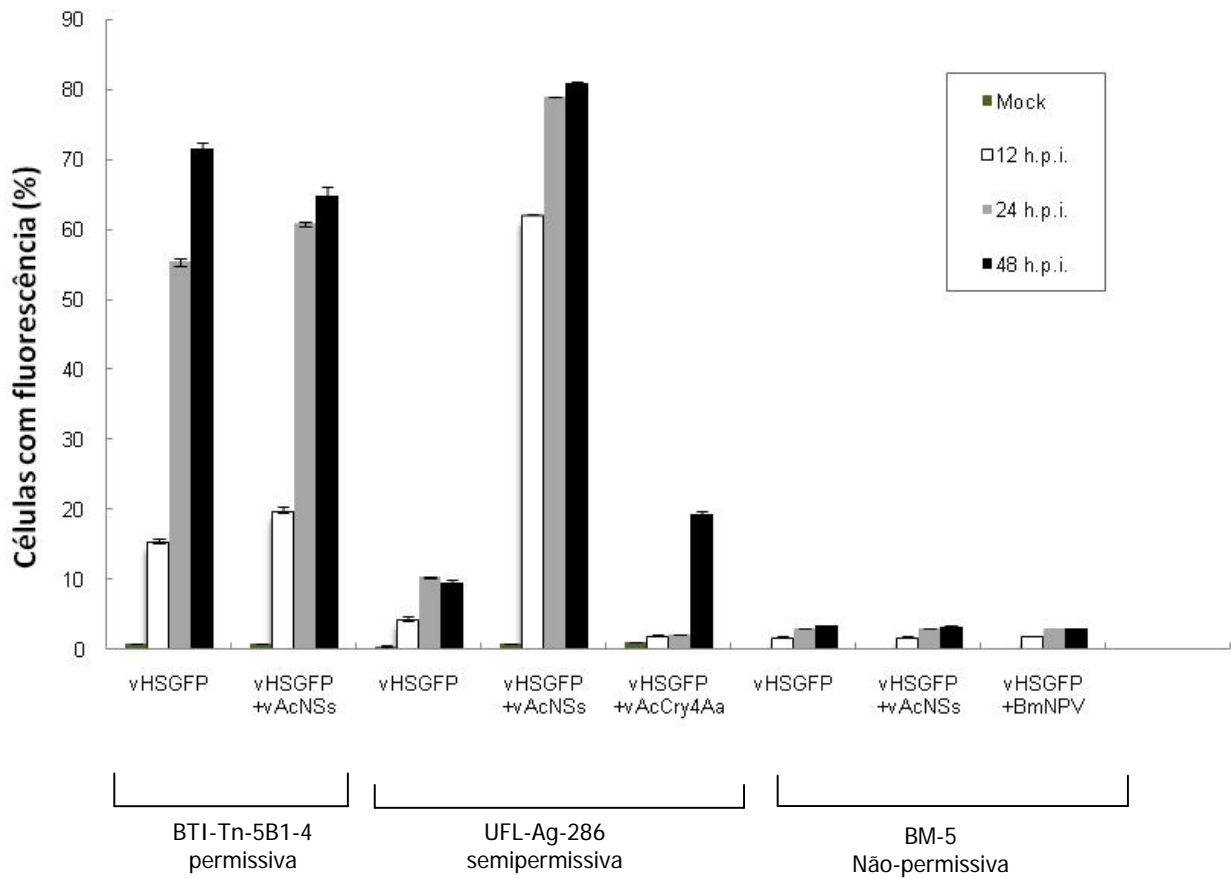
O vHSGFP recombinante (Fig. 3.1e) foi co-infectado com o vAcNSs para avaliar o efeito da NSs na infectividade do vírus em uma linhagem de célula permissiva, uma semipermissiva, outra não-permissiva e em hemócitos de larvas do terceiro ínstar de *A. gemmatalis*. Na linhagem celular não-permissiva BM-5, o vHSGFP foi co-infectado igualmente com o tipo selvagem BmNPV. Como AcMNPV não replica na célula BM-5, o tipo selvagem BmNPV foi usado para a infecção e co-infecção nesta célula. Para a comparação, um outro AcMNPV recombinante que carrega um gene da toxina cry4Aa de *B. thuringiensis* (vAcCry4Aa), sob o controle do promotor *polh*, foi também co-infectado com vHSGFP. A fluorescência de células e de hemócitos infectados foi monitorada, em diferentes horas pós infecção num citômetro de fluxo FACSCalibur.

Quando as células UFL-Ag-286 foram infectadas apenas por vHSGFP (Fig. 3.7a), somente 4.46%, 10.35% e 9.51% das células mostraram expressão de EGFP em 12, 24 e 48 h.p.i., respectivamente, indicando uma infecção limitada. Entretanto, quando as mesmas células foram co-infectadas com vHSGFP e vAcNSs, um aumento acentuado no número de células que expressaram EGFP foi observado, desde 12 (61.12%) até 48 h.p.i. (80.97%). A co-infecção por vHSGFP e vAcCry4Aa conduziu a somente 2.1% e 2.17% de expressão de EGFP em 12 e 24 h, respectivamente, e 19.41% em 48 h.p.i. Isso indica que o aumento na expressão de EGFP foi dependente da proteína NSs. Entretanto, esse alto nível de expressão de EGFP gerado por vAcNSs não foi observado nas células permissivas e não-permissivas. Resultado semelhante foi observado nos hemócitos de *A. gemmatalis* co-infectados por vHSGFP e vAcNSs (Fig. 3.7b). A porcentagem dos hemócitos infectados por vHSGFP que expressaram EGFP diminuiu de pouco mais de 15% em 12 h.p.i para 4.71% em 72 h.p.i., enquanto que, quando co-infectados com vAcNSs, a porcentagem de EGFP expressa aumentou de 15% em 12 h.p.i., para 25.79% em 72 h.p.i.

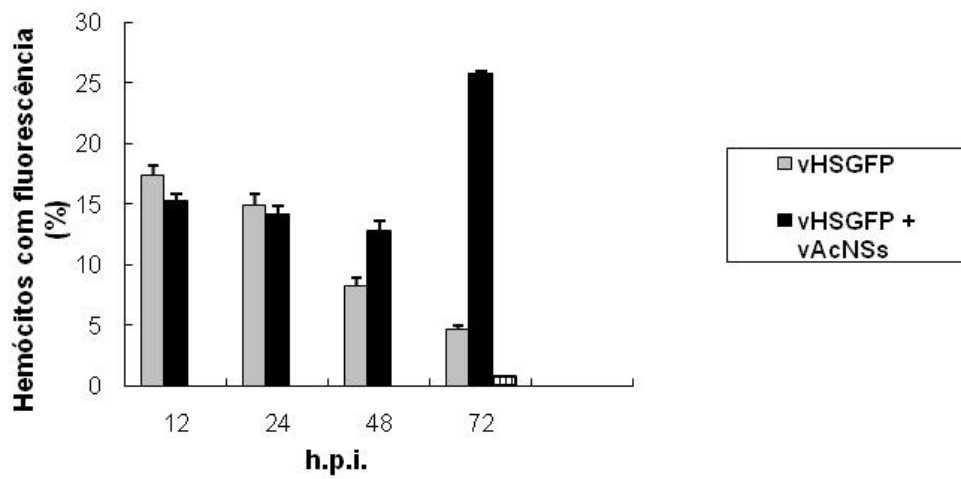
3.5 Detecção de RNAs curtos de interferência (siRNAs) em células de inseto infectadas por baculovírus

Para verificar a influência da proteína NSs em relação à formação de RNAs de interferência (siRNAs) em células permissiva, semipermissiva e não-permissiva, os vírus vHSGFP e vAcNSs foram co-infectados nas células BTI-Tn-5B1-4 (permissiva), UFL-Ag-286 (semipermissiva) e BM-5 (não-permissiva). Os siRNAs correspondentes ao gene *egfp* foram monitorados por Northern blot (Fig. 3.7c). As três linhagens celulares infectadas pelo vírus vHSGFP exibiram moléculas de siRNAs. Quando o vHSGFP foi co-infectado com vAcNSs, a formação de siRNAs foi inibida nas células BTI-Tn-5B1-4 e UFL-Ag-286. Entretanto, a presença desses fragmentos curtos de RNA na célula BM-5 foi observada nessa mesma co-infecção. Esses resultados indicam que a NSs de TSWV pode atuar como um supressor de silenciamento em células permissivas e semipermissivas, mas não são capazes de suprimir a maquinaria de RNAi em células não-permissivas de BM-5.

(a)



(b)



(c)

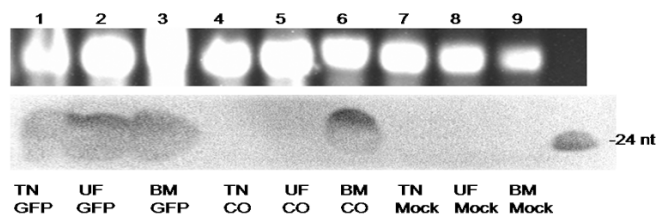


Figura 3.7. (a) Efeito da proteína NSs de TSWV em diferentes células de inseto e em hemócitos, na infecção por um vírus que contém *egfp*. As células de inseto (BTI-Tn5B1-4, UFL-Ag-286 e BM-5) foram, em parte dos experimentos, infectadas apenas por vHSGFP recombinante e, em outra parte, co-infectadas também por vAcNSs ou vAcCry4Aa (na célula UFL-Ag-286) ou BmNPV (na célula BM-5). Em 12, 24 e 48 h.p.i., as células foram coletadas e fixadas. **(b) Efeito da NSs de TSWV em hemócitos de *A. gemmatalis* na infecção por um vírus que contém *egfp*.** Uma população de larvas foi inoculada apenas com o vHSGFP e outra, co-infectada também com vAcNSs. 30 lagartas foram sacrificadas em 12, 24, 48 e 72 h.p.i. para a coleta da hemolinfa. A porcentagem de EGFP expressa em células e hemócitos foi detectada por um citômetro de fluxo FACSCalibur. Os valores médios e os desvios padrão (SD) de três experimentos independentes são mostrados. **(c) Análise de Northern blot de RNAs curtos de interferência (siRNA) isolados das células de inseto infectadas por vHSGFP.** Os siRNAs das células BTI-Tn-5B-1-4, UFL-Ag-286 e BM-5 infectadas apenas por vHSGFP (linhas 1, 2, 3) e co-infectadas por vAcNSs (linhas 4, 5, 6) e *mock* (controle não-infectado) (linhas 7, 8, 9) foram coletados 48 h p.i., analisados em gel desnaturante de poliacrilamida a 15% e, por último, hibridizados com uma sonda *egfp*-específica. O rRNA 18S foi usado como controle da integridade do RNA. A posição de uma seqüência de 24 (nt) é indicada.

4. Discussão

Nesse estudo foram fornecidas evidências, *in vitro* e *in vivo*, de que a proteína supressora de silenciamento NSs de TSWV aumentou a capacidade de replicação, expressão gênica e citopatogenicidade de baculovírus, nas diferentes linhagens celulares de inseto, permissiva (BTI-Tn-5B1-4), semipermissiva (UFL-Ag-286) e não-permissiva (BM-5) à infecção com AcMNPV.

Os vírus são dependentes de muitos eventos para infectar um hospedeiro. As etapas principais no ciclo de vida de um baculovírus são:

a) entrada na célula (Wang e Kelly, 1985);

- b) expressão viral *early* (Granados e Lawler, 1981; Volkman *et al.*, 1985; Crisholm e Henner, 1988; Billimoria, 1991), na qual há a expressão de genes requeridos para a síntese de DNA, condição prévia para a etapa posterior;
- c) *late*: replicação do DNA viral e transcrição dos genes *late*, que, por sua vez, codificam as proteínas virais estruturais (Fraser, 1986; Blissard e Rohrmann, 1990) necessárias para a montagem e liberação de vírus extra-celulares (BVs);
- d) *very late*: formação de corpos de oclusão (PIB) (Van Der Wilk *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1989; Rahman e Gopinathan, 2003).

Entretanto, todos esses eventos dependem da permissividade da célula à replicação viral; caso contrário, pode ocorrer apenas uma ou nenhuma das etapas. Foi relatado que o AcMNPV pode penetrar no núcleo de uma célula não-permissiva de inseto, mas não é capaz de se replicar (Carbonell e Miller 1987). Há indícios de que a expressão *late* do genoma viral parece ser determinante na especificação da gama de hospedeiros do AcMNPV (Kondo e Maeda, 1991).

Na célula UFL-Ag-286, semipermissiva, infectada com vAcNSs, quantidades mais elevadas de vírus extra-celulares (BVs) foram produzidas, quando comparadas com o tipo selvagem do baculovírus AgMNPV (Tabela 1). A diferença, na célula permissiva, de título entre a infecção com o selvagem AcMNPV e a com o vAcNSs foi bem mais discreta.

A proteína NSs codificada por vírus da família *Bunyaviridae* tem um papel crítico na virulência desse patógeno. Nas plantas, a quantidade dessa proteína foi associada com a severidade dos sintomas em *Nicotiana rustica*, infectada por TSWV (Kormelink *et al.*, 1991). Em ensaios de transfecção, utilizando sistemas de minigenomas de *Rift Valley fever virus* (RVFV) (Gênero: *Phlebovirus*) – febre do Vale do Rift –, a expressão da proteína NSs aumentou a replicação e a transcrição de RNAs do minigenoma viral, em célula de mamífero Vero E6, sugerindo ter um papel crítico na síntese de RNA de RVFV (Ikegami *et al.*, 2005).

O aumento da replicação viral observado, nos experimentos relatados nesta tese, na célula semipermissiva pode estar relacionado à supressão de silenciamento gênico, já que a proteína NSs possui essa função (Takeda *et al.*, 2002).

Diferentes trabalhos mostraram que a interferência na via de silenciamento gênico do hospedeiro permitiu a alguns vírus acumular títulos mais elevados durante a infecção (Franz *et al.*, 2006; Bouloy *et al.*, 2001; Lindbo e Dougherty, 1992; Pruss *et al.*, 1997; Ullman *et al.*, 1993; Billecocq *et al.*, 2004; Yokotaa *et al.* 2005; Ikegami *et al.*, 2005). Os baculovírus do grupo NPV

possuem genoma de DNA que replica no núcleo do hospedeiro e, geralmente, não estão expostos a mecanismos de defesa celular, como outros vírus que possuem genoma de RNA, replicam-se no citoplasma e podem ser degradados pelo silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Entretanto, os transcritos de genes oriundos do genoma extenso do baculovírus, envolve frequentemente, a síntese de múltiplos e sobrepostos RNAs, que podem ser senso e antisense (Friesen e Miller, 1986). Uma fração dessa classe de RNA pode ser alvo potencial no processo de silenciamento gênico do hospedeiro, durante a infecção por baculovírus. Assim, um baculovírus que expresse um supressor do silenciamento gênico pode possuir uma capacidade maior de produzir BVs na célula hospedeira.

Embora o recombinante vAcNSs fosse capaz de induzir efeitos citopáticos na linhagem BM-5 e, conseqüentemente, uma titulação detectável (dado não-mostrado) pela análise dos efeitos celulares causados (Fig. 3.2), não houve uma produção eficiente de BVs durante a infecção, como demonstrado posteriormente pela análise via Western-blot da proteína do envelope, GP64 (Fig. 3.2b). Por outro lado, BM-5 não mostrou nenhum efeito citopático quando infectado com o tipo selvagem AcMNPV (Fig. 3.4d), como já confirmado por outros trabalhos (Kamita e Maeda, 1993; Guzo *et al.*, 1992). Ao comparar o acúmulo da GP64 nas células BTI-Tn-5B1-4, permissivas ao vírus AcMNPV e ao recombinante vAcNSs, e nas células BM-5, permissivas ao BmNPV, é evidenciada a ineficiência da produção de BVs do vAcNSs e de AcMNPV nas células que não lhes são permissivas (BM-5). Isso indica que a proteína NSs ou é tóxica para a célula BM-5 ou permitiu a expressão de produtos gênicos virais capazes de induzir alterações ou mesmo a morte celular. Analisando a infecção por BV de AcMNPV em hemócitos de *A. gemmatalis*, células semipermissivas a esse vírus, Chikhalya *et al.* (2009) relataram baixo nível na expressão da proteína do envelope GP64, sugerindo que esses hemócitos tivessem uma capacidade limitada para amplificar o vírus.

No método TCID₅₀, baseado no ensaio de placas, o título viral é decorrente da contagem visual de poços com células infectadas multiplicada pelo fator de diluição do estoque viral, resultando em um número de partículas virais infecciosas. Assim, ao utilizar uma célula não-permissiva ao vírus, o título não deve ser o único indicativo de número de partículas infecciosas presentes no estoque viral. Volkman e Goldsmith (1982) desenvolveram um imunoensaio, *in vitro*, com anticorpo para proteínas do envelope de AcMNPV, para quantificar a replicação viral entre diferentes linhagens celulares, independentemente da produção de poliedros ou da

visualização de efeito citopático. Argumentam que esses eventos nem sempre acompanham uma infecção ativa. Nesse estudo, os autores mostraram que células de *B. mori* (BMN) foram altamente sensíveis à infecção ao AcMNPV. Entretanto, uma ou outra célula foi imunorreativa ao AcMNPV. Concluíram, pois, que, apesar de produtos gênicos virais estarem presentes, não houve a produção de vírus infecciosos. Assim, a sensibilidade à infecção e a capacidade de replicação viral não são características inseparáveis.

A PCR em tempo real é outra metodologia que pode ser utilizada para quantificar partículas de BVs no sobrenadante de células infectadas como alternativa ao método de diluição seriada. Hitchman *et al.* (2007) descreveram um método de titulação eficiente, a qPCR (PCR em tempo real quantitativa) usando sondas fluorogênicas da Applied Biosystems Taqman®, que possibilitou rapidez e aumento na acurácia de titulação viral em larga escala em relação ao sistema SYBRGreen. De acordo com esses autores, as sondas comumente utilizadas nesse tipo de estudo (SYBRGreen) é incapaz de discriminar entre a seqüência-alvo e outras fitas duplas de DNA, que podem estar presentes nas reações de qPCR, conduzindo a uma possível contaminação e à presença de artefatos, como dímeros de iniciadores. Tais artefatos reduzem a sensibilidade do ensaio e, conseqüentemente, a exatidão na quantificação de amostras com baixo número de cópia.

Verificou-se a influência da NSs na expressão gênica viral tardia do tipo selvagem, que possui o gene *polh* intacto, resultando na formação de PIBs. Para isso, a contagem de poliedros foi feita em infecções mistas nas três linhagens hospedeiras. O vAcNSs aumentou a produção de poliedros de todos os tipos selvagens usados neste estudo: AcMNPV, AgMNPV e BmNPV, fornecendo, assim, uma função *helper* na infecção desses vírus. Presumivelmente, pelo envolvimento da NSs com componentes virais e do hospedeiro, mais uma vez, esses resultados observados indicam a possibilidade de aplicação efetiva da proteína NSs no aumento da replicação viral (Fig. 3.5). A célula BM-5 foi a que apresentou o maior aumento no número de poliedros na co-infecção do selvagem BmNPV com vAcNSs. Não houve influência da outra proteína de TSWV, a NSm, usada como controle adicional, na produção de poliedros durante a co-infecção do vírus vSynNSm com o selvagem BmNPV na célula BM-5. Quando as mesmas células foram infectadas com a combinação dos vírus do tipo selvagem BmNPV com AgMNPV e BmNPV com AcMNPV, a formação de PIBs na célula foi significativamente reduzida (dados não mostrados). Essas observações estão de acordo com um trabalho prévio, onde a co-infecção de células de *B. mori* (BmN) com AcMNPV e BmNPV não possibilitou a multiplicação de

AcMNPV, como foi evidenciado pela ausência de formação de PIB do selvagem-tipo AcMNPV (Rahman e Gopinathan, 2003). Além disso, naquele mesmo trabalho, a co-infecção com AcMNPV causou de fato uma redução na formação de PIBs do BmNPV.

No presente estudo foi possível demonstrar a produção de NSs nas células BM-5, regulada pelo promotor *very late ppolh* (Fig. 3.1 e 3.4). Similarmente, Woo *et al.* (2007) também detectaram a expressão gênica *very late* por BmNPV na linhagem celular SF9, não-permissiva a esse vírus, através da expressão da β -galactosidase, sob o controle do promotor da poliedrina. Apesar da detecção da NSs, não foi observada, nas células BM-5, a produção de PIBs de AcMNPV nas co-infecções com vAcNSs e aquele selvagem (dado não mostrado). Isso pode ser atribuído a um bloqueio na formação dos corpos de oclusão no estágio *very late* da infecção viral.

Iwanaga *et al.* (2004) relataram que os níveis da expressão *very late* da poliedrina de AcMNPV e do gene *p10* na célula BmN foram dramaticamente reduzidos, o que, conforme se presumiu, conduziu à inabilidade de AcMNPV formar corpos de oclusão poliédricos nessas células. Embora as células Sf9 fossem consideradas não-permissivas a BmNPV, estudo conduzido por Martin e Croizier (1997) relatou que o DNA de BmNPV se replicou e produziu títulos elevados de vírus extracelulares nessas células, mas foi incapaz de produzir poliedros. Assim, a falha na formação de poliedros na co-infecção de células Bm5 por AcMNPV e vAcNSs, no presente estudo, pode ser creditada à falta de um fator do hospedeiro necessário para a formação dos corpos poliédricos.

Fatores dependentes do hospedeiro, que desenvolvem um papel na expressão *very late* do promotor do gene da poliedrina de AcMNPV, foram descritos em insetos. Determinados genes são requeridos para a expressão *late* do baculovírus; alguns deles mostraram-se dependentes da linhagem celular (Burma *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 1995; Lu e Miller, 1996; Ghosh *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2001). A helicase de AcMNPV, por exemplo, precisa interagir não só com fatores virais mas provavelmente também com fatores do hospedeiro, para a replicação viral eficiente do DNA, o que é necessário para a transcrição gênica *late* e *very late* (Maeda *et al.*; 1993; Croizier *et al.*, 1994; Todd *et al.*, 1995; Rapp *et al.*, 1998).

Neste trabalho, a análise de microscopia confocal mostrou que a NSs se acumulou diferentemente nas células de inseto testadas. Nas permissivas e semipermissivas, foi encontrada no citoplasma; na célula não-permissiva, uma grande quantidade da NSs foi observada na região perinuclear (Fig. 2.5d, f e h).

Na família *Bunyaviridae*, a localização intracelular da NSs pode variar de acordo com o vírus e a célula hospedeira. Kormelink *et al.* (1991) detectaram a proteína NSs de TSWV dispersa em forma de filamentos, no citoplasma da célula de *N. rustica*. Outros estudos mostraram que a proteína NSs de *Rift Valley Fever virus* (RVFV) – a propósito, uma das mais estudadas da família *Bunyaviridae* – foi encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma de células infectadas por RVFV (Yadani *et al.*, 1999). Essa mesma proteína (NSs de RVFV) foi encontrada no núcleo de células de inseto da linhagem H5 (*T. ni*), infectadas por um baculovírus recombinante derivado do AcMNPV. No mesmo estudo, os resultados indicaram que, em células de *T. ni*, a NSs interagiu com a subunidade p44, um componente do fator de transcrição TFIID humano, diminuindo drasticamente a transcrição gênica no hospedeiro (Le May *et al.*, 2004). Recentemente, Mansuroglu *et al.* (2009) mostraram que a proteína NSs de RVFV foi encontrada no núcleo de células infectadas, interagindo com sequências pericentroméricas do genoma do hospedeiro.

Neste trabalho, a localização da NSs no citoplasma pode estar relacionada à função da proteína na supressão do silenciamento gênico, já que sua atividade pode afetar a maquinaria do silenciamento de RNA, presente no citoplasma (Lindbo e Dougherty, 1992; English *et al.*, 1996; Fire *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000).

Em contraste, a NSs foi localizada no espaço perinuclear das células BM-5, infectadas por vAcNSs. Como a seqüência de aminoácidos da NSs não apresenta sinal de localização nuclear aparente (Yadani *et al.*, 1999), sua presença nuclear pode estar relacionada à interação com um fator de transcrição viral e/ou do hospedeiro, como mostrou o trabalho de Le May *et al.* (2004). Além disso, a NSs poderia ter, mesmo nessas células não-permissivas, alguma função no mecanismo de silenciamento gênico transcricional nuclear (SGT). O SGT está relacionado com o bloqueio na transcrição induzido por um dsRNA derivado do próprio DNA. O dsRNA é processado por uma enzima DCL, e os siRNAs resultantes são incorporados ao complexo RITS (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*). Esse complexo atua no DNA genômico, resultando na metilação de seqüências homólogas ao siRNA (Mette *et al.*, 2000; Verdel *et al.*, 2004). O SGT já foi relatado em plantas por Wassenegger *et al.* (1994) e, recentemente, em outros organismos, desde leveduras até animais (Buhler e Moazed, 2007b; Buhler *et al.*, 2007a).

No presente trabalho, também foi mostrado que um baculovírus recombinante expressando o gene *egfp* (vHSGFP), sob o controle do promotor heat shock 70 de *Drosophila* (*hsp70*), foi capaz de induzir RNAi em células de inseto (Fig. 3.7c), especialmente na célula semipermissiva, na qual a porcentagem de células expressando EGFP foi apenas 9.51% a 48 h p.i. (Fig 3.7a).

Johansen e Carrington (2001) compararam o silenciamento gênico induzido por um RNA de fita dupla (dsRNA) de EGFP com o induzido pelo gene *egfp* (fita senso), em célula de *N.benthamiana*, usando *Agrobacterium* como vetor de expressão. De acordo com os resultados, o silenciamento foi rapidamente induzido pelo dsRNA e impediu a acumulação do RNAm e da proteína GFP já no primeiro dia pós-infecção. Entretanto, quando foi agroinoculado o vetor contendo o gene *gfp* na orientação senso, a célula foi silenciada apenas a partir de 48 h p.i. O trabalho demonstrou que, mesmo na ausência de um RNA fita dupla, o próprio gene pode ser um indutor de RNAi.

Vaucheret *et al.*, (1998) relataram que PTGS induzido por transgenes pode igualmente ocorrer quando um transgene não tem homologia com um gene endógeno.

Nossos resultados corroboram os trabalhos já reportados. Na linhagem celular semipermissiva (UFL-Ag-286) co-infectada com vHSGFP e com um baculovírus recombinante (vAcNSs), que codifica para a proteína NSs de TSWV, supressora de RNAi, o percentual de células fluorescentes aumentou significativamente, de 9.51% para 80% a 48 h p. i. (Fig. 3.7a). O alto nível de expressão de EGFP nas células de inseto semipermissivas e em hemócitos co-infectados com vHSGFP e vAcNSs foi, ao que tudo indica, provocado pela NSs, que suprimiu o silenciamento gênico induzido por vHSGFP, impedindo a formação de siRNAs nas células (Fig. 3.7c).

Nos estudos de Johansen e Carrington (2001) já citados acima, o silenciamento rápido, induzido por dsGFP, foi inibido parcialmente pelo supressor de RNAi HC-Pro do *Tobacco etch virus* (Lindbo e Dougherty, 1992). Porém, quando o silenciamento foi provocado pelo gene *egfp*, a proteína HC-Pro foi capaz de suprimí-lo totalmente. Assim, supressores de RNAi são úteis para se analisar o silenciamento de RNA (Johansen e Carrington, 2001).

A proteína NSs foi o primeiro supressor de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) identificado em vírus de RNA. Takeda *et al.* (2002) relataram que essa proteína suprimiu a via de PTGS de um transgene (GFP) senso, em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*

contendo GFP, e interferiu no acúmulo de siRNAs. Entretanto, no mesmo trabalho, a NSs não suprimiu PTGS de um transgene antisense (sequência invertida de GFP), uma vez que o silenciamento gênico gerado por sequências invertidas resulta em uma grande quantidade de siRNAs (Johansen e Carrington, 2001). Tais resultados sugerem que a NSs interfira principalmente na etapa inicial do RNAi, que inclui a síntese de dsRNA pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) da planta (Fig. 3.8). Além disso, os autores propuseram que a NSs tenha alguma função na etapa após a geração de dsRNA, porque, mesmo não interferindo no acúmulo de siRNAs no ensaio com o antisense de GFP, a NSs aumentou, ainda que pouco, o acúmulo de RNAm de GFP na planta co-inoculada.

Em 2003, Bucher *et al.* também comprovaram a atividade supressora da proteína NSs em ensaios transientes com agroinoculação em plantas transgênicas de *N. benthamiana* contendo GFP. A atividade de supressão foi mostrada pela ausência de siRNAs nas plantas inoculadas com *Agrobacterium* contendo a ORF do gene *NSs*.

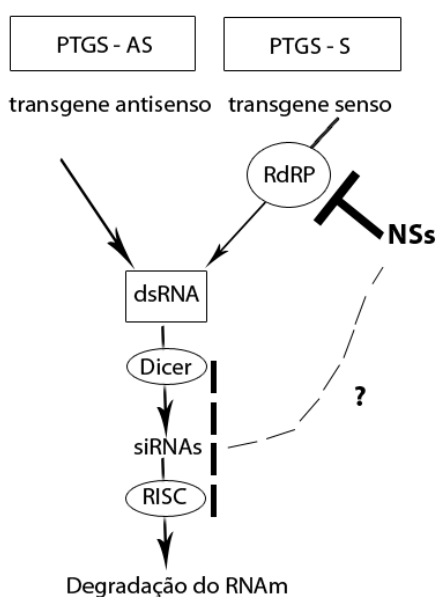


Fig. 3.8. Modelo proposto por Takeda *et al.* (2002) para a supressão, mediada por NSs, de PTGS induzido por um transgene, em plantas (adaptado). Duas vias são mostradas: PTGS-AS (antisense) e PTGS-S (senso). Na via PTGS-S, a RdRP e diversas proteínas da planta são requeridas para a síntese de dsRNA, em que a NSs pode interferir. Por outro lado, não é necessária a presença dessas proteínas hospedeiras quando PTGS é induzido por um transgene antisense, que conduz diretamente à produção de dsRNAs. Após a clivagem de longas fitas duplas de RNA

pela Dicer, uma enzima RNaseIII-like, os siRNAs são levados ao complexo indutor de RNA (RISC), para a degradação do mRNA. A NSs pode interferir em qualquer uma dessas etapas posteriores, após a geração de dsRNA.

A NSs é eficiente também em suprimir outros sistemas celulares. Neste trabalho, um experimento preliminar feito com a linhagem celular C6/36 derivada de *Aedes albopictus* (Culicidae: *Stegomyia*) revelou que a população co-infectada com vHSGFP e vAcNSs expressou, a 48 h p.i., três vezes mais a proteína GFP do que a população infectada apenas com vHSGFP (dados não-mostrados).

Um *Semliki Forest virus* (SFV) recombinante expressando NSs de TSWV induziu atividade de supressão em células de carrapato (Garcia *et al.*, 2006). Similarmente, Blakqori *et al.* (2007), usando a mesma construção (SFVNSs-TSWV) e outra com o gene repórter da luciferase (SFVLuc), mostraram que a proteína NSs recuperou a expressão da luciferase em células U4.4 de *A. albopictus*.

Outras proteínas também foram capazes de inibir RNAi em mais de um tipo celular: a NS1 do vírus *Influenza A* – ativa em células de inseto e planta (Bucher *et al.* 2004; Li *et al.*, 2002) – e a NS3 do *Rice hoja blanca tenuivirus* (família *Bunyaviridae*) – homóloga à NSs de tospovírus – suprimiram RNAi em plantas e no inseto hospedeiro se ligando eficientemente aos siRNAs e miRNAs (Hemmes *et al.*, 2007).

De acordo com os experimentos realizados no presente estudo, a NSs não teve nenhum efeito inibitório na formação de siRNAs de GFP nas células BM-5 (não-permissivas). A análise de citometria não mostrou expressão de EGFP nessas células. Isso revela que não houve supressão do silenciamento em relação à EGFP, até porque, na célula não-permissiva, não há a expressão eficiente da proteína GFP, indicativo de que a NSs não age em *trans* para essa função nessa linhagem celular. Como já foi citado, a NSs não suprime o silenciamento completo na planta quando o indutor de RNAi é um antisenso de GFP (Takeda *et al.*, 2002). Outra hipótese seria a sua atuação na supressão de outro fator da via de RNAi, já que houve o silenciamento gênico pela presença de siRNAs em BM-5. O fato é que essa função diferente da NSs nessa linhagem celular levou ao aumento significativo no número de poliedros do BmNPV durante a co-infecção com vAcNSs.

Foi relatado que um SFV recombinante que contem o gene NSs de *La Crosse virus* (LACV) não indicou atividade supressora de RNAi nas células U4.4 de *Aedes albopictus* infectadas (Blakqori *et al.*, 2007).

Enfim, de acordo com Johansen e Carrington (2001), o silenciamento de RNA pode ser provocado por uma variedade de indutores. Por outro lado, essa aparente limitação à expressão do genoma viral pode ser superada por supressores de RNAi.

Em suma, os resultados aqui expostos indicam que a proteína NSs de TSWV melhorou a eficiência da replicação do baculovírus em célula permissiva e semipermissiva e ainda aumentou a produção da proteína heteróloga (GFP), durante a co-infecção de célula de inseto com vHSGFP e vAcNSs. Já se sabia que o TSWV se replica com eficiência em seu inseto-vetor – o tripes (Wijkamp *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1999; Ullman *et al.*, 2002). Os dados obtidos neste trabalho, relativos ao vAcNSs em linhagens celulares de lepidóptero, podem indicar um papel similar da proteína NSs no tripes.

CAPÍTULO IV

A PROTEÍNA NSs DO TSWV AUMENTA A EFICIÊNCIA DA AÇÃO BIOINSETICIDA DO BACULOVÍRUS AcMNPV EM LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (PERMISSIVAS) E DE *Anticarsia gemmatilis* (SEMIPERMISSIVAS)

RESUMO

O efeito da proteína supressora de silenciamento gênico NSs de TSWV na ação bioinseticida do baculovírus em larvas de *Spodoptera frugiperda* (permissivas) e de *Anticarsia gemmatilis* (semipermissivas) foi avaliado. Noventa larvas de cada espécie foram inoculadas com 1 a 10^5 p.f.u./ml⁻¹ de vírus extracelulares (BVs) do recombinante vAcNSs e do tipo selvagem AcMNPV, por meio de injeção intrahemocélica. O objetivo do trabalho foi determinar a dose letal média (DL₅₀) e o tempo letal médio (TL₅₀) de cada vírus para as larvas *S. frugiperda* e *A. gemmatilis*. Não houve diferença estatística entre a DL₅₀ do vAcNSs e a do tipo selvagem AcMNPV. Entretanto, o TL₅₀ foi significativamente distinto, mostrando valores mais baixos de vAcNSs para *S. frugiperda* [5,62 dias com 1 p.f.u. e 4,82 dias com 10^5 p.f.u.] e para *A. gemmatilis* [7,46 dias com 1 p.f.u. e 3,20 dias com 10^5 p.f.u.] quando comparados ao TL₅₀ de AcMNPV para *S. frugiperda* [8,5 dias com 1 p.f.u. e 7,52 dias com 10^5 p.f.u.] e para *A. gemmatilis* [20,11 dias com 1 p.f.u. e 7,34 dias com 10^5 p.f.u.]. Esses resultados corroboram os dados observados *in vitro* indicando que a proteína NSs de TSWV pode aumentar a eficiência da replicação do baculovírus e, pode contribuir para gerar bioinseticidas mais eficientes.

ABSTRACT

The effect of NSs on bioinsecticide action in *Spodoptera frugiperda* (permissive) and *Anticarsia gemmatalis* (semipermissive) larvae was evaluated. Ninety larvae of each species were inoculated with 1 to 10^5 p.f.u./ml⁻¹ of the budded virus form (BVs) of a recombinant vAcNSs, and the wild type AcMNPV by intrahaemocoelic injection. The objective of this work was to determine the mean lethal dose (LD₅₀) and the mean lethal time (LT₅₀) for each virus in *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* larvae. Not statistically difference was seen between vAcNSs and wild type AcMNPV LD₅₀s. However, the LT₅₀ was significantly different, showing lower values for vAcNSs in *S. frugiperda* [5.62 days with 1 p.f.u.. and 4.82 days with 10^5 p.f.u..] and *A. gemmatalis* [7.46 days with 1 p.f.u.. and 3.20 days with 10^5 p.f.u..] when compared to the LT₅₀ for AcMNPV in *S. frugiperda* [8.5 days with 1 p.f.u.. and 7.52x days with 10^5 p.f.u..] and *A. gemmatalis* [20.11 days with 1 p.f.u.. and 7.34 days with 10^5 p.f.u..]. These results corroborate with all data observed *in vitro* indicating that the TSWV-NSs protein could efficiently improve baculovirus replication efficiency and could contribute to generate more efficient bioinsecticides. These results corroborate the data found in this work *in vitro* indicating that the TSWV-NSs protein could efficiently improve baculovirus replication efficiency and could contribute to generate more efficient bioinsecticides.

1. Introdução

O primeiro uso de baculovírus como agente de controle de insetos-praga foi em 1930, na América do Norte, na proteção de *Pinus* com *Diprion hercyniae nucleopolyhedrovirus* (Bird e Burk, 1961, citado por Inceoglu *et al.*, 2001). Subsequentemente, outras plantas de cultivo comercial, como milho, algodão, tabaco e tomate, foram tratadas com baculovírus, para controlar o ataque de pragas (Granados e Federici, 1986). No entanto, o maior sucesso do uso desse agente foi obtido na proteção da soja (*Glycine max*) contra o ataque da lagarta, *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), no Brasil (Moscardi, 1999). Outros baculovírus também são utilizados no Brasil, por exemplo: o *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), no controle da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) e na cultura do milho; e, o *Erynes ello granulovirus* (EeGV), para o controle do mandarová-da-mandioca e do *Erinnyis ello* Linnaeus (Lepidoptera: *Sphingidae*) – principal praga da mandioca no país (Castro *et al.*, 1999).

O uso de bioinseticidas, além de representar a redução de danos ao meio ambiente, comumente causados por inseticidas químicos (Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi, 1999), não gera efeitos reversos como o aumento na resistência dos insetos a agrotóxicos. Entretanto, a velocidade relativamente lenta da ação dos baculovírus (McLeod *et al.*, 1978; Hunter *et al.*, 1984; Smits *et al.*, 1987) foi uma das barreiras principais para otimização comercial desses inseticidas microbianos. Nos Estados Unidos da América, apesar do registro de vários baculovírus como pesticidas biológicos (Betz, 1986), seu uso comercial ainda é limitado, pois seu tempo de mortalidade é consideravelmente maior em relação ao dos inseticidas químicos (Copping e Menn, 200).

Conforme já foi descrito na revisão dessa tese (Capítulo I), vários recombinantes surgiram da necessidade de manipulação genética do baculovírus, para torná-lo mais virulento.

A fisiologia do crescimento dos insetos é regulada por diferentes hormônios. A inativação ou super expressão de um ou mais desses hormônios poderia interferir na sua fina regulação e resultar em crescimento anormal, parada na alimentação e/ou morte. Maeda (1989) foi o primeiro a tentar modificar a fisiologia dos insetos com objetivo de aumentar a virulência dos baculovírus. O autor introduziu o gene do hormônio diurético (DH) de *Manduca sexta* no genoma do baculovírus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) e inoculou o vírus recombinante (BmDH5) em larvas do bicho-da-seda. A infecção com BmDH5 causou uma redução de 30% no

volume da hemolinfa e matou a larva em torno de 20% mais rápido do que a infecção com o selvagem BmNPV.

Desde então, a tecnologia de RNAi com baculovírus vem sendo utilizada no estudo de funções gênicas de insetos e do próprio vírus (Hajós *et al.*, 1999; Means *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007). Por exemplo, Means *et al.* (2003) demonstraram que o gene *Op-iap3* do baculovírus *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) é requerido para a prevenção de apoptose durante a infecção de células de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: *Lymantriidae*). Como RNAi é sabidamente uma estratégia celular de defesa contra vírus de RNA (Al-Kaff *et al.*, 1998; Carrington e Whitham, 1998; Selling *et al.*, 1990; Adelman *et al.*, 2002; Baulcombe, 2004; Ding *et al.*, 2004; Soldan *et al.* 2005), especula-se a possibilidade de esse mecanismo estar presente em células de inseto também na prevenção contra a infecção por um vírus de DNA.

Portanto, neste trabalho, foi investigada a ação bioinseticida de um baculovírus recombinante (vAcNSs), que contém o gene *NSs*, supressor de silenciamento gênico, de TSWV, em larvas permissivas de *S. frugiperda* e semipermissivas de *A. gemmatalis*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Células e vírus

Para a propagação do baculovírus recombinante vAcNSs e do tipo selvagem isolado L-1 de AcMNPV (Lee e Miller, 1978) (Fig. 4.1) foi utilizada a linhagem celular BTI-Tn-5B1-4, derivada do inseto *Trichoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994). As células foram mantidas a 27 °C, no meio TC-100 (Gibco-BRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal.

O inóculo viral foi titulado pelo método da TCID₅₀, como descrito em O'Reilly *et al.* (1992).

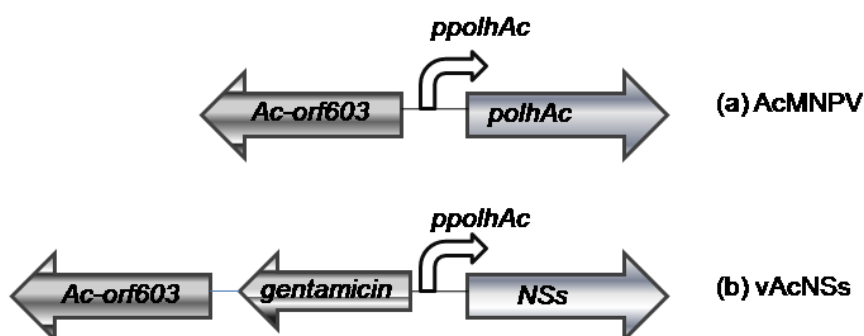


Figura 4.1: Esquema mostrando o locus da poliedrina (*polh*) nos baculovírus recombinante e selvagem. (a) Tipo selvagem AcMNPV, que contém o promotor (*ppolh*) e o gene da poliedrina (*polh*). (b) Recombinante vAcNSs, vírus com o gene *NSs*, sob o controle do promotor *ppolh*. As posições do gene de resistência à gentamicina e do gene viral *Ac-orf603* são mostradas.

2.2 Insetos

Foram utilizadas larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*, no terceiro instar de desenvolvimento, obtidas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). Essas populações foram mantidas a 28°C, em dieta artificial, segundo os procedimentos de Greene *et al.* (1976).

2.3 Bioensaios – Injeções

Para verificar o efeito do recombinante vAcNSs na mortalidade dos insetos, 10 µl da inoculação viral foram injetados diretamente na hemolinfa das larvas utilizando-se uma microseringa de insulina (Fig. 4.2). Cinco doses diferentes foram usadas (1, 10, 100, 10.000 e 100.000 p.f.u./ml⁻¹) para cada vírus, AcMNPV e vAcNSs. Cada larva infectada foi colocada separadamente em um copo plástico. Para avaliação da mortalidade, foram feitas observações diárias das larvas, a partir de 48 horas após a injeção inicial, até o fim do experimento. As mortes atribuídas ao traumatismo pela injeção não foram consideradas. Os indivíduos que puparam

foram considerados resistentes à infecção. Os controles foram obtidos pela inoculação com o mesmo volume de meio TC-100 (10 μ l) sem qualquer dos vírus. Trinta lagartas foram utilizadas para cada dose; o experimento foi repetido três vezes. Os dados da mortalidade foram submetidos à análise de Probit (Finney, 1964, 1971) por meio do software Polo Plus versão 2.0 (Leora software, 1980). A partir dos dados coletados, foi estimada a dose letal média (DL_{50}) e o tempo letal médio (TL_{50}) para doses/concentrações específicas, associados aos parâmetros 95% de limite fiducial, “slope” e χ^2 . O tempo letal médio (TL_{50}) foi analisado a partir da dose menor, 1 p.f.u./ ml^{-1} e da dose maior, 100.000 p.f.u./ ml^{-1} .



Fig. 4.2: Ilustração do bioensaio com larvas de *S. frugiperda*. As larvas (a) foram anestesiadas sobre o gelo (b) e infectadas via intrahemocélica com a ajuda de uma microseringa de insulina, contendo 10 μ l do inóculo viral (c, d). As larvas infectadas foram colocadas em copos descartáveis com dieta (e), e a mortalidade foi analisada a cada 24 h.

3. Resultados

Para caracterizar a infecção com vAcNSs e AcMNPV *in vivo*, foi realizada a injeção intrahemocélica de BVs de cada vírus, em larvas de *S. frugiperda* (permissivas) e de *A. gemmallis* (semipermissivas) no terceiro ínstar. Comparando com a infecção pelo AcMNPV, o baculovírus recombinante vAcNSs produziu um aumento na mortalidade larval para todas as concentrações testadas, especialmente, em larva semipermissiva *A. gemmatalis*, o que indica um aumento na susceptibilidade dessa espécie ao vírus vAcNSs.

Para *S. frugiperda*, embora a DL_{50} de vAcNSs tenha sido mais baixa (0,036 p.f.u./larva) do que a de AcMNPV (0,825 p.f.u./larva) (Tabela 4.1), houve uma sobreposição nos limites

fiduciais (95% LF); conseqüentemente, esses dados não são estatisticamente significativos. Entretanto, os valores do TL₅₀ obtidos (Tabela 4.2) mostraram diferenças sensíveis. AcMNPV precisou de quatro dias a mais, na dose de 1 p.f.u./larva, e de três dias a mais, na dose de 100.000 p.f.u./larva, para matar 50% das larvas, em comparação ao vAcNSs.

Tabela 4.1: Dose letal média (DL₅₀) do vírus vAcNSs para larvas de *S. frugiperda* por injeção intrahemocélica de BVs.

Vírus	DL ₅₀ ^a	95% FL ^b	Slope	χ^2
AcMNPV	0,825	0,004 – 8,283	6,58	3,07
AcNSs	0,036	0,001 – 0,526	5,69	3,34

^aExpressa o número de p.f.u./larva (1, 10, 100, 10.000 e 100.000 p.f.u..)

^bIntervalo de confiança de 95%; dados não-sobrepostos são uma evidência de diferenças significantes entre os valores de DL₅₀ obtidos.

Tabela 4.2: Tempo letal médio (TL₅₀) do vírus vAcNSs para larvas de *S. frugiperda* por injeção intrahemocélica de BVs.

Vírus	Dose (p.f.u./larva)	TL ₅₀ ^a	95% FL ^b	Slope	χ^2
AcMNPV	1	8,5	8,01 – 9,08	9,55	5,87
	100000	7,52	6,71 – 8,59	7,49	2,38
AcNSs	1	5,62	4,75 – 6,36	7,42	11,22
	100000	4,82	4,06 – 5,53	6,93	2,71

^aExpressa o número de p.f.u./larva (1, 10, 100, 10.000 e 100.000 p.f.u..)

^bIntervalo de confiança de 95%; dados não-sobrepostos são uma evidência de diferenças significantes entre os valores de TL₅₀ obtidos.

Para a infecção intrahemocélica em *A. gemmatalis*, os valores de DL₅₀ obtidos foram 7,15 e 1,18 p.f.u./larva para AcMNPV e vAcNSs, respectivamente. Isso significa que vAcNSs requer

uma dose sete vezes menor que o vírus tipo selvagem para matar 50% da população de *A. gemmatalis* (tabela 4.3). Mas, como os limites fiduciais (95% LF) obtidos se sobrepuseram, esses dados não foram estatisticamente significativos. Porém, os valores de TL₅₀ foram altamente significativos. O TL₅₀ revela que AcMNPV requer de quatro a treze dias a mais que vAcNSs para matar a metade da população nas doses de 100.000 e 1 p.f.u./ml⁻¹, respectivamente (tabela 4.4).

Tabela 4.3: Dose letal média (DL₅₀) do vírus vAcNSs para larvas de *A. gemmatalis* por injeção intrahemocélica de BVs.

Vírus	DL ₅₀ ^a	95% FL ^b	Slope	χ ²
AcMNPV	7,15	1,92 – 44,43	6,49	2,25
AcNSs	1,18	0,34 – 2,86	7,18	1,41

^aExpressa o número de p.f.u./larva (1, 10, 100, 10.000 e 100.000 p.f.u.)

^bIntervalo de confiança de 95%; dados não-sobrepostos são uma evidência de diferenças significantes entre os valores de DL₅₀ obtidos.

Tabela 4.4: Tempo letal médio (TL₅₀) do vírus vAcNSs para larvas de *A. gemmatalis* por injeção intrahemocélica de BVs.

Vírus	Dose (p.f.u./larva)	TL ₅₀ ^a	95% FL ^b	Slope	χ ²
AcMNPV	1	20,11	12,27 – 22,09	3,35	1,15
	100000	7,34	6,19 – 9,97	5,9	6,13
AcNSs	1	7,46	6,41 – 9,21	5,91	2,98
	100000	3,20	2,58 – 3,72	8,02	6,84

^aExpressa o número de p.f.u./larva (1, 10, 100, 10.000 e 100.000 p.f.u.)

^bIntervalo de confiança de 95%; dados não-sobrepostos são uma evidência de diferenças significantes entre os valores de TL₅₀ obtidos.

4. Discussão

Um baculovírus recombinante contendo o gene *NSs* de *Tomato spotted wilt virus* foi construído sob o controle do promotor viral do gene da poliedrina (*polh*) de AcMNPV (vAcNSs) (Fig. 4.1). Esse recombinante, conforme demonstrado, provocou um aumento na ação bioinseticida do AcMNPV em larvas permissivas de *S. frugiperda* e semipermissivas de *A. gemmatalis*, pela expressão de uma proteína supressora do silenciamento gênico de um vírus de planta. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro relato de um baculovírus recombinante com ação bioinseticida potencializada pela inserção de um gene supressor de silenciamento gênico em seu genoma viral.

O vAcNSs apresentou uma redução de 62,9% (1 pfu/larva) e 56,4% (100.000 pfu/larva) no TL₅₀ de larvas de *A. gemmatalis*, quando comparado ao AcMNPV. Em larvas permissivas de *S. frugiperda*, o TL₅₀ do vAcNSs foi reduzido em 33,8% (para 1 p.f.u./larva) e 35,9% (para 100.000 pfu/larva), quando comparado ao TL₅₀ do AcMNPV. Esse efeito pode ser devido à ação da NSs como um supressor de RNAi.

Esses resultados dão suporte aos dados obtidos *in vitro*, que mostraram que um vírus recombinante AcMNPV com o gene *egfp* (vHSGFP) induziu a formação de RNAs interferentes (siRNA) correspondentes ao transcrito de *egfp*, nas células permissivas de *T. ni* (BTI-Tn-5B-1-4) e nas células semipermissivas de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286), durante a infecção (Capítulo III). Porém, quando o vHSGFP foi co-infectado com vAcNSs nas mesmas células, não foi detectado siRNAs originados de transcritos de *egfp*. Isso indica que a NSs, além de ser ativa em plantas, em células de *Aedes albopictus* e em células ISE6 – derivadas do carrapato *Ixodes scapularis* (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2006; Blakqori *et al.*, 2007) –, parece ser igualmente capaz de suprimir o silenciamento de RNA em insetos lepidópteros.

Embora a maioria dos baculovírus infectem uma gama restrita de hospedeiros, a espécie-tipo AcMNPV infecta em torno de doze famílias de insetos da Ordem Lepidoptera (Granados e Williams, 1986) e pode infectar e matar larvas de pelo menos 32 espécies dessa mesma ordem, incluindo *S. frugiperda* (Granados e Williams, 1986). Conquanto a especificidade seja importante na produção de um inseticida, é economicamente desejável controlar mais de três espécies de pragas com um único agente biológico de controle. Porém, nem todo hospedeiro é altamente suscetível à infecção letal por AcMNPV. A base biológica visando entender essa resistência tem

sido relatada somente em algumas espécies (Eric *et al.*, 2003). Conforme alguns desses estudos, o nível de resistência pode aumentar com a idade do inseto (Stairs, 1965; Engelhard e Volkman, 1995).

O RNA interferente (RNAi) é um dos fatores do hospedeiro com potencial de inibir a infecção nos insetos por alguns vírus de RNA (Venter e Schneemann, 2008). Porém, os genomas virais, ao longo da evolução, desenvolveram proteínas que têm a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes organismos.

O *Flock house virus* (FHV), da família *Nodaviridae*, é um vírus de inseto que codifica a proteína B2. Essa proteína é uma potente supressora de RNAi, que atua em célula de *Drosophila* e em planta (Selling *et al.*, 1990; Dasgupta *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002), inibindo a capacidade da Dicer de clivar dsRNAs longos, impedindo, desse modo, a geração de siRNAs (Venter e Schneemann, 2008) e possibilitando, em contrapartida, a replicação viral eficiente e a formação de partículas de RNAs de FHV (Venter e Schneemann, 2008).

Em 1996, Price *et al.* já relatavam que a transfecção de *Saccharomyces cerevisiae* com o RNA genômico de FHV induzira a replicação viral, a transcrição e a produção de vírions infecciosos, em quantidade semelhante à encontrada em células de *Drosophila*. Dasgupta *et al.* (2003), por sua vez, descreveram que FHV pode se replicar nas células e nos tecidos de quatro espécies de mosquito (*Anopheles gambiae*, *Culex pipiens pipiens*, *Aedes aegypti* e *C. pipiens pipiens*). Assim sendo, FHV é um exemplo de vírus que, por ter em seu genoma um supressor de silenciamento gênico, cruzou as barreiras entre os reinos.

Da mesma forma, o TSWV, um vírus de planta, é um dos únicos membros da família *Bunyaviridae* (Bridgen *et al.*, 2001) que também infecta células de inseto – *Frankliniella occidentalis*, o tripses (Wijkamp *et al.*, 1993; Ullman *et al.*, 2002). Assim, esses supressores de RNAi, como a proteína NSs de TSWV, podem quebrar barreiras biológicas, que previnem infecções virais, e favorecer a replicação viral, inclusive aumentando a gama de hospedeiros.

Para verificar a interação de AcMNPV com hemócitos de *A. gemmatalis*, Silveira *et al.* (2005) estudaram o trajeto da infecção intrahemocélica pelo recombinante vHSGFP (Clarke e Clem, 2002). Esse recombinante foi capaz de infectar *A. gemmatalis*, mas uma limitada expressão de EGFP e uma baixa produção de poliedros foram detectadas nos hemócitos, ao final da infecção. Para essas condições experimentais, os autores consideraram *A. gemmatalis* um hospedeiro semi-permissivo ao AcMNPV.

Descreveu-se em outro trabalho que a análise por citometria de fluxo de hemócitos isolados de larvas de *A. gemmatalis* infectadas por BV de AcMNPV mostrou um baixo nível na expressão da proteína do envelope GP64, sugerindo que esses hemócitos tivessem uma limitada capacidade de amplificar o vírus (Chikhalya *et al.*, 2009). Outros relatos mostraram que os hemócitos possuem um papel fundamental na patogênese do baculovírus, amplificando o vírus e disseminando a infecção (Engelhard *et al.*, 1994; Barrett, *et al.*, 1998; Federici, 1997; Granados e Lawler, 1981; Washburn *et al.*, 1995).

Reportou-se que larvas *S. frugiperda* são menos suscetíveis ao AcMNPV que *Thricoplusia ni* (Clarke e Clem, 2002). A dose viral necessária para matar 50 e 95% da população de *S. frugiperda* foi, em cada caso, 1000 vezes maior do que a dose necessária para matar larvas de *T. ni* (Clarke e Clem, 2002). A progressão verificada sugere que *S. frugiperda* tenha um mecanismo parcialmente efetivo de resistência ao vírus, capaz de impedir a infecção contra baixas doses, mas incapaz de barrá-la em doses mais consideráveis (Clarke e Clem, 2002).

Neste trabalho, tanto larvas permissivas de *S. frugiperda* quanto semipermissivas de *A. gemmatalis* foram mais susceptíveis ao vírus vAcNSs que ao AcMNPV, com uma diferença maior para larvas de *A. gemmatalis*. Segundo os dados de mortalidade obtidos, o baculovírus recombinante vAcNSs mostrou-se mais eficiente que o tipo selvagem AcMNPV, quanto ao tempo necessário para induzir a morte de hospedeiros permissivos e semipermissivos. Dessa forma, possui potencial para ser usado como um agente de controle biológico melhorado.

Esses resultados sugerem também que a expressão da NSs possa superar, em parte, a resistência observada em larvas permissivas e semipermissivas, em relação a infecção por AcMNPV. Além disso, nossos estudos mostraram que a expressão da NSs aumenta em seis vezes a expressão de EGFP em hemócitos de *A. gemmatalis* co-infectados por vHSGFP e vAcNSs, quando se compara à infecção apenas por vHSGFP (Fig. 3.7c). Isso indica que a expressão de EGFP foi NSs dependente e que essa mesma estratégia pode ser empregada para gerar um sistema de expressão de proteína heteróloga mais eficiente.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A via de silenciamento gênico oferece proteção celular contra material genético invasor, além de regular processos epigenéticos e o desenvolvimento celular. Entre as várias funções, uma das mais relevantes é a defesa antiviral, que, por sua vez, levou à descoberta das proteínas virais que suprimem esse sistema de defesa. Resultados recentes comprovam que, cada vez mais, essas proteínas estão envolvidas numa relação intrínseca com o hospedeiro, podendo ser alvos potenciais de combate contra vírus ou ainda do favorecimento de sua replicação.

O presente trabalho descreveu a construção de três baculovírus recombinantes contendo genes supressores de silenciamento, os testes preliminares da infectividade desses recombinantes *in vitro* e *in vivo* e a escolha, por resultados comparativos, da proteína NSs, uma supressora de silenciamento gênico de TSWV, para estudo de sua ação na replicação viral em três linhagens celulares de lepidópteros, que se diferem quanto à permissividade viral. Por fim, realizaram-se bioensaios para caracterizar a ação *in vivo* da proteína NSs em duas espécies de lepidópteros.

A proteína NSs aumentou a replicação viral em célula permissiva (BTI-Tn-5B1-4) e, principalmente, na célula semipermissiva (UFL-AG-286), no que diz respeito à produção de vírus extracelulares (BVs) do recombinante vAcNSs. Não houve produção eficiente de BVs na linhagem não-permissiva (BM-5) infectada pelo recombinante, mas foi possível observar efeito citopático semelhante à infecção causada pelo baculovírus selvagem. Nas co-infecções, a NSs influenciou a expressão gênica *very late*, ao aumentar a produção de corpos poliédricos dos baculovírus selvagem AcMNPV, AgMNPV e BmNPV, nas respectivas linhagens hospedeiras-específicas. Este trabalho detectou, ainda, a localização da proteína NSs no citoplasma das células UFL-AG-286 e BTI-Tn-5B1-4 e na região perinuclear de células BM-5. Nos bioensaios, o vírus recombinante vAcNSs diminuiu o tempo de mortalidade para duas espécies de insetos analisadas.

Partindo-se da hipótese de que proteínas supressoras de vírus de planta poderiam tornar um baculovírus mais infectivo, os resultados obtidos nesta tese contribuem para a afirmação de que alguns mecanismos de defesa celular e de ataque viral podem ser universais.

Assim, tem-se como perspectivas futuras, as seguintes investigações:

- a) verificar a possibilidade de interação entre a proteína NSs e alguma proteína ou fator-alvo nas três linhagens de inseto hospedeiras;
- b) investigar a ação da proteína NSs em outros tipos celulares de inseto e até de mamífero;
- c) quantificar partículas virais no núcleo de células da linhagem BM-5, infectadas pelo selvagem AcMNPV e pelo recombinante vacNSs, por microscopia confocal;
- d) realizar ensaios de transcrição para quantificar a síntese de RNA, em vários tempos após a infecção, nas três linhagens celulares infectadas por vAcNSs e pelo tipo selvagem, relacionando-os com a atividade de GFP;
- e) investigar a atividade supressora dos outros dois baculovírus recombinantes construídos, vAcAC2 e vAcNS1, nas três linhagens de inseto hospedeiras;
- f) construir um baculovírus recombinante contendo os genes NSs e poliedrina, visando à realização de bioensaios por via oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMAN, Z. N. *et al.* RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *Journal of Virology*, v. 76, n. 24, p. 12925-12933, 2002.
- AGRAWAL, N. *et al.* RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, p.657–685, 2003.
- AL-KAFF, N. S. *et al.* Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science*, v. 279, n. 5359, p. 2113-2115, 1998.
- ALVES, M. *et al.* Recombinant expression of Garlic virus C (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. *Microbiological Research*, v. 163, n. 3, p. 354-361, 2008.
- ANANDALAKSHMI, R. *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ARAGON, T. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Molecular Biology Cell*, v. 20, p. 6259-6268, 2000.
- BALCH, R. E. The disease of the European spruce sawfly. Bi-M. Prog. Rep. For. Insect Invest. Department Agriculture Canadian v. 2, n. 5, p.1, 1946.
- BAULCOMBE, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p.109-113, 1999.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing. *Current Opinion in Biology*, v. 12, n. 3, p. 82-84, 2002.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, SET, p.356-363, 2004.
- BARBOSA, J. C. *et al.* Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology*, v. 75, n. 6, p. 440-443, 2009.
- BARRETT, J. W. *et al.* Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. *Journal of Virology*, v. 72, n. 4, p. 3377-3382, 1998.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BASHYAM, M. D. *et al.* Multiple regulatory circuits for transcription from the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis* virus. *Proceedings Indian Nature Science Academy*, B66, n.2-3. P. 83-96, 2000.

- BERGOLD, G. H. Die isolierung des polyeder-virus and die natur der polyeder. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 1947, p. 122-143, 1947.
- BERKHOUT, B.; HAASNOOT, J. The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *Febs Letters*, v. 580, n. 12, p. 2896-2902, 2006.
- BERNSTEIN, E. *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-366, 2001.
- BETZ, F.S. Registration of baculoviruses as pesticides, In: Granados, R.R.; Federici, B.A. (eds.). *The Biology of Baculoviruses*. Vol. II. Practical Application for Insect Control. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1986. p. 203-222.
- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak, E. *Viruses of invertebrates*. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1.
- BILLECOCQ, A. *et al.* NSs protein of rift valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of Virology*, v. 78, n. 18, p. 9798-9806, 2004.
- BLAKQORI, G. *et al.* La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *Journal of Virology*, v. 81, n. 10, p. 4991-4999, 2007.
- BISARO, D. M. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, v. 344, p. 158 – 168, 2006.
- BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*, v.35, p.127-155, 1990.
- BLISSARD, G. W. Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology*, v. 20, n. 1-3, p. 73-93, 1996.
- BRAUNAGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids - structural proteins, antigens, lipid and fatty-acid profiles. *Virology*, v. 202, n. 1, p. 315-328, 1994.
- BRENNECKE, J. *et al.* Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, v. 113, n. 1, p. 25-36, 2003.
- BRIDGEN, A. *et al.* Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 2, p. 664-669, 2001.
- BRIGNETI, G. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, v.17, p. 6739-6746, 1998.

- BONFIM, K. *et al.* RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, p. 717-726, 2007.
- BONNING, B. C; HAMMOCK, B. D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology*, v. 41, p. 191-210, 1996.
- BOULOY, M. *et al.* Genetic Evidence for an Interferon-Antagonistic Function of *Rift Valley Fever Virus* Nonstructural Protein NSs. *Journal Virology*, v. 75, n. 1371-1377, 2001.
- BUCHER, E. *et al.* The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 983-991, 2004.
- _____. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*, v. 77, n. 2, p. 1329-1336, 2003.
- BURMA, S. *et al.* An unusual 30-kda protein-binding to the polyhedron gene promoter of *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 4, p. 2750-2757, 1994.
- CALISHER, C. H. *Bunyaviridae*. *Archives Virology*, Supl. 2, p. 273-283, 1991.
- CARBONELL, L. F.; MILLER, L. K. Baculovirus interaction with nontarget organisms - a virus borne reporter gene is not expressed in 2 mammalian cell lines. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 7, p. 1412-1417, 1987.
- CARMELL, M. A.; HANNON, G. J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 11, n. 3, p. 214-218, 2004.
- BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. EMBRAPA-SPI Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 309 p.
- CARRINGTON, J. C.; WHITHAM, S. A. Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 1, n. 4, p. 336-341, 1998.
- CASTRO, M. E. B. *et al.* Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.
- _____. *Apoptose em células de Bombyx mori (BM-5) induzida por Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 2004. 15 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 43.
- CATALANOTTO, C. *et al.* Transcription - Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, v. 404, n. 6775, p. 245-245, 2000.
- CHAPMAN, E. J. *et al.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Development*, v. 18, n.1179-1186, 2004.

CHELLAPPAN, P. *et al.* MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 102, n. 29, p. 10381-10386, 2005.

CHEN, G. Y. *et al.* Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway. *Journal of Virology*, v. 83, n. 20, p. 10548-10556, 2009.

CHIKHALYA, A. *et al.* Pathogenesis of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* in fifth-instar *Anticarsia gemmatilis* larvae. *Journal of General Virology*, v. 90, p. 2023-2032, 2009.

CLARKE, T. E.; CLEM, R. J. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica M nucleopolyhedrovirus* by intrahaemocoelic injection. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 1565-1572, 2002.

COGONI, C. *et al.* Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo Journal*, v. 15, n. 12, p. 3153-3163, 1996.

COLARICCIO, A. *et al.* Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2001.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticidas: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, vol. 56, p. 651-676, 2000.

CORDEIRO, B. A. Efeitos patológicos nos túbulos de Malpighi de *Anticarsia gemmatilis* causados pela infecção por recombinantes do baculovírus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 82 p.

COVEY, S. N. *et al.* Plants combat infection by gene silencing. *Nature*, v. 385, n. 6619, p. 781-782, 1997.

_____. Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 307-322, 2000.

CROIZIER, G. *et al.* Extension of *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis virus host-range by interspecific replacement of a short dna-sequence in the p143 helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 1, p. 48-52, 1994.

CROOK, N. E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). *Viruses of invertebrates*. New York: Marcel Dekker, 1991. p.73-110.

CULLEN, B. R. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nature Immunology*, v. 3, n. 7, p. 597-599, 2002.

CRISHOLM, G.E.; HENNER, D.J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* IE-1 gene. *Journal of Virology*, v.62, p.3193-3200, 1988.

DASGUPTA, R. *et al.* Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proceedings of National Academy of Science U S A*, v. 98, p. 4910-4915, 2001.

_____. Flock house virus replicates and expresses green fluorescent protein in mosquitoes. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 1789-1797, 2003.

DE AVILA, A. C. *et al.* Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene-sequences. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 153-159, 1993.

DE HAAN, P. *et al.* The S-RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1001-1007, 1990.

_____. *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal General Virology*, v. 72, p. 2207-2216. 1991.

DIANESE, C. E. Estratégias para o desenvolvimento de resistência ampla e durável em *Solanum* (secção *lycopersicum*) a potyvírus e tospovírus. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília. 2009. 121 p.

DJIKENG, A. *et al.* RNA interference in *Trypanosoma brucei*: Cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, v. 7, p. 1522-1530, 2001.

DING, S. W. *et al.* RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research*. V. 102, p.109– 115. 2004.

DONG, X. L. *et al.* Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 77, n.12, p. 7026-7033, 2003.

DUNOYER, P. *et al.* Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virusencoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, v. 16, n. 1235-1250, 2004.

ELBASHIR, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

ELLIOTT, R. M. Molecular-biology of the *bunyaviridae*. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 501-522, 1990.

ENAMI, M.; ENAMI, K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system. *Journal Virology*, v. 74, p. 5556–5561, 2000.

ENGELHARD, E. K. *et al.* The insect tracheal system - a conduit for the systemic spread of *Autographa-californica*-M nuclear polyhedrosis-virus. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, v. 91, n. 8, p. 3224-3227, 1994.

ENGELHARD, E. K.; VOLKMAN, L. E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, v. 209, n. 2, p. 384-389, 1995.

ENGLISH, J. J. *et al.* Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell*, v. 8, n. 2, p. 179-188, 1996.

ERIC J. *et al.* Pathogenesis of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus in fifth instar *Spodoptera frugiperda*. *Journal General Virology*, v. 84, n. 2033-2040, 2003.

FAGARD, M., S. *et al.* AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National of Academy Science USA*, v. 97, p. 11650–11654, 2000.

FAUQUET, C. M. *et al.* *Bunyaviridae*. In: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virology Division. International Union of Microbiological Societies. Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberguer, U.; Ball, L. A. (eds.). Elsevier, Academic Press, p. 695-699, 2005.

FEDERICI, B. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). *The baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FINNEY, D. J. *Statistical method in biological assay*. 2th ed. London: Griffin, 1964. 508p.

_____. *Probit analysis*. New York: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FLORES-JASSO, C. F. *et al.* Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference. *Virus Research*, v. 102, n. 1, p. 75-84, 2004.

FRASER, M. J. The Baculovirus-infected insect cell as an eukaryotic gene expression system. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 158, p. 131–172, 1992.

_____. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, v. 95, n. 1-3, p. 189-195, 1986.

FRANCO, C. DE M. *et al.* 2006. Análise do genoma do isolado de begomovírus DFM coletado no Brasil. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. Fitopatologia Brasileira. Lavras, MG : Sociedade Brasileira de Fitopatologia,. v. 31. p. S188.

FRANZ, A. W. E. *et al.* Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* v. 103, p. 4198-4203, 2006.

FRIESEN, P. D.; MILLER, L. K. The regulation of baculovirus gene expression. In: Doerfler, W. (ed.). *The molecular biology of baculoviruses*. Springer-Verlag: New York, 1986, p. 31-49.

_____. Divergent transcription of early 35-kilodalton and 94-kilodalton protein genes encoded by the hindiii k-genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, v. 61, n. 7, p. 2264-2272, 1987.

GARCIA, S. A. *et al.* Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 1985-1989, 2006.

GARCIA, S. A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, v. 279, n. 2, p. 375-384, 2001.

GHOSH, S. *et al.* The host factor polyhedrin promoter binding protein (PPBP) is involved in transcription from the baculovirus polyhedrin gene promoter. *Journal of Virology*, v. 72, n. 9, p. 7484-7493, 1998.

GITLIN, L. *et al.* Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, v. 418, n. 6896, p. 430-434, 2002.

GOMI, S. *et al.* Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1323-1337, 1999.

GRACE, T. D. C. Establishment of a line of cells from silkworm *Bombyx mori*. *Nature*, v. 216, n. 5115, p. 613-616, 1967.

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

GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. The biology of baculoviruses, vol. I e II. In: Granados, R. R.; Federici, B. A., (Eds.) *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton: Academic press, 1986. p. 61-88.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.89-108.

GRANADOS, R. R. *et al.* A new insect-cell line from *trichoplusia ni* (bti-tn-5b1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, n. 3, p. 260-266, 1994.

GRAMKOW A.W. *et al.* Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses. *Virology Journal*, v. 7, n. 143, 2010. <http://www.virologyj.com/content/7/1/143>.

- GREENE, G. L. *et al.* Velvetbean caterpillar - (Lepidoptera, Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.
- GRISHOK, A. *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, v. 106, p. 23-34, 2001.
- GROENER, A. *et al.* Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with 2 nonpermissive cell-lines. *Intervirology*, v. 21, n. 4, p. 203-209, 1984.
- GRULA, M. A. *et al.* Alpha-amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*, v. 38, n. 3, p. 916-921, 1981.
- HAAS-STAPLETON, E. J. *et al.* *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 1349-1355, 2005.
- HAINES, F. J. *et al.* Baculovirus Expression Vectors. In: MAHY B.; VAN REGENMORTEL M. (eds.). *Encyclopedia of Virology*. 3th ed. London: Elsevier. 2006. p. 451-454
- HAJÓS, J. P. *et al.* Dissecting insect development: baculovirus mediated gene silencing in insects. *Insect Molecular Biology*, v. 8, n. 4, p. 539-544, 1999.
- HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, v. 286, n. 5441, p. 950-952, 1999.
- HANNON, G. J. RNA interference. *Nature*, v. 418, n. 6894, p. 244-251, 2002.
- HAMMOND, S. M. *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v. 404, p. 293-296, 2000.
- _____. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, v. 293, p. 1146-1150, 2001.
- HARRAP, K. A. Structure of nuclear polyhedrosis viruses .2. Virus particle. *Virology*, v. 50, n. 1, p. 124-&, 1972.
- HARRAP, K. A.; LONGWORT, J. F. Evaluation of purification methods for baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 24, n. 1, p. 55-62, 1974.
- HAYAKAWA, T. *et al.* Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*, v. 262, p. 277-297, 1999.
- HAWTIN, R. E. *et al.* Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infected insects is dependent on the integrity of virus encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, v. 238, n. 2, p. 243-253, 1997.

HEMMES, H. *et al.* The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *Rna-Publication of the Rna Society*, v. 13, n. 7, p. 1079-1089, 2007.

HEMMES, H. Strategies underlying RNA silencing suppression by negative strand RNA viruses. Tese de Doutorado. 2007. Wageningen University, Holanda. 107 p.

HERNIOU, E. A. *et al.* Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal Virology*, vol. 75, p. 8117–26, 2001.

_____. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review Entomology*, vol. 48, p. 211-234, 2003.

HINK, W. F. Established insect cell line from cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*, v. 226, n. 5244, p. 466-&, 1970.

HITCHMAN, R. B. *et al.* Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 96, n. 4, p. 810-814, 2007.

HOFMANN, C. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 92, n. 22, p. 10099-100103, 1995.

HOGENHOUT, S. A. *et al.*, Insect vector interaction with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 46, p. 327-359, 2008.

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

HU, Z. H. *et al.* Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1045-1053, 1999.

HUANG, Y. *et al.* Baculovirus-mediated gene silencing in insect cells using intracellularly produced long double-stranded RNA. *Journal of Biotechnology*, v. 128, n. 2, p. 226-236, 2007.

HUGHES, K. M.; ADDISON, R. B. Two nuclear polyherosis virus of the Douglasfir tussock moth. *Journal Invertebrate Pathology*, v.16, p. 196–204, 1970.

IGNOFFO, C. M. Development of a viral insecticide: concept to commercialization. *Experimental Parasitology*, vol. 33, p. 380–406, 1973.

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

- INCEOGLU, B. A. *et al.* Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, vol 57, p. 981-987, 2001.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. ICTVdB - The universal virus database. 2010.
- IKEGAMI, T. *et al.* Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs promotes viral RNA replication and transcription in a minigenome system. *Journal of Virology*, v. 79, n. 9, p. 5606-5615, 2005.
- IWANAGA, M. *et al.* Expression profiling of baculovirus genes in permissive and nonpermissive cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 323, n. 2, p. 599-614, 2004.
- JARVIS, D. L. The Baculoviruses. In: Miller, L.K. (ed.). New York: Plenum Press. 1997. p. 389-431.
- JASNY, B. R. Insect viruses invade biotechnology. *Science*, vol. 238, p. 1653, 1988.
- JEHLE, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, 2006.
- JIANG, S. S. *et al.* Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus. *Journal of Virology*, v. 80, n.18, p. 8989-8999, 2006.
- JIN, L. H. *et al.* The evolutionary study of small RNA-directed gene silencing pathways by investigating RNase III enzymes. *Gene [S.I.]*, v. 435, n. 1-2, p. 1-8, 2009.
- JOHANSEN, L. K.; CARRINGTON, J. C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology*, v. 126, n. 3, p. 930-938, 2001.
- JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AGMNPV-2) DNA. *Journal of General Virology [S.I.]*, v. 70, p. 1877-1883, 1989.
- JONES, D. R. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, v. 113, n. 2, p. 119-157, 2005.
- KAMITA, S. G.; MAEDA, S. Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis-virus (NPV) replication by the putative DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. *Journal of Virology*, v. 67, n. 10, p. 6239-6245, 1993.
- KAMITA, S. G. *et al.* Genetically modified baculoviruses for pest insect control. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. p.271-322. 2005. Oxford, UK: Elsevier Science.

- KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, v. 95, n. 461-470, 1998.
- KASSCHAU, K. D. *et al.* P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Development Cell*, v. 4, p. 205-217, 2003.
- KATOU, Y. *et al.* Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: Defective nuclear transport of the virions. *Virology*, v. 347, n. 2, p. 455-465, 2006.
- KELLY, D. C.; LESCOTT, T. Baculovirus replication: protein synthesis in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *Microbiologica*, v.4, p. 35-57, 1981.
- KENNERDELL, J. R. *et al.* RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes & Development*, v. 16, p. 1884-1889, 2002.
- KIM, H. S. *et al.* High-level expression of a foreign gene by a recombinant baculovirus with an expanded host range. *Cytotechnology*, v. 32, n. 2, p. 87-92, 2000.
- KHOO, C. C. *et al.* RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *Microbiology* v. 10, n. 130, 2010.
- KHVOROVA, A. *et al.* Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, v. 115, p. 209-216, 2003.
- KIM, S. S. *et al.* RNAi-mediated CCR5 Silencing by LFA-1-targeted Nanoparticles Prevents HIV Infection in BLT Mice. LFA-1-targeted siRNA Delivery. *Molecular Therapy* v.18, p. 370-376, 2010.
- KNIGHT, S. W.; BASS, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 293, p. 2269-2271, 2001.
- KJEMTRUP, S. *et al.* Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100, 1998.
- KIRKPATRICK B. A. *et al.* AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *Journal Invertebrate Pathology*, v. 72, n.1, p. 63-72, 1998.
- KNUDSON, D. L.; HARRAP, K. A. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: microscopy study of the sequence of events of the virus infection. *Journal of Virology*, v. 17, p. 254-268, 1976.
- KONDO, A.; MAEDA, S. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis-virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Virology* [S.I.], v. 65, n. 7, p. 3625-3632, 1991.
- KORMELINK, R. *et al.* The nucleotide-sequence of the M RNA segment of tomato *Spotted wilt*

virus, a bunyavirus with 2 ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 790-790, 1993.

_____. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* is associated with fibrous structures in infected-plant cells. *Virology*, v. 181, n. 2, p. 459-468, 1991.

KORMELINK, R. J. M. *Structure and expression of the Tomato spotted wilt virus genome, a plant-infecting bunyavirus*. 1994. 143p. Tese (Doutorado) - Universidade de Wageningen, Holanda.

KOOTER, J. M. *et al.* Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Science*, v. 4, n. 9, p. 340-347, 1999.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 4, p. 173-180, 2002.

KRUG, R. M. *et al.* Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, v. 309, n. 181-189, 2003.

KUNIMI, Y. *et al.* Comparison of wild type and genetically engineered nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* for mortality, virus replication and polyhedra production in *Trichoplusia ni* larvae. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, v. 81, n. 3, p. 251-257, 1996.

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

LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* New microRNAs from mouse and human. *RNA*, v. 9, p. 175-179, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.

LACATUS, G.; SUNTER, G. The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*, v. 392, p. 196-202, 2009.

LAKATOS, L. G. *et al.* Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by the p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, v. 23, n. 876-884, 2004.

LE MAY, N. *et al.* TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell*, v. 116, n. 4, p. 541-550, 2004.

LEE, H. H.; MILLER, L. K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, v. 27, n. 3, p. 754-767, 1978.

LEE, R. C. *et al.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, p. 843-854, 1993.

- LEE, D. W. *et al.* An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics*, v. 164, p. 821-828, 2003.
- LEE, Y. S. *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, v. 117, p. 69-81, 2004.
- LEE, H. J. *et al.* Development of a novel viral DNA vaccine against human papillomavirus: AcHERV-HP16L1. *Vaccine*, v. 28, n. 6, p. 1613-1619, 2010.
- LEORA SOFTWARE. *Polo PC: A user guide to Probit or Logit analysis*. Berkeley, CA: LeOra Software, 1980.
- LEVY S. M. *et al.* Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatilis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *Journal Invertebrate Pathology*, v. 96, n. 2, p.183-186, 2007.
- LEWIS, B. P. *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, v.115, p. 787-798, 2003.
- LI, H. W. *et al.* Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, v. 296, n. 5571, p. 1319-1321, 2002.
- LI, W. X.; DING, S. W. Viral suppressors of RNA silencing. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 150-154, 2001.
- LINDBO, J. A.; DOUGHERTY, W. G. Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus-replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, v. 189, n. 2, p. 725-733, 1992.
- LICHNER, Z. *et al.* Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *Journal General Virology*, v. 84, p. 975-980, 2003.
- LINGEL, A. *et al.* Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 11, n. 6, p. 576-577, 2004.
- LIPARDI, C. *et al.* RNAi as random degradation PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, v. 101, p. 297-307, 2001.
- LIU, J. D. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, v. 305, n. 5689, p. 1437-1441, 2004.
- LLAVE, C. *et al.* Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 97, p. 13401-13406, 2000.
- LOVATO, F. A. *et al.* The N protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to

- TSWV infection. *Virus Research*, v. 137, n. 2, p. 245-252, 2008.
- LU, A.; CARSTENS, E. B. Immediate early baculovirus genes transactivate the *p143* gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, v. 195, n. 2, p. 710-718, 1993.
- LU, A.; MILLER, L. K. Species specific effects of the *hcf-1* gene on baculovirus virulence. *Journal of Virology*, v. 70, n. 8, p. 5123-5130, 1996.
- LUNG, O. *et al.* Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group IINPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *Journal of Virology*, v. 76, n. 11, p. 5729-5736, 2002.
- MAEDA, S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 165, n. 3, p.1177-1183, 1989.
- MAEDA, S. *et al.* Host-range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology*, v. 67, n. 10, p. 6234-6238, 1993.
- _____. Insecticidal effects of an insect specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology*, v. 184, n. 2, p. 777-780, 1991.
- MANSUROGLU, Z. *et al.* Nonstructural NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Interacts with Pericentromeric DNA Sequences of the Host Cell, Inducing Chromosome Cohesion and Segregation Defects. *Journal of Virology*, v. 84, n. 2, p. 928-939, 2009.
- MARTIN, O.; CROIZIER, G. Infection of a *Spodoptera frugiperda* cell line with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, v. 47, n. 2, p. 179-185, 1997.
- MARTINEZ, J. *et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, v. 110, n. 5, p. 563-574, 2002.
- MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis, In: Granados, R.R.; Federici, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC. v.1, p.129-146, 1986.
- MASIC, A. microRNA and viruses. *Student Perspectives on Contemporary Virology*, v. 1, 2007. <http://homepage.usask.ca/~vim458/adviro/SPCV/miRNA/miRNA.html>.
- MCCUTCHEN, B. F. *et al.* Development of a recombinant baculovirus expressing an insect selective neurotoxin potential for pest-control. *Bio-Technology*, v. 9, n. 9, p. 848-852, 1991.
- _____. Interactions of recombinant and wild-type baculoviruses with classical insecticides and pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 90, n. 5, p. 1170-1180, 1997.

- MCLEOD, P. J. *et al.* Effectiveness of microbial and chemical insecticides on *beet armyworm* larvae on soybeans. *Journal of the Georgia Entomological Society*, v. 13, n. 3, p. 266-269, 1978.
- MEANS, J. C. *et al.* Silencing of the baculovirus *Op-iap3* gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of a apoptosis during *Orgia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. *Journal of Virology*, v. 77, n. 8, p. 4481-4488, 2003.
- MEDEIROS, R. B. *et al.* The Plant Virus *Tomato Spotted Wilt Tospovirus* Activates the Immune System of Its Main Insect Vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal Virology*, v. 78, p. 4976-4982, 2004.
- MEISTER, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, v. 15, n. 2, p. 185-197, 2004.
- METTE, M. F. *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo Journal*, v. 19, n. 19, p.5194-5201, 2000.
- MILLER, L. K. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual Review of Microbiology*, v. 42, p. 177-199, 1988.
- MILLER, L. K.; LU, A. The molecular basis of baculovirus host range. In: *The baculoviruses*. Miller, L. K. (ed.). 1997. Plenum Press: New York, p. 217-235.
- MOSCARDI, F. *Control of Anticarsia gemmatalis* Hübner on soybean with a baculovirus and selected insecticides and their effect on natural epizootics of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. 1977. 68p. Dissertação (Mestrado) – Gainesville, Universidade da Flórida. 1977.
- _____. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: Alves, S. B. (ed.). *Controle Microbiano de Insetos*, São Paulo: Ed. Manole, 1986. p. 188-202.
- _____. Use of viruses for pest control in Brazil - the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 51-56, 1989.
- _____. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, v. 44, p. 257-289, 1999.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovirus para o controle de pragas: panacéia ou realidade? *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Uberlândia, v.24, p.22-29, 2002.
- MUANGSAN, N. *et al.* Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal*, v. 38, p. 1004-1014, 2004.
- MUKHERJEE, B. *et al.* Transcriptional regulation of cell line dependent, baculovirus mediated expression of foreign genes. *DNA and Cell Biology*, v. 14, n. 1, p. 7-14, 1995.

- MURPHY, F.A. *et al.* (Eds.). *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. New York: Springer-Verlag Wien, 1995. p.104-113. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Nucleotide database: National Center for Biotechnology Information 2006.
- NAGATA, T. *et al.* Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in primary cell cultures derived from two thrips species. *Virus Research*, v. 49, p. 59-66, 1997.
- NAGATA, T. *et al.* Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt* tospovirus. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 507-515, 1999.
- NAPOLI, C. *et al.* Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.
- NICHOLSON, A. W. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *Fems Microbiology Reviews*, v. 23, n. 3, p. 371-390, 1999.
- OHKAWA, T. *et al.* A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, v. 68, n. 10, p. 6619-6625, 1994.
- OKAMURA, K. *et al.* Distinct roles for argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, v. 18, n. 14, p. 1655-1666, 2004.
- OLIVEIRA, J. V. D. *et al.* Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3233-3250, 2006.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Bio-Technology*, v. 9, n. 11, p. 1086-1089, 1991.
- O'REILLY, D. R. *et al.* *Baculovirus expression vectors. A laboratory manual*. Oxford University Press, New York. 1994. 341 p.
- PARASKEVA, C, K. *et al.* Adenovims-cell interactions early after infection *in vitro* characteristics and tumorigenicity of adenovims type 2- transfomed rat liver epithelial cells. *Journal General Virology*, v. 58, n.73-81, 1982.
- PARRELLA, G. *et al.* An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, v, 85, p. 227-264, 2003.
- PEARSON, M. N. *et al.* Identification of the *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13 p. 6126-6131, 2000.

PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (insect retrovirus) families. *Journal Virology*, vol. 76, p. 5301-5304, 2002.

PENNOCK, G. D. *et al.* Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Molecular and Cellular Biology*, v. 4, n. 3, p. 399-406, 1984.

PFEFFER, S.; VOINNET, O. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene*, v. 25, p. 6211-6219, 2006.

PINEDO, F. J. R. *et al.* Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biological Control*, v. 27, n. 3, p. 336-344, 2003.

POSSEE, R. D. Cell surface expression of Influenza virus hemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector. *Virus Research*, v. 5, n. 1, p. 43-59, 1986.

_____. Baculoviruses as expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, n. 5, p. 569-572, 1997.

PRICE, B. D. *et al.* Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings National Academy of Science U S A*, v. 93, p. 9465-9470, 1996.

PRUSS, G. *et al.* Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, v. 9, p. 859- 868, 1997.

QIAN, X. Y. *et al.* Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *Journal Virology*, v. 68, p. 2433-2441, 1994.

RAHMAN, M.; GOPINATHAN, K. P. Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines. *Virus Research*, v. 93, n. 1, p. 13-23, 2003.

RAMACHANDRAN, A. *et al.* Novel Sp family-like transcription factors are present in adult insect cells and are involved in transcription from the polyhedrin gene initiator promoter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 23440-23449, 2001.

RAPP, J. C. *et al.* Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *Journal of Virology*, v. 72, n. 12, p. 10197-10206, 1998.

RATCLIFF, F. *et al.* A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, v. 276, n. 5318, p. 1558-1560, 1997.

_____. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*,

v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001.

RECHCIGL, E. J.; RECHCIGL, N. A. Microbial Insecticides. In: *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests* (Eds.) Lewis Publishers: Boca Raton, New York. 1998. 374 p.

RHOADES, M. W. *et al.* Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, v. 110, n. 4, p. 513-520, 2002.

RIBEIRO, B. M. *et al.* Taxonomia, Caracterização Molecular e Bioquímica de Vírus. In: ALVES, S. B., Org.. *Controle microbiano de insetos*. 2th ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ. 1998. p. 481-507.

RICE, W. C.; MILLER, L. K. Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells. *Virus Research*, v. 6, p. 155-172, 1986.

RICHARDS, A. *et al.* Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Annual Review of Entomology*, v. 43, p. 493-517, 1998.

ROHRMANN G. F. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir> Disponível em Novembro de 2008.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling - transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, v. 6, n. 22, p. 3343-3353, 1992.

ROTH, B. M. *et al.* Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v. 102, p. 97-108, 2004.

RUIZ, M. T. *et al.* Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, v. 10, n. 6, p. 937-946, 1998.

SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000. 1659 p.

SAMUEL, G. *et al.* COUNCIL FOR SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH (Australia). *Investigation on "spotted wilt" of tomatoes*. Commonwealth of Australia, Council for Scientific and Industrial Research Bulletin, n. 44. 64 p. 1930.

SELLING, B. H. *et al.* Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, v. 87, p. 434-438, 1990.

SCARIA, V. *et al.* Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*, v.3, p. 68, 2006.

SCHWARZ, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, v. 115,

p. 199-208, 2003.

SHARP, P. A. RNA interference. *Genes Development*, v. 15, p. 485-490, 2001.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research*, v. 69, p. 99-165, 2007.

SLACK, J. M. *et al.* Characterization of v-cath, a cathepsin I-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 1091-1098, 1995.

SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) to 3 nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 52, n. 3, p. 453-458, 1988.

SIJEN, T. *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, v. 107, p. 465-476, 2001.

SILHAVY, D. *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*, v. 21, n. 3070-3080, 2002.

SILVEIRA, E. B. *et al.* In vivo apoptosis induction and reduction of infectivity by an *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus p35(-) recombinant in hemocytes from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hubiner) (Lepidoptera : Noctuidae). *Research in Microbiology*, v. 156, n. 10, p. 1014-1025, 2005.

SIMONS, J. F. *et al.* Association of the nonstructural protein NS(s) of *Ukuniemi virus* with the 40S ribosomal subunit. *Journal of Virology*, v. 66, n. 7, p. 4233-4241, 1992.

SMITH, G. E. *et al.* Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, n. 12, p. 2156-2165, 1983.

SMITS, P. H. *et al.* Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, v. 43, n. 1, p. 73-80, 1987.

SOLDAN, S. S. *et al.* La Crosse virus nonstructural protein NSs counteracts the effects of short interfering RNA. *Journal of Virology*, v. 79, n. 1, p. 234-244, 2005.

SULLIVAN, C. S.; GANEM, D. MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*, v. 203-207, 2005.

SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v. 4, p. 1321– 1331, 1992.

SUNTER, G.; BISARO, D.M. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*, v. 232, p. 269-280.

1997.

SUNTER, G.; BISARO, D.M., Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology* v. 305, p. 452–462, 2003.

STAIRS, G. R. Quantitative differences in susceptibility to nuclear polyhedrosis virus among larval instars of forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Hubner). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 7, n. 4, p. 427-&, 1965.

STEINHAUS, E.A. *Disease in a minor chord*. Columbus, Ohio: Ohio State University Press. 1975. 488 p.

STEINHAUS, E. A.; THOMPSON, C. G. Preliminary field trials using a polyhedrosis virus to control the alfalfa caterpillar. *Journal Economy Entomology*, v. 17, p. 355–73, 1949.

STEWART, L. M. D. *et al.* Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect specific toxin gene. *Nature*, v. 352, n. 6330, p. 85-88, 1991.

SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*, n. 1555, p. 1-56, 1987.

SUMMERS, M. D. *et al.* Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia* ou nuclear polyhedrosis virus recombinants. *Journal of Virology*, v. 34, n. 3, p. 693-703, 1980.

SUMMERS, M. D. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of midgut cells of *Trichoplusia-ni*. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 35, n. 5-6, p. 606, 1971.

SUMMERS, M. D.; VOLKMAN, L. E. Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host systems. *Journal of Virology*, v. 17, n. 3, p. 962-972, 1976.

TABARA, H. *et al.* The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, v. 99, n. 2, p. 123-132, 1999.

TAKEDA, A. *et al.* Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *Febs Letters*, v. 532, n. 1-2, p. 75-79, 2002.

TAN, F. L.; YIN, J. Q. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Research*, v. 6, p.460-466, 2004.

TANG, G. L. *et al.* A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, v. 17, n. 1, p. 49-63, 2003.

TODD, J. W. *et al.* 18 baculovirus genes, including lef-11, p35, 39k and p47, support late gene-expression. *Journal of Virology*, v. 69, n. 2, p. 968-974, 1995.

- TOMALSKI, M. D.; MILLER, L. K. Insect paralysis by baculovirus mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature*, v. 352, n. 6330, p. 82-85, 1991.
- TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Development*, v. 19, p. 517-529, 2005.
- TRINKS, D. R. *et al.* Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal Virology*. v. 79, p. 2517-2527, 2005.
- TRUDEAU, D. *et al.* Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J Virology*, v. 75, n. 2, p. 996-1003, 2001.
- ULLMAN, D. E. *et al.* Tospovirus replication in insect vector cells - immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S-RNA of *Tomato spotted wilt* tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*, v. 83, n. 4, p. 456-463, 1993.
- _____. Thrips as vectors of Tospoviruses. *Advances in Botanical Research, Vol 36*, v. 36, p. 113-140, 2002.
- VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plants defense and counter defense. *Science*, v. 292, p. 2277-2280, 2001.
- VAN DER WILK, F. *et al.* Immunogold detection of polyhedrin p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of General Virology*, v.68, p. 2615-2624, 1987.
- VAN OERS, M. M. *et al.* Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, v. 200, p. 513-523, 1994.
- VAN WEZEL, R. *et al.* Mutation of three cysteine residues in *Tomato yellow leaf curl virus*-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, n. 3, p. 203-208, 2002.
- VANITHARANI, R. *et al.* Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 100, p. 9632-9636, 2003.
- VAN DER KROL, A. R. *et al.* Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, v. 2, p.291-299, 1990.
- VARDAR-SUKAN, F.; SUKAN, S. S. *Recent advances in biotechnology*. Editora Dordrecht: Kluwer, p. 263-284. 1992.
- VARGASON, J. M. *et al.* Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, v. 115, n. 799- 811, 2003.

- VAUGHN, J. L.; DOUGHERTY, E. M. The replication of baculoviruses. In: Maramorosch, K.; Sherman, K.E. (Eds.). *Viral insecticides for biological control*. New York: Academic, 1985. p. 569-633.
- VAUGHN, J. L. *et al.* Establishment of 2 cell lines from insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae). *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association*, v. 13, n. 4, p. 213-217, 1977.
- VAUCHERET, H. *et al.* Transgene-induced Gene Silencing in Plants. *The Plant Journal*, Oxford, 16: 651-659, 1998.
- VENTER, P. A.; SCHNEEMANN, A. Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 17, p. 2675-2687, 2008.
- VERDEL, A. *et al.* RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, v. 303, p.672-676, 2004.
- VIALAT, P. *et al.* The S segment of Rift Valley fever phlebovirus (*Bunyaviridae*) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *Journal of Virology*, v. 74, n. 3, p. 1538-1543, 2000.
- VOINNET, O. *et al.* Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 24, p. 14147-14152, 1999.
- VOLKMAN, L. E. Occluded and budded *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* - immunological relatedness of structural proteins. *Journal of Virology*, v. 46, n. 1, p. 221-229, 1983.
- VOLKMAN, L. E.; GOLDSMITH, P. A. Generalized immunoassay for *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* infectivity *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 227-233, 1982.
- _____. Budded *Autographa californica* NPV 64k protein - further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparation conditions. *Virology*, v. 139, n. 2, p. 295-302, 1984.
- _____. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* by a monoclonal antibody - inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, v. 143, n. 1, p. 185-195, 1985.
- VOLKMAN, L. E.; KNUDSON. *In vitro* replication of baculoviruses. In: Granados, R. R.; Frederici, B. A. *The biology of baculoviruses*, vol. I, Biological properties and molecular biology, 1986, Boca Raton: CRC, p. 110-127.
- VOLKMAN, L. E. *et al.* Baculoviridae. Em: Murphy *et al.* (Ed.). *Virus Taxonomy*. New York:

Springer-Verlog, 1995. p. 104-111.

VOLKMAN, L. E. *et al.* Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni* - comparative neutralization, comparative infectivity, and *in vitro* growth studies. *Journal of Virology*, v. 19, n. 3, p. 820-832, 1976.

VOLPE, T. A. *et al.* Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, v. 297, p. 1833-1837, 2002.

WANG, H. *et al.* Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v. 79, p. 7410-7418. 2005.

WANG, X.; KELLY, D. C. Baculovirus Replication: Uptake of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus Particles by Insect Cells. *Journal of General Virology*, v. 66, p. 541-550. 1985.

WANG, X. Z. *et al.* Baculovirus vectors for multiple gene-expression and for occluded virus production. *Gene*, v. 100, p. 131-137, 1991.

WANG, Z. F. *et al.* Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 51, p. 40174-40179, 2000.

WASHBURN, J. O. *et al.* Comparative pathogenesis of *Autographa californica M nuclear polyhedrosis* virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology*, v. 209, n. 561-568, 1995.

WASSENEGGER, M. *et al.* RNA directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* v. 76, p. 567-576, 1994.

WASSENEGGER, M; PÉLISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology*, v. 37, n. 2, p. 349-362, 1998.

_____. RNA-directed DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, v. 43, ns. 2-3, p. 203-220, 2000.

WATERHOUSE, P. M. *et al.* Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Plant Biology*, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

_____. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, v. 411, p. 834-842, 2001.

WIJKAMP, I. *et al.* Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 341-349, 1993.

_____. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, v. 85, n. 10, p.1069-1074, 1995.

- WILLIAMS, G. V. *et al.* A cytopathological investigation of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* p10 gene function using insertion deletion mutants. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 187-202, 1989.
- WILSON, S. *et al.* Delivery of vaccine peptides by rapid conjugation to baculovirus particles. *Vaccine*, v. 26, n. 20, p. 2451-2456, 2008.
- WOO, S. D. *et al.* Propagation of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* in nonpermissive insect cell lines. *Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 133-138, 2007.
- WOOD, H. A.; GRANADOS, R. R. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest-control. *Annual Review of Microbiology*, v. 45, n. 69-87, 1991.
- XEROS, N. Cytoplasmic polyhedral virus diseases. *Nature*, vol. 170, p. 1073, 1952.
- XU, P. Z. *et al.* The *Drosophila* MicroRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*, v. 13, n. 9, p. 790-795, 2003.
- XIE Z. *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, v. 2, p. 642-652, 2004.
- ZANOTTO P. *et al.* Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal Invertebrate Pathology*, vol. 62, p.147-164, 1993.
- YADANI, F. Z. *et al.* The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *Journal of Virology*, v. 73, n. 6, p. 5018-5025, 1999.
- YIN, F. *et al.* A Functional F Analogue of *Autographa californica Nucleopolyhedrovirus* GP64 from the *Agrotis segetum Granulovirus*. *Journal of Virology*, v. 82, n. 17, p. 8922-8926, 2008.
- YOKOTAA, S. *et al.* Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology*, v. 338, p.173-181, 2005.

Sobre a autora



Virgínia Carla de Oliveira nasceu em 11 de Dezembro de 1976, em Goianésia, Goiás. Após terminar o ensino fundamental em 1992, em Itapaci, Goiás, cursou o ensino médio em Goiânia. O ano de 1996 foi o marco inicial de sua licenciatura e bacharelado em Biologia na Pontifícia Universidade Católica de Goiás. No terceiro período do curso, a iniciação científica a levou ao centro de pesquisas da Embrapa Arroz e Feijão, localizado no município de Santo Antônio de Goiás, a 30 km de Goiânia. Lá, trabalhou, por seis anos, em projetos na área de fitopatologia e biologia molecular, com bolsas de diversas modalidades (CNPq, Bayer, Funape/UFG). Nesse período, lecionou, por um semestre, na Universidade Estadual de Goiás.

O mestrado, em 2003, foi cursado na Universidade Federal de Sergipe, em Aracaju. A dissertação “Atividade enzimática, população e análise de DNA da biodiversidade microbiana do solo em agroecossistemas do Semiárido”, na área de microbiologia, foi desenvolvida na Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Após o mestrado, foi bolsista na modalidade DTI/CNPq e participou dos seguintes projetos: “Análise de DNA como bioindicador da qualidade de solos submetidos a diferentes sistemas de recuperação da Mata Atlântica”, “Desenvolvimento da cultura de tecido para o coco” e “Diagnose e controle das principais doenças do coqueiro em Sergipe”, no plano de ação “Uso de marcadores moleculares para a diagnose das principais doenças do coqueiro”.

Finalmente, em 2006, retornou à academia para cursar doutorado em biologia molecular, na Universidade de Brasília, laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia, com o apoio da Capes, do CNPq e da FAP-DF.