



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Patologia dos baculovírus: Efeito da ação de
enzimas heterólogas e análise da resposta
transcricional do hospedeiro durante a
infecção viral**

Aline Welzel Gramkow

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Tese apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 13 de agosto de 2010.



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Patologia dos baculovírus: Efeito da ação
de enzimas heterólogas e análise da
resposta transcricional do hospedeiro
durante a infecção viral**

Aline Welzel Gramkow

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

**Tese apresentada ao Departamento
de Pós-Graduação em Patologia
Molecular, da Faculdade de Ciências
da Saúde da Universidade de
Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Doutor em Patologia Molecular.**

Brasília, 13 de agosto de 2010.

ÍNDICE

Figuras	vii
Tabelas.....	viii
Citação.....	x
Agradecimento a Deus.....	xi
<i>In memoriam</i>	xii
Dedicatória	xiii
Agradecimentos gerais	xiv
Abreviaturas e símbolos	xvii
Resumo	xix
Abstract.....	xx
Introdução.....	023
Revisão bibliográfica.....	026
A. Baculovírus	026
B. Modo de infecção <i>in vivo</i>	029
C. Regulação da expressão gênica.....	032
D. Baculovírus como vetor de expressão: AcMNPV	033
E. <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AgMNPV)	037
F. Baculovírus recombinante para controle biológico	040
G. Proteases.....	043
I. Classificação	043
II. Queratinase	045

III. Catepsina-L	046
IV. Quitinase	047
H. Sistema Imune de insetos	050
Capítulo I	056
1. Introdução	056
2. Objetivos	060
3. Materiais e Métodos	060
3.1. Vírus e células	060
3.2. Construção dos plasmídeos e vírus recombinantes	061
3.3. Bioensaios	063
3.4. Análise estrutural e ultraestrutural dos tecidos internos de larvas <i>S. frugiperda</i> infectadas	064
3.5. Ensaio para atividade de fenoloxidase	065
3.6. Ensaio para atividade de quitinase	065
4. Resultados	067
4.1. Construção dos plasmídeos e dos vírus recombinantes	067
4.2. Bioensaios	069
4.3. Análise estrutural e ultraestrutural dos tecidos das larvas <i>S. frugiperda</i> infectadas com os diferentes vírus	073
4.4. Atividade de fenoloxidase	077

4.5. Atividade de quitinase.....	079
5. Discussão.....	080
Capítulo II	086
1. Introdução.....	086
2. Objetivo.....	092
3. Materiais e Métodos.....	092
3.1. Vírus.....	092
3.2. Insetos.....	093
3.3. Extração do RNA total e síntese dos cDNAs.....	093
3.4. Hibridização subtrativa e obtenção de bibliotecas subtraídas.....	094
3.5. Sequenciamento dos cDNAs e geração de ESTs.....	095
3.6. Processamento das ESTs, anotação e análise de expressão diferencial....	096
3.7. PCR em tempo real (qPCR).....	096
4. Resultados.....	098
4.1. Síntese das fitas de cDNAs e ensaio de RDA.....	098
4.2. Análise das sequências dos clones obtidos.....	101
4.3. PCR em tempo real (qPCR).....	116
5. Discussão.....	118
Perspectivas.....	124
Referências bibliográficas.....	125

FIGURAS

Figura 1: Ultraestrutura de um baculovírus.....	027
Figura 2: Esquema da infecção de uma larva de um inseto da ordem Lepidóptera por baculovírus, <i>in vivo</i>	031
Figura 3: Foto de uma larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	039
Figura 4: Foto de uma larva de <i>Spodoptera frugiperda</i>	059
Figura 5: Esquema mostrado o gene da poliedrina do vírus selvagem AcMNPV e os diferentes vírus recombinantes.	068
Figura 6: Análise estrutural da cutícula de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas pelo AcMNPV selvagem e recombinantes.....	074
Figura 7: Esquema mostrando uma lagarta de <i>S. frugiperda</i> não infectada.....	075
Figura 8: Análise estrutural dos tecidos internos de larvas de <i>S. frugiperda</i>	076
Figura 9: Ultraestrutura de intestinos de larvas <i>S. frugiperda</i> infectadas com os vírus 96 h p.i.	077
Figura 10: Atividade de fenoloxidase em hemolinfa de <i>S. frugiperda</i> infectada.....	078
Figura 11: Atividade quitinolítica de amostras de poliedros de AcMNPV e vSynQuit.	079
Figura 12: Esquema da metodologia de RDA	088
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5% da segunda fita de cDNAs <i>driver</i> e produtos diferenciais corados com brometo de etídeo.	099
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos diferenciais corados com brometo de etídeo	101
Figura 15: Sequência de nucleotídeos do gene e de aminoácidos da proteína do cognato de choque térmico de 70 kDa de <i>A. gemmatalis</i>	115
Figura 16: PCR em tempo real (qPCR) do gene hsc	117

TABELAS

Tabela 1: Valores de TL ₅₀ para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat injetados em larvas de <i>S. frugiperda</i> 3º ínstar.	070
Tabela 2: Valores de TL ₅₀ para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit injetados em larvas de <i>S. frugiperda</i> 3º ínstar.	071
Tabela 3: Valores de CL ₅₀ para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat em larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> infectadas oralmente com poliedros.	071
Tabela 4: Valores de CL ₅₀ para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit em larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> infectadas oralmente com poliedros.	072
Tabela 5: Valores de TL ₅₀ para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat em larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> infectadas oralmente com poliedros	072
Tabela 6: Valores de TL ₅₀ para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit em larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> infectadas oralmente com poliedros	073
Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados nas etapas do RDA, sequenciamento, clonagem e PCR em tempo real	097
Tabela 8: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtrativa obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas e não infectadas, mostrando genes reprimidos quando utilizado o AcMNPV como <i>driver</i>	103
Tabela 9: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas e não infectadas, mostrando genes induzidos quando utilizado o AcMNPV como <i>tester</i>	105

Tabela 10: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas e não infectadas, mostrando genes reprimidos quando utilizado o AgMNPV como <i>driver</i>	107
Tabela 11: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas e não infectadas, mostrando genes induzidos quando utilizado o AgMNPV como <i>tester</i>	110
Tabela 12: Transcritos gênicos e frequência obtidos pelo sequenciamento através da técnica RDA	111
Tabela 13: Produtos gênicos e funções dos transcritos obtidos do sequenciamento da biblioteca subtrativa obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas e não infectados	112

"Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos.
Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não
usado. Preocupe-se não com o que você tentou e falhou, mas com
aquilo que ainda é possível você fazer."

Papa João XXIII.

"Deus é meu amparo, minha fortaleza, meu consolo forte na
tribulação."

SALMO 46.1

In memoriam

Da minha avózinha, que sinto tantas saudades...

*Ao meu querido marido Daniel, meus queridos pais, Almiro e
Sílvia e minha querida irmã Alessandra*

*Dedico de todo o meu coração, por toda força e confiança
depositada, em todos os momentos ...*

DEDICO

Agradecimentos gerais

A DEUS que me deu a vida e a oportunidade de realização dessa pesquisa, o que seria de nós sem fé!

Ao meu querido e amado marido Daniel, que mesmo nos momentos de desânimo, me levantou e incentivou a continuar. Obrigada por toda a ajuda e amor, pelos conselhos dados, mesmo nos momentos angustiantes. Amo você!

Aos meus pais, Almiro e Silvia, por serem meu porto seguro, por toda a confiança depositada, por todo carinho, amor e ânimo, fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

A minha irmã Ale, obrigada por tudo! Por cada momento de coragem e por seu ombro amigo sempre presente! Nossas conversas foram fortificantes!

Ao meu orientador Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por toda confiança depositada, por toda a paciência e orientação na minha formação acadêmica e profissional, meu obrigado!

Aos meus sogros Heinz e Márcia por todas as conversas, correções ortográficas e preocupações. E também a todos os Gramkow por toda a ajuda. Obrigada!

A toda minha família que está longe, meu querido avô, tios, tias, primos por todo o incentivo e curiosidade pelo meu trabalho.

Às minhas queridas amigas Bel e Carla por todo o apoio e amizade durante todos esses anos. Obrigada por toda a paciência de me escutarem em muitos momentos difíceis e me aconselharem.

Aos meus amigos dos Jovens Mais, ao Pastor Bolla, Pastor Joachim, Pastor Daniel que de alguma forma participaram dessa minha caminhada. Também agradeço

ao grupo de Estudo Bíblico Comunhão em Família da Igreja Evangélica Luterana e grupo de dança. Obrigada por toda a torcida e curiosidade sobre meu trabalho.

À minha amiga Anabele, por toda amizade, “comidinhas”, conversas e amadurecimento que tivemos durante todos esses anos, espero de coração que nossa amizade seja eterna! À minha amiga Bruna de igual forma, por toda a amizade e companheirismo, consolo durante essa jornada e claro, não por última à minha amiga Dra. Gláucia, plena em sua bondade, obrigada pela amizade, por todos os conselhos e puxões de orelha.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, os mais antigos Su, Aninha, Maria (Obrigada meninas, por tudo!), Roberto, Raimundo, Bruno, Breno, Tati, Dani (muito obrigada pela hospedagem e conversas que tivemos!), Greice, Lorrainy, Virginia, Raíssa, Clarinha e os mais novos, Raul, Raphael, Mari, Carol, Daniel, Fabrício, Briana, Lorena.

À querida Érica e Paulo, obrigada por toda a ajuda profissional incondicional, indispensáveis ao trabalho, por todas as dicas e desabafos e também ao Vinícius e Dra. Rose pela ajuda e pelos insetos

Aos professores do Laboratório de Microscopia Eletrônica Sônia e Renato pela ajuda quando era necessária.

Ao grupo da Universidade de Goiânia, principalmente Dra Célia e Dr Alexandre pela ajuda com RDA e qPCR.

A todos do Núcleo de Controle Biológico e da criação de insetos, que me forneceram os insetos.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Alessandro, Jaqueline por todos os esclarecimentos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em contribuir com nosso trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação, considerando que essa tese é fruto de uma caminhada de muitos anos, agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram dessa construção, que não mediram esforços para me apoiar e que continuaram de braços abertos, muito obrigada!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	DNA complementar
CL ₅₀	Concentração Letal em 50% das larvas
df	graus de liberdade
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNS	ácido dinitrosalicílico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESTs	Expressed sequence tag
g	grama
GlcNac	N-acetilglucosamina
h	hora
h p.i.	horas pós-infecção
IM	Intestino médio
kDa	quilodalton
KDEL	Possível sinal de localização no retículo endoplasmático (K -Lisina, D - ácido aspártico, E - ácido glutâmico e L - leucina).
L	litro
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LF	Limite fiducial
M	molar: mol/l
mg	miligrama
nL	nonolitro
µg	micrograma = 10 ⁻⁶ grama

mL	mililitro
μL	microlitro = 10^{-6} litro
μM	micromolar (micromol por litro)
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pfu	Unidade formadora de placa
pH	potencial de hidrogênio
qPCR	PCR em tempo real
RDA	Análise de Diferença Representacional
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
s	segundo
SD	desvio padrão
T	Traquéia
TD	média do tempo de morte
TL ₅₀	Tempo letal em 50% das larvas
TG	Tecido gorduroso
TM	Túbulo de Malphigui
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosídeo
°C	grau Celsius
χ^2	qui-quadrado

RESUMO

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus de insetos estudados no mundo, principalmente pela eficiência em matar pragas da agricultura. Neste trabalho, três baculovírus recombinantes contendo os genes ScathL (Catepsina L) de *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL), Kerat (Queratinase) do fungo *Aspergillus fumigatus* (vSynKerat) e Quit (Quitinase) do fungo *Metarhizium anisopliae* (vSynQuit) foram construídos e suas propriedades bioinseticidas analisadas em larvas de *Spodoptera frugiperda*. Bioensaios em larvas neonatas e de 3º instar de *S. frugiperda* infectadas com os baculovírus vSynScathL, vSynKerat e vSynQuit mostraram uma diminuição no tempo necessário para matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem. O vSynScathL apresentou uma TL₅₀ e TD de 47 horas e 2,62 dias, respectivamente, enquanto o AcMNPV, uma TL₅₀ de 136 horas e TD de 5,37 dias, respectivamente para larvas de *S. frugiperda* de 3º instar. Isso representa uma diminuição significativa de 65,5% para TL₅₀ e 50,09% para TD, no tempo necessário para o vírus matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem. A TL₅₀ e TD para o vírus vSynKerat foi de 91 horas e 3,70 dias, respectivamente, com uma redução de 32,8% para TL₅₀ e 30,21% para TD, no tempo necessário para o vírus matar os insetos infectados quando comparado ao vírus AcMNPV. Já, o vírus recombinante vSynQuit apresentou uma TL₅₀ de 110,67 horas, o que foi 23,6% menor do que o vírus selvagem (TL₅₀ de 144,97). Já em larvas neonatas de *S. frugiperda* o vSynScathL mostrou uma TL₅₀ de 77 horas comparado ao AcMNPV de 104 horas quando inoculado com 10² corpos de oclusão/nL, já o TD foi de 3,46 dias para o vírus recombinante e 4,16 dias para o AcMNPV. Isso representa uma redução de 26% na TL₅₀ e 16,82% para TD no tempo necessário para matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem AcMNPV. A TL₅₀ do vírus vSynKerat foi de 54 horas, com uma redução de

48% comparado ao vírus AcMNPV e o TD de 3,87 dias, reduzindo 6,97% no tempo necessário para matar os insetos; já a TL₅₀ do vírus vSynQuit foi de 86 horas, com uma redução de 45,2% comparado ao vírus selvagem e o TD de 3,75 dias comparado com o vírus selvagem de 4,43 dias, representando uma redução de 15,34% no tempo necessário para matar os insetos. Também mostramos que os vírus vSynScathL e vSynKerat foram capazes de aumentar a atividade de fenoloxidase na hemolinfa de larvas de *S. frugiperda* em relação ao vírus selvagem e à larva não infectada. A expressão de proteases em larvas infectadas resulta na destruição dos tecidos internos em estágios tardios da infecção, podendo ser uma das razões para o aumento da velocidade para matar as larvas de *S. frugiperda*, como observado na microscopia eletrônica de varredura para os vírus vSynScathL e vSynKerat em relação ao vírus selvagem e à larva não infectada. O ensaio enzimático com quitina regenerada mostrou também uma diferença quitinolítica significativa em relação aos corpos de oclusão do vírus vSynQuit em comparação ao vírus selvagem. A transcrição de genes celulares em hemócitos derivados de larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectados (12 h p.i.) pelos baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) e/ou *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) também foram analisados neste trabalho pela técnica análise de diferença representacional (RDA). Os transcritos mais abundantes encontrados foram para proteases celulares, que estão provavelmente envolvidas na resposta do inseto à infecção viral. Outros genes, como por exemplo, hsp70 e hsc70, proteínas ribossomais, aminopeptidase, beta 1,3 glicanase, proteína induzida pelo hormônio juvenil, lipase também foram detectados. Todos esses transcritos podem de alguma maneira ter um papel na defesa celular e/ou estabelecimento da infecção viral. Para confirmação dos dados obtidos pela RDA, a transcrição do gene hsc70 foi analisada por PCR em tempo real e confirmou sua expressão diferencial.

ABSTRACT

Baculovirus comprise the largest group of insect viruses most studied worldwide, mainly because they efficiently kill agricultural insect pests. In this study, tree recombinant baculoviruses containing the ScathL gene (Cathepsin L) from *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL), the Kerat gene (Keratinase) from the fungus *Aspergillus fumigatus* (vSynKerat) and Quit gene (Chitinase) from the fungus *Metarhizium anisopliae* (vSynQuit) were constructed and their insecticidal properties analysed against *Spodoptera frugiperda* larvae. Bioassays of third-instar and neonate *S. frugiperda* larvae with vSynScathL, vSynKerat and vSynQuit showed a decrease in the time needed to kill the infected insects when compared to the wild type virus. The vSynScathL showed LT₅₀ and TD of 47 hours and 2.62 days respectively, while AcMNPV, a LT₅₀ of 136 hours and TD of 5.37 days, respectively for third-instar *S. frugiperda* larvae. This represents a significant decrease (from 65.5% for LT₅₀ and 50.09% for TD) in the time required to kill the virus infected insects compared to wild virus. The LT₅₀ and TD for vSynKerat was 91 hours and 3.70 days, respectively, showing also a reduction (32.8% for LT₅₀ and 30.21% for TD), in the time required to kill the virus infected insects compared to AcMNPV. Also, the vSynQuit in another bioassay, showed a LT₅₀ of 110.67 hours, which was 23.6% lower than the wild type virus (LT₅₀ of 144.97 hours). Using neonate larvae of *S. frugiperda*, the vSynScathL showed a LT₅₀ 77 hours compared to 104 hours of AcMNPV when inoculated with 10² occlusion bodies/nL, since the TD was 3.46 days for the recombinant virus and 4.16 days for AcMNPV. This represents a 26% reduction in LT₅₀ and 16.82% for TD compared to wild type virus AcMNPV. The LT₅₀ of the virus vSynKerat was 54 hours with a 48% reduction compared to AcMNPV and in the TD of 3.87 days, 6.97%; with vSynQuit the LT₅₀ was 86 hours, with a reduction of 45.2% compared to the wild virus

and TD of 3.75 days compared with 4.43 days for wild type virus, a reduction of 15.34%. We have also shown that vSynScathL and vSynKerat were able to increase phenoloxidase activity in the hemolymph of *S. frugiperda* larvae compared with the wild type virus and with larvae not infected. The expression of proteases in infected larvae resulted in destruction of internal tissues late in infection, which could be the reason for the increased viral speed of kill, as observed in scanning electron microscopy for viruses vSynScathL and vSynKerat compared to the wild type virus and uninfected larvae. The enzyme assay with regenerated chitin also showed a significant chitinolytic difference with occlusion bodies of the vSynQuit compared to wild type virus. The transcription of cellular genes in hemocytes derived from infected larvae of *Anticarsia gemmatalis* (12 h p.i.) by *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and/or *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) were also analyzed in this work by the representational difference analysis (RDA). Transcripts more abundant were cellular proteases, which are probably involved in insect response to viral infection. Other genes, such as hsc70 and hsp70, ribosomal proteins, aminopeptidase, beta 1.3 glucanase, protein induced by juvenile hormone, lipase were also detected. All of these transcripts can somehow play a role in cellular defense and/or establishment of viral infection. To confirm the data obtained by RDA, the hsc70 gene transcription was analyzed by real time PCR and confirmed their differential expression.

INTRODUÇÃO

A produção agrícola no mundo sofre perdas significativas devido ao ataque de insetos. Esse ataque é um importante fator na redução da produção de várias culturas, sendo necessário algum tipo de controle da população do inseto-praga para sua diminuição (Turnipseed & Kogan, 1987). Isso leva à utilização, pelos agricultores, de inseticidas químicos em doses elevadas, a fim de assegurar os níveis de produção. Além de causar resistência às pragas com o uso constante dessas substâncias, os pesticidas causam danos ao meio ambiente e à saúde humana, demandando alto investimento financeiro.

Novas alternativas no controle de pragas e doenças tornam-se necessárias a fim de minimizar os efeitos causados pelo uso de inseticidas químicos. Alternativas seguras e mais econômicas são possíveis com o uso de agentes biológicos (Szewczyk *et al.*, 2008). Os bioinseticidas, por serem mais seletivos, mais seguros ao aplicador e por não poluírem o meio ambiente como os agrotóxicos, são alternativas verdadeiramente ecológicas e sustentáveis, que contribuem para manter o equilíbrio biológico (Secchi, 2002). Estes são mais seletivos, possuem maior tempo de vida útil, dado à dificuldade da praga se tornar resistente ao seu uso, além de serem mais específicos e menos poluentes. Porém, em contrapartida, exigem estudos mais aprofundados, tanto no isolamento de novos patógenos como nos testes de seleção, produção e formulação. Vários países utilizam bioinseticidas para controle de pragas da lavoura e esses agentes, atualmente, representam mais de 2% do mercado de inseticida do mundo (Ribeiro *et al.*, 1998; Szewczyk *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008).

Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (Souza *et al.*, 2002). Estes têm sido estudados como agentes de controle biológico desde a década de 60 (Payne, 1986) e compreendem o maior grupo de vírus de insetos, tendo grande potencial como agentes de controle biológico de insetos-praga na agricultura e em áreas florestais (Martignoni, 1984; Payne, 1986; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1993; Moscardi, 1998).

A vantagem em utilizar os baculovírus é por serem específicos em relação ao seu hospedeiro e inofensivos aos humanos. O caso de maior sucesso mundial no uso de controle biológico é o uso do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) contra a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), quando, na safra de 2003/2004, por volta de dois milhões de hectares de plantação de soja no País foram tratados com formulações desse vírus (Moscardi, 1999; Moscardi & Santos, 2005). Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatalis*, comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até atingirem o seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (Gallo *et al.*, 2002).

Além disso, existem outros programas em países como Rússia e China e também para outras pragas no Brasil, como *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera litoralis* (Melo & Azevedo, 1998). Um programa brasileiro resulta no combate à lagarta do cartucho do milho (*S. frugiperda*), coordenado pela Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas/MG. Essa lagarta é a principal praga da cultura do milho, podendo reduzir a produção de grãos em até 52%. Muitos hectares já foram tratados com *Spodoptera*

frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV), produzido na forma de pó molhável (Valicente, 2009).

Para aumentar a velocidade de morte das larvas, baculovírus recombinantes têm sido construídos, aumentando a sua propriedade bioinseticida. Uma maneira de melhorar a virulência dos baculovírus é a inserção de genes de hormônios e/ou proteases no genoma dos baculovírus contra seus hospedeiros.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. Baculovírus

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus de insetos já estudado, sendo usados como agentes de controle biológico (Martignoni, 1984; Payne, 1986; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1993; Moscardi, 1998; Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2008), como vetores de expressão (Luckow & Summers, 1988; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Bonning & Hammock, 1996; Jarvis *et al.*, 1997; Condreay *et al.*, 2007) e como possíveis vetores de terapia gênica (Tani *et al.*, 2003; Van Oers *et al.*, 2006; Raty *et al.*, 2008). Uma das razões pelas quais vários grupos de pesquisa estudam baculovírus como uma ferramenta biotecnológica é a sua segurança, pois são altamente específicos a uma ou a poucas espécies de insetos relacionadas, não afetando outros organismos (Gröner, 1986). O uso dos baculovírus como agente de controle biológico é facilitado pela característica desses vírus de serem encapsulados em uma oclusão cristalina de natureza protéica, que confere proteção aos vírions no meio ambiente e permite a formulação de biopesticidas com fácil tecnologia de aplicação, representando economia e segurança em relação aos inseticidas químicos (Castro *et al.*, 1999).

São vírus com DNA de dupla fita, circular, superenovelados (*supercoiled*), pertencentes à família *Baculoviridae*, possuindo um ou mais vírions com envelope em formato de bastão (báculo), contendo no seu genoma entre 80 e 200 kilobases (kb) (Lauzon *et al.*, 2006). O nome *Baculoviridae* tem origem a partir da palavra latina *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma das partículas virais desta família

(Fields *et al.*, 2001). Possuem uma característica única entre os vírus conhecidos, por apresentarem dois fenótipos distintos durante um único ciclo de infecção: o BV ou vírus extracelular (BV do inglês *budded virus*), que é responsável pela transmissão do vírus de célula a célula; e o OB, vírus ocluso ou corpo de oclusão (OB do inglês *occlusion body*) (Smith *et al.*, 1983), sendo responsável pela transmissão horizontal do vírus de inseto a inseto (Figura 1).

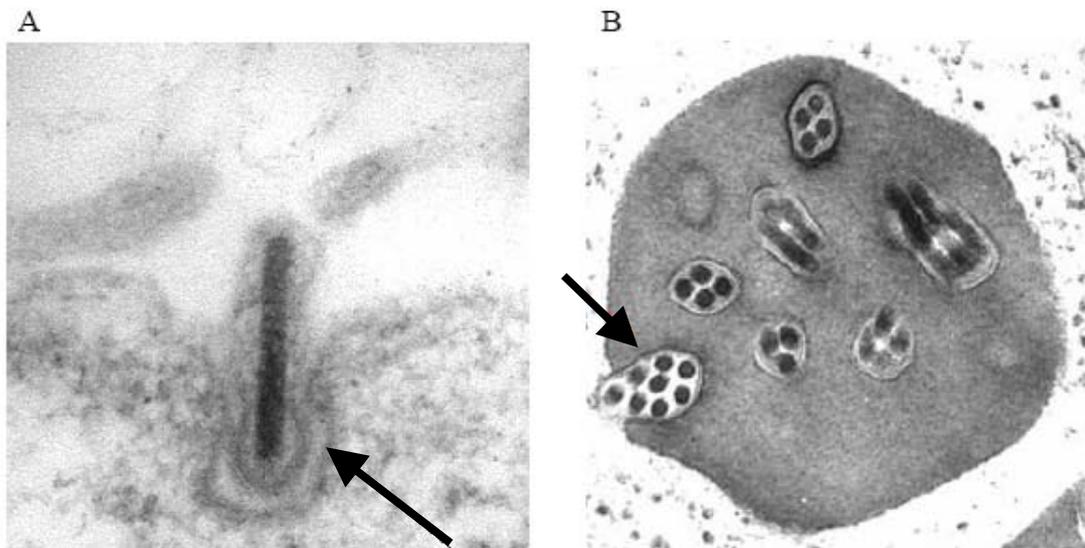


Figura 1: Ultraestrutura de um baculovírus. (A) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma partícula viral extracelular (*budded virus* – BV) entrando em uma célula por endocitose. (B) A figura mostra através de microscopia eletrônica de transmissão as partículas virais oclusas (ODV) em uma matriz protéica (corpo de oclusão, OB ou poliedro). A seta em A mostra uma partícula viral extracelular e em B mostra múltiplas partículas virais envelopadas (vírus oclusos) no interior de um poliedro. (Fontes: foto A: adaptada de www.chegue.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo2.gif e foto B: cedida pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro).

Na década de 90, a classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus dividiu a família *Baculoviridae* em apenas dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, composto pelos NPV, e *Granulovirus*, compreendendo os GV (Murphy *et al.*, 1995; Theilmann *et al.*, 2005).

Os NPV possuem corpos de oclusão poliédrica (PIB), também chamados de poliedros, variando seu diâmetro de 0,15 a 15 µm (Bilimoria, 1991) e contendo vários vírions. Sua principal proteína é denominada poliedrina, com massa molecular em torno de 30.000 daltons (Summers *et al.*, 1980), correspondendo a cerca de 95% do seu conteúdo protéico (Maruniak, 1986). Os vírus desse gênero podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (*Single nucleopolyhedrovirus* - SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (*Multiple nucleopolyhedrovirus* - MNPV) (Bilimoria, 1991; Theilmann *et al.*, 2005), enquanto os GV são caracterizados pela forma ovicilíndrica do corpo de oclusão, denominado grânulo, com cerca de 0,3 x 0,5 µm (Crook, 1991) e geralmente possuem um ou raramente dois a três vírions por grânulo. Assim como a poliedrina, a granulina é o principal componente protéico do grânulo. Os GV ainda são pouco estudados, devido a limitações no tocante à replicação viral em cultura de células, (Winstanley & Crook, 1993) e por possuírem uma restrita gama de hospedeiros (Dwyer & Granados, 1988; Funk & Consigli 1992; Winstanley & Crook 1993). Por sua vez, os NPV são encontrados em mais de 700 espécies hospedeiras documentadas para esse tipo de vírus (Moscardi, 1999; Herniou & Jehle, 2007) e diferentes linhagens de células de inseto em cultura susceptíveis foram descritas (Miller, 1997).

Baseando-se em estudos filogenéticos de baculovírus, utilizando o gene da poliedrina, os NPV foram classificados em grupo I e grupo II (Zanotto *et al.*, 1993; Herniou *et al.*, 2003).

A maioria dos baculovírus tem sido isolada a partir de lepidópteros, com centenas de espécies confirmadas como hospedeiras. Além de lepidópteros, os baculovírus também infectam himenópteros e dípteros (Theilmann *et al.*, 2005).

Análise dos genomas de 29 baculovírus demandou uma revisão na classificação e taxonomia da família *Baculoviridae*. De acordo com a nova classificação

proposta, existem quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, NPV Lepidópteros específicos; *Betabaculovirus*, GV Lepidópteros específicos; *Gammabaculovirus*, NPV himenópteros específicos; e NPV *Deltabaculovirus*, dípteros específicos (Cartens & Ball, 2009).

B. Modo de infecção *in vivo*

A principal rota natural de infecção por baculovírus é pela ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída, o OB (poliedro ou grânulo, dependendo do gênero). Os ODV, presentes na matriz cristalina dos OB, estão protegidos da degradação ambiental e são liberados do OB após a dissolução dos mesmos no ambiente altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) do intestino médio da larva do inseto, dando início à infecção das células colunares epiteliais do intestino médio pela fusão dos nucleocapsídeos virais com a membrana das microvilosidades (Horton & Burand, 1993). A partir da progênie viral da infecção primária, é estabelecida a infecção secundária, ou seja, outros tecidos são infectados (Hom & Volkman, 2000). Dentro da célula, o vírus perde seu capsídeo e o DNA viral é liberado no núcleo ou então o próprio nucleocapsídeo entra no núcleo e perde a sua capa protéica. Após a entrada no núcleo, o DNA viral é replicado e novos nucleocapsídeos são produzidos. Estes são então transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio e eventualmente são liberados para infectar células do sistema traqueal. Estas células atravessam a lâmina basal e servem de vias para o deslocamento do vírus tanto para células epidermais da traquéia quanto para a hemolinfa (Hom & Volkman, 2000). Os vírus podem também passar direto pelas células intestinais via membrana basal do intestino, infectando os hemócitos (Barrett *et al.*, 1998)

Após oito horas da infecção, o núcleo torna-se hipertrofiado, o nucléolo aumenta de tamanho e forma-se um estroma virogênico no seu centro. A montagem e maturação dos nucleocapsídeos ocorrem, ainda, no núcleo, perifericamente ao estroma virogênico (Williams & Faulkner, 1997) e, logo após, os nucleocapsídeos brotam da membrana nuclear para o citoplasma (Federici, 1997). As células epiteliais infectadas produzem um segundo fenótipo, os BV, que brotam através das células da membrana basal que contém a glicoproteína GP64 ou LD130, dependendo do vírus, permitindo a entrada dos mesmos nas células-alvo, promovendo a fusão do envelope com as membranas vesiculares endocíticas (Engelhard *et al.*, 1994; Volkman, 2007) (Figura 2). A infecção em insetos da ordem Lepidoptera geralmente se espalha rapidamente para outros tecidos e o inseto morre em poucos dias. Na maioria das vezes, após a morte da larva do inseto infectada pelo vírus, o seu tegumento se desintegra, liberando os OB no meio ambiente. A quantidade de OB presente em uma larva em seu último estágio de desenvolvimento antes de se tornar adulta é de até 10^{10} OB nos NPV e 10^{11} OB nos GV (Payne, 1986).

As lagartas são mais susceptíveis à infecção viral durante os primeiros estágios larvais. Os sintomas mais comuns da infecção por NPV incluem perda de apetite, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e diminuição de movimentos (Federici, 1997).

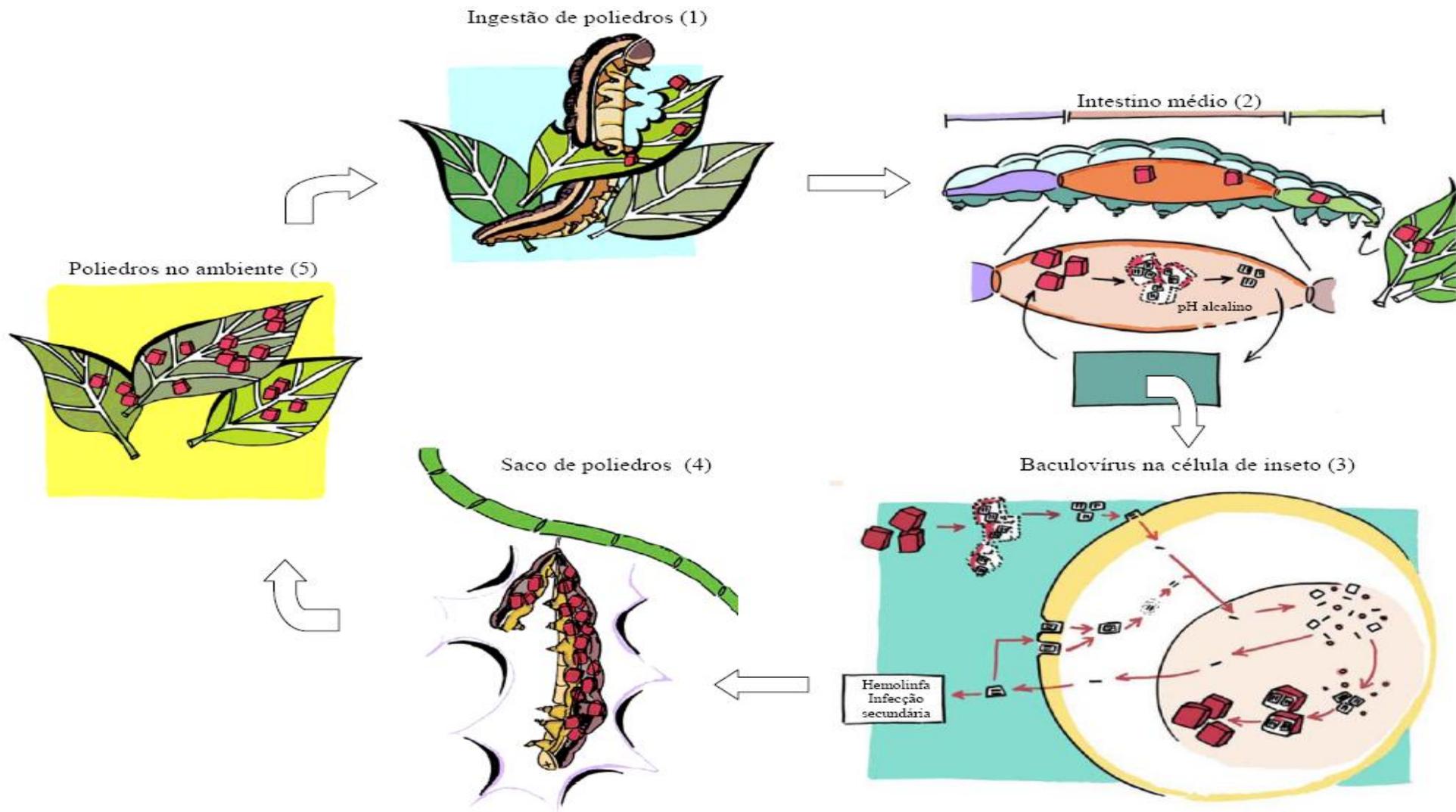


Figura 2: Esquema da infecção de uma larva de um inseto da ordem Lepidoptera por baculovírus: Em (1) o inseto ingere o poliedro (OB), que eventualmente havia sido liberado no meio ambiente, por um outro inseto morto por infecção causada por baculovírus. O poliedro é, então, dissolvido no intestino médio (2), pela ação do pH alcalino, liberando as partículas virais. Com a ruptura da membrana peritrófica, o vírus pode então infectar células colunares (caracterizando a infecção primária) inicialmente, e, em seguida, partindo para a infecção de outros tipos celulares, como traqueócitos e hemócitos, (caracterizando a infecção secundária) (3). A infecção se espalha, causando a morte da larva (4) e esta se torna um “saco” de poliedros que, quando se rompe, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (5). Fonte: Barros, 2007

C. Regulação da expressão gênica

A expressão gênica dos baculovírus pode ser dividida em duas fases distintas: fase precoce (“early”) e fase tardia (“late”). Podem existir ainda subdivisões representadas pelas fases: a) imediata precoce (“immediately early”), correspondendo a genes expressos logo nas primeiras horas de infecção; e b) muito tardia (“very late”), representando os genes expressos a partir de 18 horas de infecção, sendo que nessa fase, a proteína viral mais produzida nos NPV é a poliedrina (Maruniak, 1986). A fase precoce ocorre antes da replicação do DNA viral, como no caso do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), onde esses genes são dependentes da RNA polimerase II do hospedeiro para serem expressos e estão envolvidos no processo de replicação viral que ocorre posteriormente. A fase tardia ocorre após a replicação do DNA viral quando há o “desligamento” da expressão gênica da célula hospedeira e a produção de BV (Ribeiro *et al.*, 1998). Os genes tardios estão envolvidos na montagem do vírus e os genes muito tardios no processo de oclusão (Jarvis *et al.*, 1997; Thiem *et al.*, 1996; Lu & Miller, 1997).

Os genes expressos durante a fase precoce, a partir de 30 minutos após a infecção (p.i.) e até aproximadamente 8 horas após a infecção (h p.i.), correspondem a fatores de transcrição, principalmente, mas também podem ser proteínas pertencentes à maquinaria de replicação do DNA viral. Esses genes são prontamente reconhecidos pelo complexo de transcrição celular, sendo, por esse motivo, transcritos rapidamente (Passarelli & Miller, 1993; Xu *et al.*, 1995; Todd *et al.*, 1996; Guarino *et al.*, 1998; Gross & Shuman, 1998). Os genes produzidos durante essa fase são necessários para as fases tardia e muito tardia, sendo muitos deles expressos logo que ocorre a infecção.

Os genes expressos durante a fase tardia, entre 6 e 18 h p.i., correspondem ao início da replicação viral. Essa fase coincide com a produção de BV, que são produzidos pelo empacotamento de novos DNA virais sintetizados em nucleocapsídeos que deixam o núcleo e brotam através da membrana plasmática celular (Lu & Miller, 1997).

Os genes expressos durante a fase muito tardia, iniciando a 18 h p.i., coincidem com a produção dos OB, que são produzidos depois que o nucleocapsídeo torna-se envelopado dentro do núcleo, resultando em vírions que são embebidos em uma matriz protéica cristalina, formando corpos nucleares conhecidos como poliedros ou grânulos, dependendo de sua aparência morfológica (Lu & Miller, 1997).

D. **Baculovírus como vetor de expressão: AcMNPV**

O conhecimento sobre o genoma dos baculovírus permitiu um estudo mais detalhado de seus genes e promotores. Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetor de expressão foram publicados por Smith *et al.* (1983 b) e Pennock *et al.* (1984), que usaram o AcMNPV para produzir β -interferon e β -galactosidase, respectivamente, em células de *S. frugiperda*. As vantagens para utilização de baculovírus como vetores de expressão segundo O' Reilly *et al.*, 1992; Jarvis, 1997; e Ribeiro *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 1999; Kost *et al.*, 2005 são as seguintes:

1. Potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis (varia de 10 a 100 mg de proteína por 10^9 células de inseto, mas há casos de 600 mg/ 10^9 células);
2. Facilidade de purificação da proteína heteróloga;
3. Existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral);

4. Diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares;
5. Capacidade para clonagem de grandes inserções;
6. Eficiência na expressão de genes contínuos (sem íntrons) e cDNA;
7. Simplicidade de manipulação;
8. Ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas de eucariotos. Principalmente, quando as proteínas necessitam de modificações pós-traducionais exclusivas de sistemas eucariotos para serem ativas como N-glicosilação; O-glicosilação; clivagem proteolíticas etc.; e
9. Alta especificidade dos baculovírus, que os torna um sistema seguro de ser utilizado.

O sistema de expressão baculoviral também possui algumas limitações, entre elas encontramos o fato de que células de inseto são incapazes de produzir complexos N-glicosilados com resíduos de galactose, no penúltimo, e ácido siálico no último resíduo de sua cadeia. Isso ocorre porque células de insetos e células de mamíferos possuem caminhos para a modificação pós-traducional de N-glicosilação diferentes. Ensaio enzimáticos demonstram que células de inseto possuem pouca ou nenhuma atividade de galactosiltransferase ou sialiltransferase envolvidas no processo de N-glicosilação, dificultando a adição desses resíduos no final da cadeia proteica. Modificações de N-glicosilação, principalmente resíduos terminais de ácido siálico, contribuem para diferentes funções biológicas da glicoproteína. Para algumas aplicações clínicas, como por exemplo, administração *in vivo* de proteínas terapêuticas

recombinantes, a falta dos resíduos de ácido siálico é inaceitável (Jarvis *et al.*, 2001; Kost *et al.*, 2005).

Outra modificação pós-traducional que não é tão eficiente em células de inseto quanto em células de mamíferos é a sumolização, adição de moléculas da proteína Sumo (semelhante a ubiquitina) na proteína recém traduzida. Para suprir essa limitação, Langereis (2007) introduziu, em linhagens celulares de insetos, componentes da sumolização de mamíferos por co-infecção com baculovírus recombinantes. Os recombinantes expressavam individualmente cada componente deste processo. A expressão dessas proteínas foi necessária e suficiente para ativar a sumolização de proteínas testes.

O sistema de expressão de proteínas heterólogas usando baculovírus baseia-se na introdução de genes exógenos no genoma viral no lugar de um gene não-essencial para replicação, sob o comando de um promotor forte (por exemplo, o promotor do gene da poliedrina, *polh*). A inativação desse gene por deleção ou inserção de uma seqüência de DNA produz um vírus que é capaz de se replicar em células de inseto, mas não produz poliedrina e, como consequência, não ocorre a formação da forma oclusa do vírus (OB). As células infectadas pelo vírus, que não produz OB, são de fácil localização através da observação ao microscópio óptico, pela ausência de OB intracelulares característicos dos vírus normais. A expressão do gene *polh* é conduzida a partir de um promotor forte, pois, por volta de 72 h p.i., a poliedrina compõe cerca de 20-50% da proteína produzida pela célula infectada. Dessa forma, o modelo mais simples de vetores para o sistema de expressão em baculovírus foi a troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo de interesse sob o controle do promotor do gene *polh* do AcMNPV (Miller *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1983 a, b).

A tecnologia para construção de vetores de baculovírus é feita com base em plasmídeos de transferência. Estes são unidades replicativas que contêm regiões flanqueadoras do gene que se pretende substituir no genoma viral, incluindo ou não a seqüência codificante, seu promotor e um sítio de clonagem (Miller *et al.*, 1986). Após a construção do plasmídeo, é feita a co-transfecção da célula do inseto, utilizando-se o DNA do vírus parental e o DNA do plasmídeo. Durante a infecção viral, por recombinação homóloga, o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. O vírus recombinante formado é, então, selecionado por plaqueamento em células infectadas (Castro *et al.*, 1999).

Inicialmente, os vírus recombinantes eram construídos com deleção do gene da poliedrina, permitindo sua seleção através de placas ocluso-negativas. Para facilitar a identificação, outros vírus, contendo genes marcadores como o *lac-Z* (β -galactosidase), foram desenvolvidos (Summers & Smith, 1987; O'Reilly & Miller, 1990). Dessa forma, a seleção de um clone recombinante é facilitada em presença do substrato sintético (X-Gal). Neste caso, células infectadas com o vírus parental apresentam coloração azul, enquanto as infectadas com o vírus que recebeu o inserto (gene da β -galactosidase interrompido) apresentam coloração branca (O'Reilly *et al.*, 1992).

Existem vários métodos para facilitar e aumentar a velocidade de construção de um baculovírus recombinante e estes diferem apenas na localização onde o gene de interesse será incorporado dentro do genoma do baculovírus. O primeiro método acontece quando um vetor de transferência, contendo o gene clonado, é introduzido juntamente com o DNA viral dentro de células de inseto, onde eventos de recombinação ocorrerão. O uso do DNA circular do tipo selvagem para este processo foi amplamente substituído pelo uso de formas lineares do genoma viral, não infeccioso. Este processo é eficiente e baseia-se em dois fatores: a construção de um vetor de transferência, no qual

o gene de interesse é posicionado sob o comando de um promotor forte do baculovírus, e o uso de um DNA viral linear com o mínimo de possibilidade de re-circularização para que eventos não desejados de recombinação ocorram, diminuindo a infectividade e aumentando a proporção de baculovírus recombinantes (Kitts *et al.*, 1990; Airene *et al.*, 2003). Outro método é a recombinação em células de *Escherichia coli*, DH10BacTM (Invitrogen) a qual utiliza sítios de transposição Tn7 para inserir genes no locus do gene *polh* e no meio do gene *lac-Z*, que codifica a enzima β -galactosidase (Lac-Z) no DNA viral na forma de um plasmídeo (bacmídeo) propagado em células de *E. coli*. Desse modo, o vetor recombinante (onde ocorreu transposição do gene de interesse) gerará apenas colônias brancas, devido à interrupção da sequência codificadora da β -galactosidase, diferentemente do vetor íntegro que produzirá β -galactosidase e colônias bacterianas azuis (Luckow *et al.*, 1993). Esse método consiste de um vetor de transferência (por exemplo, o pFastBacTM1) que contém o gene de interesse sob o comando de um promotor específico do baculovírus e, quando propagadas em células de *E. coli*, DH10BacTM, ocorre a transposição do cassete de expressão do gene heterólogo para o bacmídeo dentro da célula hospedeira.

E. *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

O baculovírus mais estudado até hoje é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), sendo considerado espécie-tipo do gênero *Alphabaculovirus* (Theilmann *et al.*, 2005). Também foi o primeiro baculovírus a ser sequenciado (Ayres *et al.*, 1994). No Brasil, o baculovírus mais utilizado como bioinseticida é o AgMNPV, sendo o maior programa mundial de utilização de um vírus

para o controle de uma praga. A utilização do AgMNPV para o controle da lagarta da soja, *A. gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), foi desenvolvido a partir do final da década de 70 e início da década de 80 pela Embrapa Soja em Londrina/PR (Figura 3). Parâmetros de controle biológico, bem como método de produção massal, controle de qualidade, epizootiologia e tecnologia de aplicação foram estabelecidos por Moscardi (1983, 1989). Ao lado das vantagens ecológicas no uso do vírus, existe também uma vantagem econômica de aproximadamente 70% quando comparado ao uso de pesticidas químicos. Esse fato indica que milhões de litros de inseticida químico não estão sendo aplicados anualmente e conseqüentemente há uma economia de milhões de dólares e menor contaminação do meio ambiente com resíduos químicos (Ribeiro *et al.*, 1998). A mortalidade das larvas tem sido acima de 80% e o desfolhamento da soja tem-se mantido abaixo do limiar de dano econômico, quando o bioinseticida é aplicado nas condições recomendadas (Moscardi, 1983, 1989; Moscardi & Correa-Ferreira, 1985; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996). Esses resultados levaram ao desenvolvimento de uma formulação do bioinseticida, permitindo sua industrialização e comercialização (Moscardi & Sosa-Gómez, 1996).



Figura 3: Fotos de uma larva de *Anticarsia gemmatalis* saudável (A) e infectada pelo baculovírus AgMNPV (B). Adaptado de www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/insumosagropecuarios/agricolas/agroquimicos/cheminova/especies/anticarsia-gemmatalis-05.htm (A) e de www.embrapa.gov.br/ (B).

O genoma do AgMNPV foi sequenciado (Oliveira *et al.*, 2006) e contém 132.242 pares de bases (pb) e a sua análise inicial revelou que o AgMNPV pertence aos NPV do grupo I, possuindo uma maior identidade de sequência e organização genômica com os vírus *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefMNPV), *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) e *Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV), conforme árvore filogenética construída por Dalmolin *et al.* (2005). O AgMNPV se replica em células de *Trichoplusia ni* (TN368), *S. frugiperda* (IPLB-Sf21-AE), *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) (Hink, 1970; Vaugh *et al.*, 1977; Sieburth & Maruniak, 1988; Castro *et al.*, 2006) e BTI-Tn5B1-4 (Granados *et al.*, 1994).

F. Baculovírus recombinante para controle biológico

A utilização de baculovírus como agente de controle biológico nas lavouras, atualmente, é dificultada por alguns fatores que interferem no seu uso no campo, como a inativação do vírus pela radiação solar, a folha onde o mesmo é depositado, o momento da aplicação, a temperatura, a qualidade e quantidade de inóculo e a baixa velocidade do baculovírus selvagem para matar seu hospedeiro (Moscardi, 1998; Fuxa, 1991). Uma das soluções encontradas para o último fator é a construção e utilização de baculovírus capazes de aumentar a virulência e conseqüentemente diminuir o tempo de vida dos insetos infectados.

Avanços na engenharia genética tem tornado possível manipular geneticamente baculovírus selvagens para realçar suas propriedades como agentes de controle de pragas (Booth *et al.*, 1992; Van Beek & Hughes, 1998; Ashour *et al.*, 2007).

Genes codificando neurotoxinas, enzimas e hormônios peptídicos de insetos têm sido introduzidos nos genomas de baculovírus para produzir baculovírus recombinantes com o aumento da velocidade de morte, reduzindo os prejuízos causados pelos insetos-pragas. Alguns dos mais efetivos baculovírus recombinantes expressam neurotoxinas específicas para inseto (Smith *et al.*, 2000; Treacy *et al.*, 2000; Van Beek & Hughes, 1998). Em hospedeiros susceptíveis, estas neurotoxinas, expressas pelos vírus, reduzem os danos à lavoura e o tempo necessário para matar 50% dos insetos em bioensaios (TL₅₀) estimados para 25-50% quando comparado às larvas infectadas com o vírus selvagem (Cory *et al.*, 1994; McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; Tomalski & Miller, 1992; Treacy *et al.*, 1996).

Em 1988, o primeiro gene de toxina inseto-específica foi inserida no genoma do baculovírus AcMNPV sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*). O gene inserido codifica a toxina-1 do escorpião *Buthus eupeus* (Belt). No entanto, essa toxina não aumentou a eficiência do baculovírus recombinante (Carbonell *et al.*, 1988).

Genes da toxina Cry da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) foram inseridos em baculovírus (Merryweather *et al.*, 1990, Pang *et al.*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993; Ribeiro *et al.*, 1998; Martens *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008). Todas as proteínas Cry foram expressas em grande quantidade e mostraram atividade biológica similar às proteínas nativas. Entretanto, apenas quando a proteína Cry foi expressa na forma fusionada com a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV (Chang *et al.*, 2003), o vírus recombinante apresentou uma maior virulência em relação à dose necessária para matar 50% dos insetos em bioensaios (CL₅₀) para *Plutella xylostella* quando comparado ao vírus selvagem.

Um dos primeiros baculovírus recombinantes eficaz, construído com a intenção de controle biológico, continha o gene do hormônio diurético que, quando injetado em larvas de *Bombyx mori*, foi capaz de matar os insetos 20% mais rápido que o vírus selvagem (Maeda, 1989).

Hammock *et al.*, 1990, inseriram o gene da esterase do hormônio juvenil (JHE) de *Heliothis virescens* no genoma do AcMNPV, mostrando uma pequena melhora na virulência somente para larvas neonatas de *T. ni*. Entretanto, quando versões mutadas do gene JHE, que aumentam a estabilidade da proteína, foram introduzidas no genoma do AcMNPV, ocorreu um aumento na virulência contra larvas de diferentes estágios de desenvolvimento de *H. virescens* (Bonning *et al.*, 1999).

O gene da toxina derivada do ácaro *Pyemotes tritici*, TxP-1, foi também inserido no genoma do AcMNPV e acelerou a morte dos insetos infectados (Tomalski

& Miller, 1991, 1992; Lu & Miller, 1997). A ação dessa toxina é paralisante, causando contração muscular. Resultados semelhantes foram encontrados com a toxina AaIT do escorpião *Androctonus australis*. Sua ação ocorre nos canais de sódio dos neurônios, causando um efeito excitatório pré-sináptico. Larvas infectadas com esses baculovírus recombinantes exibem um aumento da irritabilidade e cessam sua alimentação.

Outras toxinas como Lqh&IT2 de escorpiões (Froy *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2000), aranhas (Prikhod'ko *et al.*, 1998), anêmonas do mar (Prikhod'ko *et al.*, 1998) e ácaros (Tomalski & Miller, 1991; Hughes *et al.*, 1997; Burden *et al.*, 2000) foram também expressas usando baculovírus, mostrando, também, redução no tempo letal dos vírus recombinantes.

Alguns baculovírus produzem uma proteína, Ecdisteroide UDP-Glicosil Transferase (EGT), que inativa o hormônio da muda do inseto (O'Reilly & Miller, 1989; Rodrigues *et al.*, 2001). A deleção ou inativação desse gene resulta em redução do tempo letal (O'Reilly & Miller, 1989; Pinedo *et al.*, 2003). Esse exemplo demonstra a utilidade de deleção de um gene para acelerar a mortalidade inseto (O'Reilly, 1995; Bonning & Hammock, 1996).

Baculovírus recombinantes que expressam proteases que degradam a membrana basal dos tecidos dos insetos também foram desenvolvidos. Um AcMNPV recombinante foi construído com a introdução do gene da catepsina L de *Sarcophaga peregrina*, reduzindo o tempo de sobrevivência e o dano causado pelas larvas infectadas quando comparado com o vírus selvagem (Harrison & Bonning, 2001; Li *et al.*, 2008).

Outro gene com potencial inseticida é o gene da quitinase. Um AcMNPV contendo o gene da quitinase de *Manduca sexta*, sob o comando do promotor do gene *polh*, foi construído. Esse recombinante mostrou uma velocidade maior na mortalidade

de larvas de *S. frugiperda*, quando comparado ao vírus selvagem (Gopalakrishnan *et al.*, 1995).

G. Proteases

As proteases são enzimas proteolíticas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. As proteases são enzimas degradativas capazes de catalisar a hidrólise total de proteínas. Essa hidrólise requer sítios ativos dessas proteases, com aminoácidos específicos no sítio ativo, sendo eles serina, cisteína, aspartato e histidina. Essas enzimas ocupam uma posição importante pelas suas aplicações tanto na fisiologia quanto na área comercial. São encontradas em vegetais, animais e microrganismos (Rao *et al.*, 1998).

As proteases possuem funções metabólicas funcionais e regulatórias em processos fisiológicos e patológicos, tais como: catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, migração celular, crescimento celular, arranjo de tecidos, morfogênese, inflamação, crescimento de tumores e metástases, ativação de precursores, liberação de hormônios, liberação de peptídeos farmacologicamente ativos, digestão, regulação do metabolismo, nutrição, ciclo de replicação viral e regulação da expressão gênica (Santos, 1996; Rao *et al.*, 1998; Bressolier *et al.*, 1999; Rawlings *et al.*, 2002).

I. Classificação

Existem diversos critérios para classificar as proteases. Os principais estão baseados no pH de atividade, na posição do sítio de clivagem e no tipo de substrato (Rao *et al.*, 1998).

Quanto à faixa de pH nas quais as proteases possuem maior atividade, estas enzimas podem ser classificadas em proteases ácidas, básicas e neutras. As proteases ácidas são representadas, principalmente, pelas aspartato-proteases e possuem atividade na faixa de pH 2.0-6.0. As proteases neutras possuem atividade em pH neutro, na faixa de 6.0-8.0, e incluem cisteíno-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases. Já as proteases alcalinas possuem maior atividade na faixa de pH 8.0-13.0 e são representadas principalmente pelas serino-proteases (Santos, 1996; Rao *et al.*, 1998).

Quanto ao sítio de clivagem, as proteases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas a partir das extremidades amino ou carboxiterminais do substrato, sendo subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases. As carboxipeptidases clivam as ligações peptídicas a partir da extremidade carboxiterminal, liberando um único resíduo de aminoácido ou um dipeptídeo. Já as endopeptidases reconhecem uma sequência ou grupo de aminoácidos de caráter específico e clivam ligações peptídicas internamente na cadeia polipeptídica, liberando oligopeptídeos, e são subdivididas em serino-proteases, serino-alcalino proteases, subtilisinas, aspartato-proteases, cisteína/tiol-proteases e metalo-proteases (Rao *et al.*, 1998).

Quanto ao tipo de substrato, as proteases são denominadas em relação a sua atividade como, por exemplo: collagenase, elastase e queratinase, que hidrolisam o colágeno, elastina e queratina, respectivamente (Rao *et al.*, 1998).

Uma classificação mais abrangente em relação às proteases é encontrada pelo sistema de database MEROPS, onde as mesmas são classificadas em famílias e clãs (Rawlings *et al.*, 2002).

II. Queratinase

A queratinase é uma serino-protease, que pertence à família que utiliza unicamente um resíduo ativo de serina para catalisar a hidrólise das ligações peptídicas (Rawlings *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 1998).

As serino-proteases representam 0,6% de todas as proteínas do genoma humano e estão envolvidas em muitas funções vitais como a digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise, fertilização, ativação do sistema complemento e se relacionam com muitas doenças como câncer, artrite e enfisema (Yousef *et al.*, 2003).

As serino-proteases também desempenham papel importante em muitos processos biológicos como desenvolvimento (Nakajima *et al.*, 1997) e imunidade (Gorman *et al.*, 2000 a, b; Munier *et al.*, 2004). Nos insetos, as serino-proteases são importantes na coagulação da hemolinfa, síntese de peptídeos antimicrobianos e síntese de melanina (Gorman & Paskewitz, 2001).

Serino-proteases pertencem ao principal grupo de enzimas do intestino de insetos, envolvidas na digestão de proteínas da dieta (Lehane *et al.*, 1998; Gorman & Paskewitz, 1999; Gorman *et al.*, 2000 a; Yan *et al.*, 2001). As enzimas digestivas do intestino médio são secretadas em resposta ao aumento da quantidade de proteína no intestino e à mudança nos seus níveis no lúmen. Muitos genes de serino-proteases têm sido identificados no intestino médio de insetos (Lehane *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2001; Nakazawa *et al.*, 2004). Uma serino-protease de *B. mori* mostrou atividade antiviral contra BmNPV no início da infecção viral (Nakazawa *et al.*, 2004).

A queratinase do fungo *Aspergillus fumigatus* foi isolada por Santos (1996), purificada e caracterizada com uma massa molecular de 31 kDa, com características de serino-protease, codificada por um gene de 1.200 pares de bases, com poder queratinolítico e caseinolítico. O fungo *A. fumigatus* é encontrado na natureza como um

patógeno oportunista das vias aéreas, afetando humanos, pássaros e outros animais. É responsável por uma variedade de doenças respiratórias e muitas infecções invasivas. É um fungo caracterizado por produzir muitas enzimas proteolíticas, como elastases (Frosco *et al.*, 1992; Markaryan *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1994), serino-proteases fibrinogenolíticas (Larcher *et al.*, 1992) e collagenases (Monod *et al.*, 1993), que estão envolvidas em muitos eventos-chaves na fisiopatologia de *A. fumigatus* (Santos *et al.*, 1996).

A produção de elastases em *A. fumigatus* e a correlação das mesmas com a invasibilidade e aumento da patogenicidade foi descrita em diversos experimentos em camundongos (Blanco *et al.*, 2002; Kolattukudy *et al.*, 1993; Kothary *et al.*, 1984).

III. Catepsina-L

Catepsina-L é uma protease lisossomal com pH ácido em torno de 5,0, sendo encontrada em vários tipos de células. Ela é sintetizada como uma pro-enzima no complexo de Golgi e transportada para os lisossomos, onde acumula como uma enzima madura (Von Figura *et al.*, 1986; Kornfeld, 1987; Kornfeld *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1984). A catepsina-L tem em torno de 35 kDa de massa molecular e sua pro-enzima, pro-catepsina L, em torno de 50 kDa. A catepsina-L é uma cisteíno-protease pertencente à família da papaína (Homma *et al.*, 1994).

Kageyama e Takahashi (1990) purificaram e caracterizaram uma cisteíno-protease de *B. mori*. A pro-enzima tem em torno de 47 kDa e sua forma madura em torno de 39 kDa. Essa protease mostrou ter uma alta similaridade com a catepsina-L de mamíferos (Takahashi *et al.*, 1993). Mais tarde, essa protease foi identificada como a enzima catepsina-L (Yarygin *et al.*, 2003). Essa protease foi também identificada na cultura de células da mosca *S. peregrina* (Homma *et al.*, 1994), secretada pelas suas

células embrionárias e discos imaginais (Harrison & Bonning, 2001). A secreção e atividade dessa enzima está correlacionada com a inversão *in vitro* dos discos imaginais durante o desenvolvimento em estruturas primordiais adultas das pernas e a degradação de duas proteínas com peso molecular de 200 e 210 kDa (Homma & Natori, 1996). Essas proteínas estão localizadas na superfície dos discos imaginais e podem ser componentes da membrana basal (Harrison & Bonning, 2001).

A catepsina-L é uma poderosa cisteíno-protease, envolvida no processo de degradação protéica intracelular e extracelular. Como outras proteases, ela é sintetizada como uma pré-pro-enzima e subsequentemente processada para sua forma ativa madura (Ishido & Kominami, 1998). A pro-catepsina L pode ser processada para a forma madura da catepsina L e estocada nos lisossomos ou secretada para o meio de cultura (Homma *et al.*, 1994; Ishido & Kominami, 1998).

IV. **Quitinase**

A enzima quitinase catalisa a hidrólise de β -1, 4-N-acetyl-D-glucosamina em polímeros de quitina. Essa enzima tem sido detectada em muitos organismos, tendo uma função importante em cada um, como a degradação do exoesqueleto em insetos e crustáceos, crescimento e divisão celular em fungos, degradação da quitina como nutriente para bactérias e defesa em plantas (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

Alguns micróbios entomopatogênicos produzem quitinases para penetração no corpo hospedeiro (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Gooday, 1999). Por outro lado, baculovírus produzem quitinases para liquefazer o corpo do hospedeiro depois da infecção e morte pelo vírus (Hawtin *et al.*, 1995, 1997).

Quitinases de lepidópteros têm sido purificadas, como de *M. sexta* e *B. mori*, e suas propriedades bioquímicas bem caracterizadas (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003). Esses genes que codificam essas enzimas foram clonados e isolados em vários lepidópteros (Kramer *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998; Mikitani *et al.*, 2000; Shinoda *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002). Um estudo imunohistoquímico da quitinase de *C. fumiferana* (Zheng *et al.*, 2003), um ortólogo da quitinase de *M. sexta* e de *B. mori*, revelou que essas quitinases participam da degradação da quitina durante o processo de muda dos insetos (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um patógeno de inseto bem conhecido e estudado, usado como controle biológico de muitas pragas na China, Rússia e Brasil (Gillespie *et al.*, 1988). *M. anisopliae* produz distintas serino-proteases extracelulares, como as proteases subtilisinas, tripsinas, metaloproteases, bem como muitas exopeptidases, que provavelmente são importantes na degradação da cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1995 b, 1996 a). A quitinase do fungo *M. anisopliae* parece ser derivada de várias enzimas que dissolvem a cutícula, como hidrolases, quitinases e proteases. No caso de *M. anisopliae*, é proposto que a penetração do fungo no inseto é facilitada pela liberação de proteases durante os passos de invasão, sugerindo que a quitinase é um dos fatores principais na penetração da cutícula comparado com proteases (St. Leger *et al.* 1991). Como as proteases, as quitinases parecem ser determinantes patogênicos (Charnley *et al.*, 1991). As quitinases são produzidas por estruturas de infecção na superfície da cutícula em níveis baixos durante o processo de penetração em *M. sexta*; níveis altos de quitinases acumulam no ponto da degradação proteolítica, sugerindo que a liberação da quitinase é dependente da acessibilidade do substrato (St. Leger *et al.*, 1996 b).

Após o sequenciamento do genoma do AcMNPV, foi possível avaliar a composição gênica desse baculovírus. Um dos genes identificados em seu genoma é o que codifica uma quitinase (Hawtin *et al.*, 1995). O AcMNPV causa liquefação nas larvas infectadas pela expressão do gene de uma quitinase (Ayres *et al.*, 1994; Hawtin *et al.*, 1995) e do gene (*vcath*) de uma catepsina (Rawlings *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1995). Estudos de mutantes de BmNPV e AcMNPV, incapazes de produzir V-CATH, também não causam a liquefação terminal do inseto hospedeiro (Ohkawa *et al.*, 1994; Slack *et al.*, 1995; Daimon *et al.*, 2006). Vírus recombinantes sem um dos genes são incapazes de liquefazerem os insetos, visto que a co-infecção com os dois recombinantes restaurou o processo (Hawtin *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998, 2000). A desintegração do inseto infectado pelo AcMNPV é vantajosa, pois permite uma disseminação máxima de poliedros no ambiente (Saville *et al.*, 2004). No genoma do AcMNPV, a quitinase está localizada entre os genes *lef-7* e *vcath* (Rawlings *et al.*, 1992; Ayres *et al.*, 1994; Hawtin *et al.*, 1995). A enzima tem seu nível de expressão máxima com atividade de endoquitinase e exoquitinase a 12 h p.i (Hawtin *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998).

Saville *et al.* (2002) mostraram que a deleção do possível sinal de localização no retículo endoplasmático (KDEL) da quitinase do AcMNPV e a expressão do gene modificado sob o comando do promotor da poliedrina resultou no acúmulo da quitinase no meio de cultura das células infectadas. Larvas de *T. ni* infectadas com o vírus modificado possuem um tempo de liquefação menor comparado com o vírus controle, sem a deleção de KDEL.

H. Sistema Imune de Insetos

O desenvolvimento de mecanismos de imunidade eficientes tem um alto valor adaptativo para os organismos, sendo dividida em imunidade inata e imunidade adquirida. A primeira independe da exposição prévia a algum antígeno, constituindo uma resposta abrangente e imediata. A segunda gera memória celular pela produção de uma gama de receptores e de anticorpos específicos para o reconhecimento de diferentes antígenos, resultando em uma resposta mais rápida e efetiva no caso de novas exposições ao mesmo antígeno ao longo da vida (Hoffmann *et al.*, 1999, Alberts *et al.*, 2002). Os insetos possuem somente imunidade inata. Durante inúmeras infecções, são produzidas moléculas efetoras, como peptídeos antimicrobianos, além de ativação de mecanismos de fagocitose e encapsulação (Xi *et al.*, 2008). Em infecções virais, o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) parece ser o mecanismo mais comum. RNAi é um processo evolutivamente conservado, que leva à degradação de RNA fita dupla (dsRNA) e de qualquer outra sequência de RNA mensageiro (mRNA) homóloga presente no organismo. O RNAi é um mecanismo eficiente, pois muitos vírus produzem dsRNA durante a replicação. Um exemplo de RNAi em insetos é o trabalho de Sanchez-Vargas *et al.*, 2004. No trabalho citado, células C6/36, derivadas de larva de *Aedes albopictus*, foram transduzidas com um Sindbis vírus (vírus transmitido por mosquitos para mamíferos, aves, répteis e anfíbios) recombinante, expressando a proteína pré-M do vírus do Dengue sorotipo 2 (DENV-2). Como consequência, as células se tornaram resistentes à infecção por DENV-2, mas não pelos outros sorotipos. A resistência pôde ser observada antes que a proteína pré-M fosse expressa, indicando que o processo ativo foi RNAi.

Os revestimentos corpóreos são considerados a primeira defesa do organismo. Como barreiras físicas, a cutícula dos insetos funciona como barreira externa (Vilmos & Kurucz, 1998) e como barreira interna, a membrana peritrófica (Peng *et al.*, 1999; Wang & Granados, 1998; Hegedus *et al.*, 2009). A cavidade corporal dos insetos (hemocele) é preenchida pela hemolinfa, um líquido composto por diferentes elementos celulares (hemócitos) e um complexo de substâncias químicas. A hemolinfa tem função de nutrição, excreção, sinalização e defesa, sem função respiratória. Os hemócitos desempenham resposta imune celular, bem como a síntese de elementos da resposta humoral (Klowden, 2002). Os hemócitos desempenham um papel importante na patogênese dos baculovírus, pois são responsáveis pela amplificação viral e disseminação da infecção (Barrett *et al.*, 1998; Federici & Hice 1997; Granados *et al.*, 1981; Washburn *et al.*, 1995). Durante os primeiros estágios da patogênese de AcMNPV e AgMNPV em hospedeiros permissivos, como *T. ni*, *S. exigua* e *H. virescens* (para AcMNPV) e *A. gemmatalis* (para AgMNPV), a infecção secundária dos hemócitos e outros tecidos pelos BV é altamente eficiente, levando o inseto à morte (Engelhard & Volkman, 1995; Washburn *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004, Soares & Ribeiro, 2005). Por outro lado, os hemócitos de outro inseto (*H. zea*) são altamente resistentes à infecção pelo AcMNPV. O vírus consegue entrar nas células produzindo alguma amplificação viral, mas também ocorre de alguma maneira, a remoção dos mesmos da hemolinfa (Trudeau *et al.*, 2001).

Fagocitose e encapsulação (se refere à ligação de hemócitos a alvos grandes, como parasitóides, nematóides) (Lavine *et al.*, 2002) mediada por hemócitos, além da apoptose, em lepidópteros, são parte da resposta contra a infecção viral (Silveira *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2007). Muitos estudos sugerem a presença de fatores não conhecidos envolvidos na resposta da defesa antiviral (Terenius, 2008). A hemolina,

pertencente à família de imunoglobulinas contendo quatro domínios de imunoglobulinas, (Su *et al.*, 1998), é uma das mais importantes moléculas da defesa humoral e celular em lepidópteros (Yu & Kanost 2002; Kanost *et al.*, 2004). Ela é produzida pelas células do tecido gorduroso e hemócitos e ocorre na forma solúvel na hemolinfa e se ligando à membrana (Bettencourt *et al.*, 1997). Terenius (2008) verificou que a expressão simultânea de hemolina e genes de baculovírus no intestino podem sugerir uma interação primária hemolina-vírus. Além disso, uma elevação do nível da atividade de fenoxidase e consequente melanização é um mecanismo de resposta contra infecção viral. A depleção da atividade de fenoxidase depois da inativação da expressão de hemolina por RNAi sugere que esta está envolvida no processo de melanização e a inativação da expressão de hemolina permite a progressão mais rápida dos sintomas da doença viral. Além disso, larvas de *B. mori* aumentam a sobrevivência à infecção de baculovírus após receber β -ecdisona injetada diretamente na hemolinfa. O aumento da resistência com o avanço da idade da larva pode sugerir que ela é regulada pelos hormônios ecdisona e hormônio juvenil.

A apoptose é um tipo de morte celular programada conservada entre os metazoários, desempenhando funções importantes na imunidade, desenvolvimento, diferenciação celular e na homeostase tecidual. A apoptose pode ser desencadeada por diversos estímulos, o que resulta em ativação de cisteíno-protease que impulsiona retração das células, a clivagem do DNA por endonucleases, e fragmentação celular em corpos apoptóticos (Ashe & Berry, 2003; Kerr *et al.*, 1972). A infecção viral pode ser um dos estímulos desencadeando a apoptose, dessa maneira, a célula hospedeira pode abortar a infecção viral, evitando a propagação para todo o organismo. Através da evolução os vírus adquiriram genes antiapoptóticos, como *p35* e *iap* (Koyama *et al.*, 2000; Teodoro & Branton 1997). A proteína P35 é um inibidor da caspase de amplo

espectro presentes em baculovírus e, mais recentemente, encontrados em entomopoxvírus, enquanto IAP constitui uma família de proteínas, cujos membros são descritos em baculovírus, insetos, nematóides e humanos. Estudos mostraram que a apoptose é uma importante resposta antiviral em insetos (Clarke & Clem, 2003; Clem, 2001; Means *et al.*, 2007, Silveira *et al.*, 2005, 2007). Apesar da existência de uma grande quantidade de trabalhos relatando a apoptose *in vitro*, só há pouco tempo foi relatada *in vivo* (Clarke *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Estudos *in vivo*, são importantes para elucidar estratégias da imunidade dos insetos contra patógenos e as funções da apoptose durante a evolução da imunidade desses organismos (Silveira *et al.*, 2005). Silveira *et al.* (2007) mostraram que o vírus mutante vApAg induz apoptose em células UFL-AG-286 e também nos hemócitos *in vivo* em larvas de *A. gemmatalis*, reduzindo sua infectividade.

Pouco se sabe sobre a resposta específica dos insetos a uma infecção viral. Genes de insetos podem ser induzidos ou reprimidos em resposta à infecção por um vírus. Esses genes podem ter uma ação no aumento da patogênese viral ou na resposta celular ao vírus na tentativa de atrasar ou atenuar a infecção (Gatehouse *et al.*, 2009). Estudos revelam barreiras na infecção viral, funções da membrana peritrófica (Wang & Granados, 1998), de hidrolases secretadas no lúmen (Ponnuvel *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2004), de fatores não identificados na hemolinfa (Trudeau *et al.*, 2001; Popham *et al.*, 2004) e de proteínas intracelulares (Volkman *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005). No entanto, se alguma dessas respostas está sob regulação transcricional ainda não se sabe (Gatehouse *et al.*, 2009).

A infecção de células de inseto em cultura pode causar alterações de suas propriedades, como uma reorganização do citoesqueleto, parada no ciclo celular entre G2/M e o desligamento da tradução das proteínas hospedeiras. Alguns trabalhos

demonstram genes induzidos ou reprimidos em células de inseto ou larvas infectadas com baculovírus. Um exemplo, é o trabalho de Nobiron *et al.* (2003), onde células de *S. frugiperda* em cultura (Sf9) foram infectadas pelo AcMNPV e a resposta transcricional celular analisada. Alguns transcritos celulares são reprimidos, mas um transcrito celular, o “cognate heat shock 70” (hsc70), foi induzido quando essas células foram infectadas por AcMNPV, sugerindo um papel importante no ciclo celular. Outro exemplo de indução de genes celulares em resposta à infecção por baculovírus foi descrito por Ponnuvel *et al.*, (2003), onde um gene codificando para uma lipase de *B. mori* foi induzida em larvas infectadas com o BmNPV, demonstrando que essa proteína do suco digestivo do canal alimentar do inseto pode ser efetiva contra patógenos virais. Kanost *et al.*, (2004) isolaram da hemolinfa de *M. sexta* um grupo de proteínas (hemolina, proteínas de reconhecimento de peptídeoglicano, proteínas de reconhecimento de β 1,3 glicanase e lecitinas tipo C) que servem como um mecanismo de vigilância através da ligação a moléculas de superfície microbiana (peptídeoglicano, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico, β 1,3 glicanase). Diversas respostas estão envolvidas nessas ligações alvos, como fagocitose, formação de nódulos, encapsulação, melanização e síntese de proteínas antimicrobianas. Algumas dessas respostas são mediadas e coordenadas por cascata de serino-proteases, análogas ao sistema complemento dos mamíferos (Kanost *et al.*, 2004). A esterase do hormônio juvenil, JHE, também tem importância na indução ou repressão celular. JHE é importante no início da metamorfose em muitos insetos. Uma indução de JHE desde a embriogênese em *B. mori* traz como consequência uma precoce pupação em 3º instar ao invés do 5º instar (Tan *et al.*, 2005). No entanto, uma inibição da atividade de JHE por parasitóides previne a pupação das lagartas que morreriam como larvas (Schafellner *et al.*, 2007, 2008). Huang *et al.* (2009) observaram

que muitos genes relacionados ao hormônio juvenil (JH) estão sendo induzidos após a infecção oral de NPV.

Capítulo I

Atividade inseticida de duas proteases e uma quitinase contra

Spodoptera frugiperda infectadas com baculovírus

recombinantes

1. INTRODUÇÃO

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus de insetos já estudado, principalmente na eficiência em matar insetos-pragas da agricultura. Isso se deve ao fato de serem específicos a uma ou poucas espécies relacionadas (Gröner, 1986), e sua proteção em cristais protéicos permitir a formulação de biopesticidas com fácil tecnologia de aplicação, representando economia e biossegurança em relação aos inseticidas químicos (Moscardi, 1998; Castro *et al.*, 1999).

São vírus de DNA dupla fita, circular, *supercoiled*, pertencentes à família *Baculoviridae*, possuindo um ou mais vírions com envelope em formato de bastão (báculo), contendo no seu genoma entre 80 e 200 kilobases (kb) (Lauzon *et al.*, 2006). Possuem uma característica única entre os vírus conhecidos por apresentarem dois fenótipos distintos durante um único ciclo de infecção: o BV, vírus extracelular (BV, do inglês *budded virus*), que são responsáveis pela transmissão do vírus de célula a célula, e ODV, vírus derivado da oclusão (ODV, do inglês *occluded derived virus*), que se encontra ocluído em corpo de oclusão (OB, do inglês *occlusion body*) (Smith *et al.*, 1983) sendo responsáveis pela transmissão horizontal do vírus de inseto a inseto.

A espécie-tipo da família *Baculoviridae*, *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) é o baculovírus mais estudado em nível molecular, possui um espectro bastante amplo de hospedeiros e tem sido amplamente utilizado como vetor de expressão em células de insetos e em insetos (Jehle *et al.*, 2006). Para aumentar a velocidade de morte dos insetos hospedeiros, baculovírus recombinantes tem sido construídos, visando ao aumento da atividade bioinseticida. Alguns dos mais efetivos baculovírus recombinantes expressam neurotoxinas específicas para inseto (Smith *et al.*, 2000; Treacy *et al.*, 2000; Van Beek & Hughes, 1998). Em hospedeiros susceptíveis, essas neurotoxinas, expressas pelos vírus, reduzem os danos à lavoura e também a TL₅₀ estimada em 25-50% quando comparado às larvas infectadas com o vírus selvagem (Cory *et al.*, 1994; McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; Tomalski & Miller, 1992; Treacy *et al.*, 1996).

Além de toxinas específicas de insetos, outras proteínas foram introduzidas no genoma dos baculovírus. Por exemplo, um dos mais efetivos baculovírus recombinante construído com a intenção de melhorar o controle biológico, possui o gene do hormônio diurético de *M. sexta*, que quando injetado em larvas de *B. mori*, foi capaz de matar os insetos 20% mais rápido quando comparado ao vírus selvagem (Maeda *et al.*, 1989). Vírus recombinantes contendo o gene do hormônio juvenil (JHE) de *H. virescens* e algumas variações mutantes foram também inseridos no genoma do AcMNPV (Hammock *et al.*, 1990; Booth *et al.*, 1992; Roelvink *et al.*, 1992; Eldridge *et al.*, 1992). O vírus recombinante com o gene JHE mostrou uma melhora na patogenicidade somente para larvas neonatas de *T. ni* (Hammock *et al.*, 1990). No entanto, versões mutadas do gene JHE mostraram uma melhora na estabilidade protéica e também um aumento na patogenicidade de larvas de *H. virescens* (Bonning *et al.*, 1999). Alguns baculovírus produzem durante a infecção, a enzima Ecdisteroide UDP-Glicosil

Transferase (EGT), que inativa o hormônio ecdisona em hospedeiros (O'Reilly & Miller, 1989; Rodrigues *et al.*, 2001). A deleção ou inativação do gene *egt* pode resultar em redução do tempo de infecção do inseto e em redução do dano econômico na colheita (O'Reilly & Miller, 1989; Pinedo *et al.*, 2003).

Baculovírus recombinantes também foram construídos com genes de enhancinas de outros baculovírus. Estes recombinantes foram baseados no AcMNPV e foram projetados para melhorar a capacidade do vírus em atravessar a membrana peritrófica, para ter acesso às células do epitélio do intestino médio (Popham *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2000). Também quitinases de alguns outros patógenos de insetos foram utilizados para aumentar a patogenicidade dos baculovírus (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003). Alguns microrganismos entomopatogênicos produzem quitinases para penetração no corpo hospedeiro (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Gooday, 1999) e alguns baculovírus produzem quitinases para liquefazer o corpo do hospedeiro depois da infecção e morte pelo vírus (Hawtin *et al.*, 1995, 1997). Outro gene de toxina utilizado com o intuito de aumentar a patogenicidade dos baculovírus são os gene *cry* da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Alguns genes da toxina Cry foram inseridos no genoma do AcMNPV, mostrando altos níveis de expressão em insetos infectados e mostrando atividade biológica similar às proteínas nativas (Merryweather *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993; Ribeiro *et al.*, 1998; Martens *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003). Entretanto, apenas quando a proteína Cry foi expressa na forma fusionada com a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV, o vírus recombinante apresentou uma maior patogenicidade contra seu inseto hospedeiro (Chang *et al.*, 2003).

O único gene de protease utilizado até o momento com o objetivo de melhorar a atividade inseticida de baculovírus foi o gene de uma catépsina-L (ScathL) de

Sarcophaga peregrina, que mostrou redução do tempo de sobrevivência e dos danos causados por lagartas infectadas, quando comparado com o vírus selvagem (Harrison & Bonning, 2001).

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que ataca muitas culturas de importância econômica em vários países. No Brasil, esse inseto pode atacar as seguintes culturas: milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora e couve (Cruz *et al.*, 1999; Praça, 2006), Figura 4.



Figura 4: Foto de uma larva de *Spodoptera frugiperda*.

A. fumigatus é encontrado na natureza como um patógeno oportunista das vias aéreas, afetando os seres humanos, aves e outros animais. É responsável por uma variedade de doenças respiratórias e de muitas infecções invasivas. Esse fungo produz muitas enzimas proteolíticas tais como elastases (Frosco *et al.*, 1992; Markaryan *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1994), serino proteases (Larcher *et al.*, 1992) e colagenases (Monod

et al., 1993), que estão envolvidas em muitos eventos importantes na fisiopatologia do *A. fumigatus* (Santos *et al.*, 1996). A queratinase do fungo *A. fumigatus* foi isolada, purificada e caracterizada previamente (Santos *et al.*, 1996).

2. OBJETIVOS

Neste estudo, visamos à construção dos baculovírus recombinantes contendo o gene ScathL de *S. peregrina*, o gene da queratinase do fungo *A. fumigatus* e o gene quitinase de *M. anisopliae*, sob o comando de dois promotores em tandem e a análise de suas propriedades inseticidas contra larvas de *S. frugiperda*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus e célula

Células de *T. ni* BTI-Tn5B1-4 (Granados *et al.*, 1994) e/ou *S. frugiperda* IPLB-SF21-AE (Sf-21) (Vaughn *et al.*, 1977) foram mantidas a 27°C em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO-BRL). Essas linhagens celulares servem para a propagação *in vitro* do AcMNPV e dos vírus recombinantes vSynVIgal, que contém o gene do *lac-Z* no lugar da poliedrina (Lee & Miller, 1978), e foram usados para construção dos três recombinantes do AcMNPV contendo genes da catepsina-L (ScathL), queratinase e quitinase.

3.2. Construção dos plasmídeos e dos vírus recombinantes

O gene da ScathL de *S. peregrina* (número de acesso no Genbank - D16533.1) foi amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para a protease (Protease F 5'-CCACCAGCAACCATCACCTTAAGCTTTAACAC-3') e Protease R 5'-GAATTCAATTGAAAAAGGCAG-3') e o DNA do plasmídeo pKYH5 (gentilmente cedido pelo Dr. Robert Harrison, da Iowa State University, EUA). O oligonucleotídeo Protease F anela na posição -10 a -35 em relação ao códon de iniciação (ATG) e o oligonucleotídeo Protease R na posição +76 to +91 em relação ao códon de terminação (TAA) do gene da ScathL. A posição dos sítios de restrição de *Hind*III e *Eco*RI estão em itálico, respectivamente. O fragmento amplificado foi, então, clonado no vetor pGEM®-T (Promega). O plasmídeo pGEMScathL contendo o gene da ScathL foi digerido com *Nco*I (Invitrogen) e *Not*I (Promega). O fragmento de DNA da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e o fragmento de 1.100 pb, correspondente ao gene da catepsina-L, foi purificado do gel, utilizando-se o kit de extração de DNA Perfect Gel Cleanup Procedure, conforme instruções do fabricante (Eppendorf). Em seguida, foi feita a reação de T₄ DNA polimerase (Invitrogen) e o fragmento contendo o gene da protease catepsina-L foi ligado (utilizando o sistema de ligação rápida - Promega) ao vetor de transferência pSynXIVVI+X3 de 5.847 pb, que possibilita a inserção do gene heterólogo sob o comando de dois promotores em tandem (*pSyn* e *pXIV*) (Wang *et al*, 1991), digerido com *Sma*I (GE) e defosforilado, segundo o protocolo do fabricante (Promega). A ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5a para obtenção do plasmídeo pSynScathL, seguindo o protocolo de

eletroporação (Sambrook & Roussel, 2001) e conforme instruções do fabricante (Gene Pulser II, Biorad).

O plasmídeo pGEMKerat, contendo o gene da queratinase (Noronha *et al.*, 2002) foi amplificado em células DH5 α de *E. coli* e purificado, usando o kit de extração de DNA Concert, conforme instruções do fabricante (Invitrogen). O gene foi digerido com *EcoRI* (GE), a banda de 1.200 pb correspondente foi purificada do gel de agarose 0,8% , utilizando-se o kit de extração de DNA GFX, conforme instruções do fabricante (GE). O fragmento contendo o gene da protease Queratinase foi ligado (utilizando o sistema de ligação rápida - Promega) ao vetor de transferência pSynXIVVI+X3 de 5.847 pb, (Wang *et al.*, 1991), digerido com *EcoRI* (GE) e defosforilado. A ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5 α para obtenção do plasmídeo pSynKerat, como descrito para o gene da ScathL.

O plasmídeo pSynQuit, contendo o gene da quitinase de *M. anisopliae*, foi gentilmente cedido pelo Dr. José Luiz Caldas Wolff, Universidade Presbiteriana Mackenzie e utilizado para a construção do baculovírus recombinante vSynQuit.

Os DNAs plasmidiais pSynScathL, pSynKerat e pSynQuit (1 μ g de cada) foram separadamente co-transfectados com o DNA (0,5 μ g) do vírus vSynVIgal linearizado com *Bsu36I* em células (10^6) de *T. ni* (BTI-TN-5B1-4), usando lipossomos, conforme instruções do fabricante (CellFectin®, Invitrogen). Sete dias após a co-transfecção os sobrenadantes foram coletados e utilizados para o isolamento dos vírus recombinantes vSynKerat, vSynScathL e vSynQuit em diluições seriadas em placa de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992).

Os genes da ScathL e queratinase também foram clonados no vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005). Os DNAs plasmidiais foram co-transfectados

com o DNA (0,5µg) do vírus vAgGalA2 em células (10^6) de *T. ni* (BTI-TN-5B1-4), utilizando lipossomos, conforme instruções do fabricante (CellFectin®, Invitrogen).

3.3. Bioensaios

Trinta larvas de *S. frugiperda* de 3º instar (para cada vírus) foram utilizadas para a inoculação via hemolinfa, 10 µL de cada estoque viral (1×10^6 pfu, unidade formadora de placa) de BV dos vírus AcMNPV, vSynKerat, vSynScathL e vSynQuit e com meio de cultura como controle negativo, com três repetições do experimento. As larvas inoculadas foram colocadas individualmente em recipientes com dieta artificial e observadas duas vezes por dia até a sua morte. A análise da mortalidade (TL_{50}) foi feita utilizando o programa Polo Plus (LeOra Software).

Bioensaios com os vírus oclusos foram realizados utilizando o método “droplet feeding” (Hughes & Wood, 1981) com cinco concentrações dos corpos de oclusão por nanolitro (10^2 , 10^1 , 1.0, 0.1, 0.01 corpos de oclusão/nL). Trinta larvas neonatas de *S. frugiperda* foram utilizadas para inoculação oral com cinco doses virais diferentes para cada vírus recombinante, com o vírus selvagem AcMNPV e somente com corante (2% vermelho fenol) como controle negativo. A mortalidade (TL_{50}) foi observada até 10 dias após infecção e os dados foram analisados utilizando o programa Polo Plus (LeOra Software). Os insetos foram observados a cada oito horas durante dez dias. As larvas inoculadas foram colocadas individualmente em recipientes com dieta artificial, e o experimento foi repetido três vezes. A média do tempo de morte (TD) foi calculada de acordo com Morales *et al.*, 2001.

3.4. Análise estrutural e ultraestrutural dos tecidos internos de larvas de *S. frugiperda* infectadas

Larvas de *S. frugiperda* foram inoculadas conforme descrito anteriormente e dissecadas em diferentes tempos pós infecção. Os insetos foram abertos no dorso, da cabeça ao fim do abdômen, para a exposição do tubo intestinal e de outros órgãos, sendo analisadas e fotografadas em um estereomicroscópio (Stemi SV 11, Zeiss). Larvas não infectadas foram utilizadas como controle. Além disso, insetos não infectados, infectados com o vírus selvagem, AcMNPV e com os vírus recombinantes vSynKerat e vSynScathL foram preparados para microscopia eletrônica de varredura, como descrito em Matos *et al.*, 1999. Brevemente, as amostras foram fixados em uma solução de 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M , pH 6,4 por 2 horas a 4 °C, lavados por 3 ciclos de 15 minutos com tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1:1 e ferrocianeto de potássio por 2 horas e então desidratadas com uma série ascendente de acetona para serem secas ao ponto crítico (Balzer CPD30) e cobertos com ouro no aparelho “sputter coater” (Balzer SCD 050). As amostras foram, então, analisadas no microscópio de varredura JEOL JSM 840 a10 kV.

3.5. Ensaio para atividade de fenoloxidase

Trinta larvas de *S. frugiperda* foram separadamente inoculadas com BV (1×10^6 pfu, unidade formadora de placa) com AcMNPV, vSynKerat, vSynScath. Larvas não infectadas foram utilizadas como controle negativo. Setenta e duas horas p.i., a hemolinfa (113 μ g de proteína) foi coletada e utilizada para detecção de atividade de fenoloxidase seguindo protocolo descrito abaixo. A quantidade total de proteína das amostras foi determinada adicionando-se 200 μ L do reagente colorimétrico (Bradford, 1976) em 3 μ L de amostra, completando-se com 797 μ L de água destilada. As amostras de hemolinfa foram colocadas no gelo e adicionadas em 100 μ L de tampão anticoagulante, pH 4,5 (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M EDTA, 0,041 M ácido cítrico), centrifugadas $3.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo com 800 μ l de 10 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), e incubado por 20 minutos a 25°C e a mistura foi analisada em espectrofotômetro a 475 nm (Hitachi U-2000) por unidade arbitrária em cada 113 μ g de proteína total. O experimento foi repetido três vezes.

3.6. Ensaio para atividade de quitinase

Os ensaios de atividade de quitinase foram realizados com amostras dos corpos de oclusão dos vírus AcMNPV e vSynQuit, na concentração de 20.000 poliedros. A quantidade total de proteína das amostras foi determinada adicionando-se 200 μ L do reagente colorimétrico (Bradford, 1976) em 5 μ L de amostra, completando-se com 795

μL de água destilada. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi determinada a 595 nm. A quantidade de proteína total foi calculada utilizando-se uma curva padrão construída com quantidades crescentes de BSA (albumina sérica bovina, Sigma CO.) na faixa de 0 a 10 μg . A atividade quitinolítica foi mensurada através do método modificado por Molano *et al.* (1997) através do ensaio enzimático com quitina regenerada (quitina regenerada 0,5 % em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) com 500 μL de tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Essa reação foi incubada a 37°C durante 8 horas. A quantificação dos açúcares redutores liberados da quitina foi feita adicionando-se 1,0 mL do reagente DNS (Miller, 1959). Em seguida, foram adicionados 250 μL do sobrenadante da centrifugação do produto da incubação, com 750 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS), seguindo-se aquecimento em banho de água fervente por 10 minutos e a quantidade de N-acetilglucosamina (GlcNac) formada foi determinada pela absorbância a 550 nm no espectrofotômetro (Hitachi U-2000), por unidade arbitrária em cada 100 μg de proteína total. Enzima desnaturada, após incubação em banho de água fervente por 10 minutos e quitina regenerada dissolvida em água (sem enzima) foram utilizadas como controles.

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos plasmídeos e dos vírus recombinantes

O gene da catepsina-L de *S. peregrina* foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo pKYH5 e clonado no vetor pGEM®-T (dados não mostrados). Para a clonagem do gene *ScathL*, no vetor de transferência pSynXIVVI+X3, o plasmídeo pGEMScathL foi digerido com *NcoI* e *NotI* (dados não mostrados), e o fragmento de 1.100 pb foi ligado ao vetor pSynXIVVI+X3, formando um novo plasmídeo, denominado pSynScathL. O plasmídeo pSynKerat foi construído a partir da digestão do plasmídeo pGEMKerat com *EcoRI*, purificação do fragmento contendo o gene *kerat* e inserido no plasmídeo pSynXIVVI+X3, gerando o plasmídeo pSynKerat.

Os vetores pSynScathL, pSynKerat e pSynQUIT foram co-transfectados, separadamente, com DNA do vírus vSynVIgal em células BTI-Tn5B1-4. No interior das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre as regiões do plasmídeo vetor e do genoma viral, ocorrendo a troca de regiões homólogas entre o DNA plasmidial e o DNA do vírus vSynVIgal. (Figura 5).

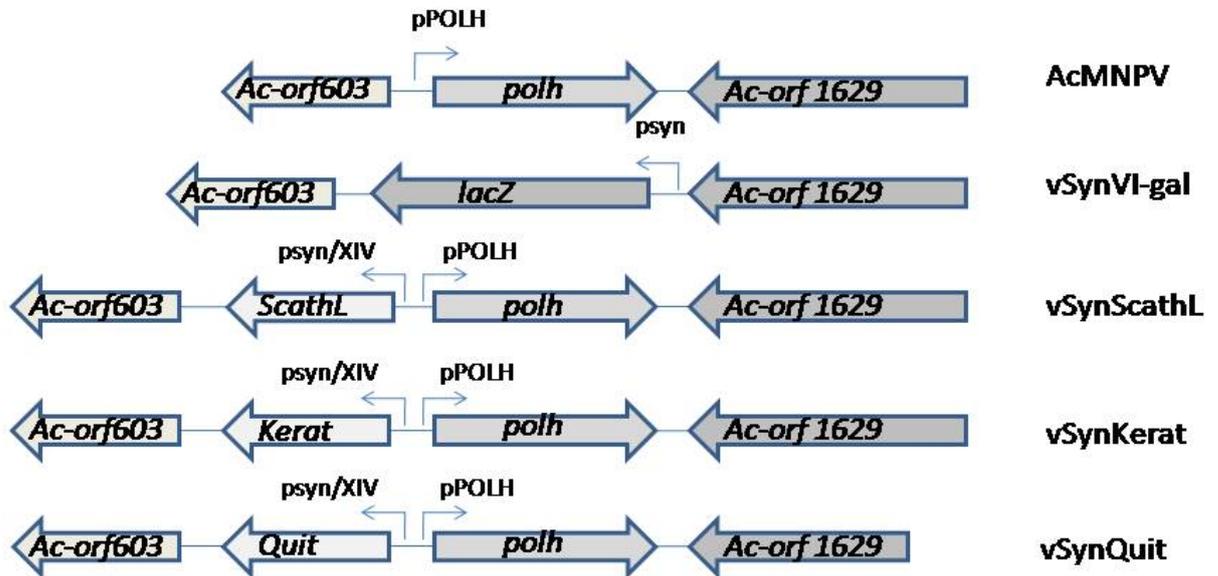


Figura 5: Esquema mostrando o gene da poliedrina do vírus selvagem AcMNPV e os diferentes vírus recombinantes.

polh (poliedrina), *lac-Z* (β -galactosidase), *ScathL* (catepsina), *Kerat* (queratinase) e *Quit* (quitinase). Os genes *Ac-orf603* e *Ac-orf1629* também estão na figura. A posição dos promotores pSyn/XIV e pPOLH também são mostrados.

4.2. Bioensaios

Trinta larvas de *S. frugiperda* de 3º instar foram separadamente inoculadas via hemolinfa com aproximadamente 10^6 pfu por larva com os BV dos vírus AcMNPV, vSynScathL, vSynKerat e vSynQuit e com meio de cultura como controle negativo. O vírus recombinante vSynScathL, assim como vSynKerat e vSynQuit foram capazes de induzir a morte nas larvas de 3º instar mais rápido comparado ao vírus selvagem (Tabela 1 e 2). O vSynScathL apresentou uma TL_{50} e TD de 47 horas e 2,62 dias, respectivamente, enquanto o AcMNPV, uma TL_{50} de 136 horas e TD de 5,37 dias, respectivamente. Isso representa uma diminuição significativa de 65,5% no tempo necessário para o vírus matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem. A TL_{50} e TD para o vírus vSynKerat foi de 91 horas e 3,70 dias, respectivamente, com uma redução de 32,8% quando comparado ao vírus AcMNPV.

Já, o vírus recombinante vSynQuit, apresentou uma TL_{50} de 110,67 horas, o que foi 23,6% menor do que o vírus selvagem AcMNPV (TL_{50} de 144,97) (Tabela 2).

Bioensaios com os vírus oclusos foram realizados utilizando o método “droplet feeding” com larvas neonatas de *S. frugiperda* com cinco diferentes concentrações dos corpos de oclusão dos vírus AcMNPV, vSynScathL, vSynKerat e vSynQuit. O vírus recombinante vSynScathL foi capaz de induzir a morte das larvas neonatas mais rapidamente comparado ao vírus selvagem (Tabela 5). O vSynScathL mostrou uma TL_{50} de 77 horas comparado ao AcMNPV de 104 horas quando inoculado com 10^2 corpos de oclusão/nL. Isso representa uma redução de 26% no tempo necessário para matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem AcMNPV. A TL_{50} do vírus vSynKerat foi de 54 horas, com uma redução de 48%

comparado ao vírus AcMNPV; já a TL_{50} do vírus vSynQuit foi de 86 horas, com uma redução de 45,2% comparado ao vírus selvagem (Tabela 6). Também analisamos a CL_{50} dos vírus recombinantes, mas não houve diferença significativa quando comparado ao vírus selvagem (Tabela 3 e 4).

Tabela 1: Valores de TL_{50} para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat inoculados em larvas de *S. frugiperda* 3° instar.

As larvas foram inoculadas com 10^6 pfu/larva na hemolinfa com os baculovírus recombinantes vSynScathL e vSynKerat e com baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	<i>TL₅₀</i>	<i>LF (95%)</i>		<i>TD/SD</i>
		<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
AcMNPV	136,15	119,91	161,86	5,23(+/- 0,28)
vSynScathL	47,00	33,51	57,60	2,61(+/- 0,07)
vSynKerat	91,44	78,28	105,14	3,65(+/- 0,36)

TL_{50} : Tempo Letal em 50% das larvas, em horas.

LF: Limite fiducial a 95%.

TD: Média do tempo de morte, em dias.

SD: desvio padrão.

Tabela 2: Valores de TL₅₀ para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit inoculadas em larvas de *S. frugiperda* 3º instar.

As larvas foram inoculadas com 10⁶ pfu/larva na hemolinfa com o baculovírus recombinante vSynQuit e com baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	<i>TL₅₀</i>	<i>LF (95%)</i>	
		<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
AcMNPV	144,97	128,07	168,79
vSynQuit	110,67	101,05	120,59

TL₅₀: Tempo Letal em 50% das larvas, em horas.

LF: Limite fiducial a 95%.

Tabela 3: Valores de CL₅₀ para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat em larvas neonatas de *S. frugiperda* infectadas oralmente com poliedros.

As larvas foram inoculadas com diferentes doses de corpos de oclusão com os baculovírus recombinantes vSynScathL e vSynKerat e com o baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	<i>CL₅₀</i> (corpos de oclusão/nL)	<i>LF (95%)</i>		<i>χ² (df)</i>
		<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
AcMNPV	32,32	19,10	47,84	1,49(3)
vSynScathL	8,15	1,73	26,72	3,99(3)
vSynKerat	30,41	17,58	51,17	1,28(3)

CL₅₀: Concentração Letal em 50% das larvas, em corpos de oclusão/nL.

LF: Limite fiducial a 95%.

χ²: qui-quadrado.

df: graus de liberdade.

Tabela 4: Valores de CL_{50} para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit em larvas neonatas de *S. frugiperda* inoculadas oralmente com poliedros.

As larvas foram inoculadas com diferentes doses de corpos de oclusão com o baculovírus recombinante vSynQuit e com o baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	CL_{50}	<i>LF (95%)</i>	<i>LF (95%)</i>	χ^2 (df)
	(corpos de oclusão/nL)	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
AcMNPV	17,32	7,20	56,09	12,49 (3)
vSynQuit	2,55	0,38	11,72	5,32 (3)

CL_{50} : Concentração Letal em 50% das larvas, em corpos de oclusão/nL.

LF: Limite fiducial a 95%.

χ^2 : qui-quadrado.

df: graus de liberdade.

Tabela 5: Valores de TL_{50} para o vírus selvagem e os recombinantes vSynScathL e vSynKerat em larvas neonatas de *S. frugiperda* inoculadas oralmente com poliedros.

As larvas foram inoculadas com 10^2 corpos de oclusão/nL com os baculovírus recombinantes vSynScathL e vSynKerat e com o baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	TL_{50}	<i>LF (95%)</i>	<i>LF (95%)</i>	<i>TD/SD</i>
		<i>Abaixo</i>	<i>Acima</i>	
AcMNPV	104	94,07	112,05	4,16/(+/- 0,6)
vSynScathL	77	49,26	93,91	3,46/(+/-0,4)
vSynKerat	54	37,71	71,29	3,87(+/- 0,58)

TL_{50} : Tempo Letal em 50% das larvas, em horas.

LF: Limite fiducial a 95%.

TD: Média do tempo de morte, em dias.

SD: desvio padrão.

Tabela 6: Valores de TL₅₀ para o vírus selvagem e o recombinante vSynQuit em larvas neonatas de *S. frugiperda* infectadas oralmente com poliedros.

As larvas foram inoculadas com 10² corpos de oclusão/nL com o baculovírus recombinante vSynQuit e com o baculovírus selvagem.

<i>Vírus</i>	<i>TL₅₀</i>	<i>LF (95%)</i>	<i>LF (95%)</i>	<i>TD/SD</i>
		<i>Abaixo</i>	<i>Acima</i>	
AcMNPV	157	143,91	171,77	4,43(+/- 0,75)
vSynQuit	86	65,54	100,07	3,75(+/- 0,42)

TL₅₀: Tempo Letal em 50% das larvas, em horas.

LF: Limite fiducial a 95%.

TD: Média do tempo de morte, em dias.

SD: desvio padrão.

4.3. Análise estrutural e ultraestrutural dos tecidos das larvas de *S. frugiperda* infectadas com os diferentes vírus

A cutícula e os tecidos internos de lagartas de *S. frugiperda* não infectadas e infectadas com AcMNPV, vSynScathL, vSynKerat e vSynQuit foram analisadas em um estereomicroscópio (Figuras 6 e 8). Nos estágios finais da infecção, os vírus com os genes da ScathL e queratinase induzem a melanização da cutícula, não ocorrendo o mesmo com o vírus selvagem (Figuras 6 e 8). Os tecidos internos de lagartas infectadas pelos vSynScathL e vSynKerat foram também analisados em um microscópio eletrônico de varredura (Figura 9). As larvas infectadas com AcMNPV apresentaram tecido adiposo (Figura 9) e o sistema traqueal firmemente ligado ao intestino da lagarta (Figura 9). Já, as larvas infectadas com vSynScathL e vSynKerat apresentaram pouco

ou ausência de tecido adiposo (Figura 8) e o sistema traqueal estava frouxamente ligado ao intestino médio do inseto e apresentaram melanização da cutícula (Figuras 6 e 8).

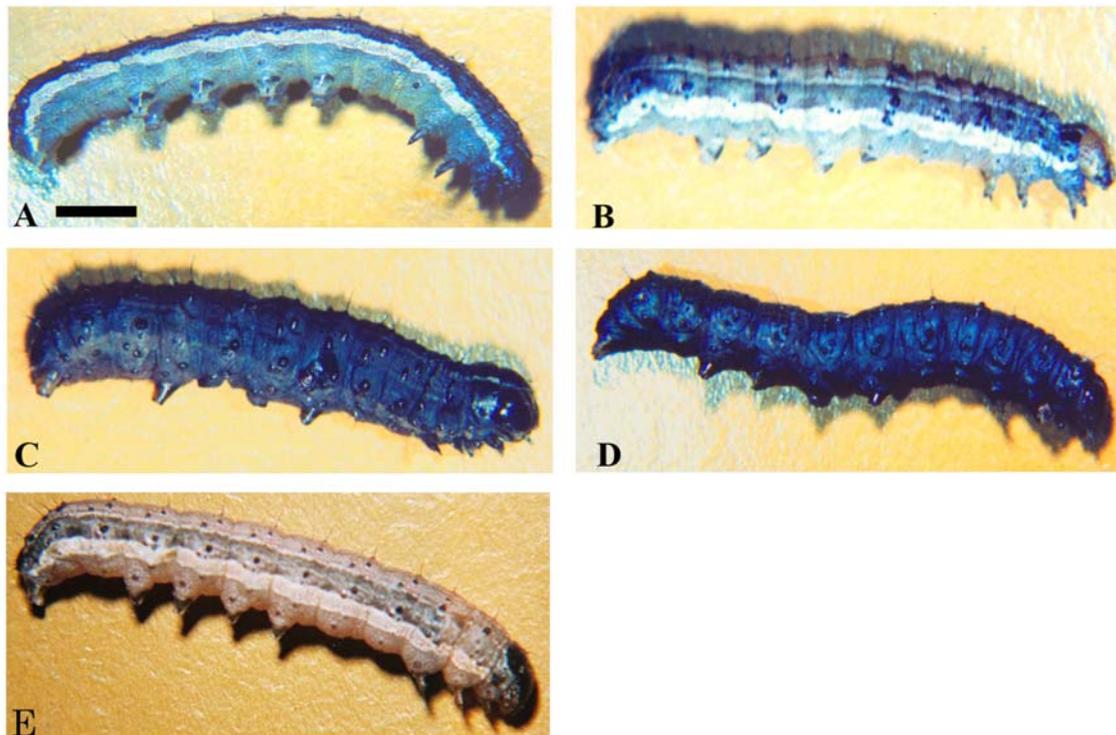


Figura 6: Análise estrutural da cutícula de larvas de *S. frugiperda* infectadas pelo AcMNPV selvagem e recombinantes.

Larvas não infectada (A) e infectadas com os vírus selvagem AcMNPV (120 h p.i.) (B), recombinante vSynScathL (96 h p.i.) (C), vSynKerat (96 h p.i.) (D) e vSynQuit (96 h p.i.) (E). Observar melanização da cutícula nas larvas infectadas com os vírus vSynScathL e vSynKerat C e D. Barra = 0,38 cm.

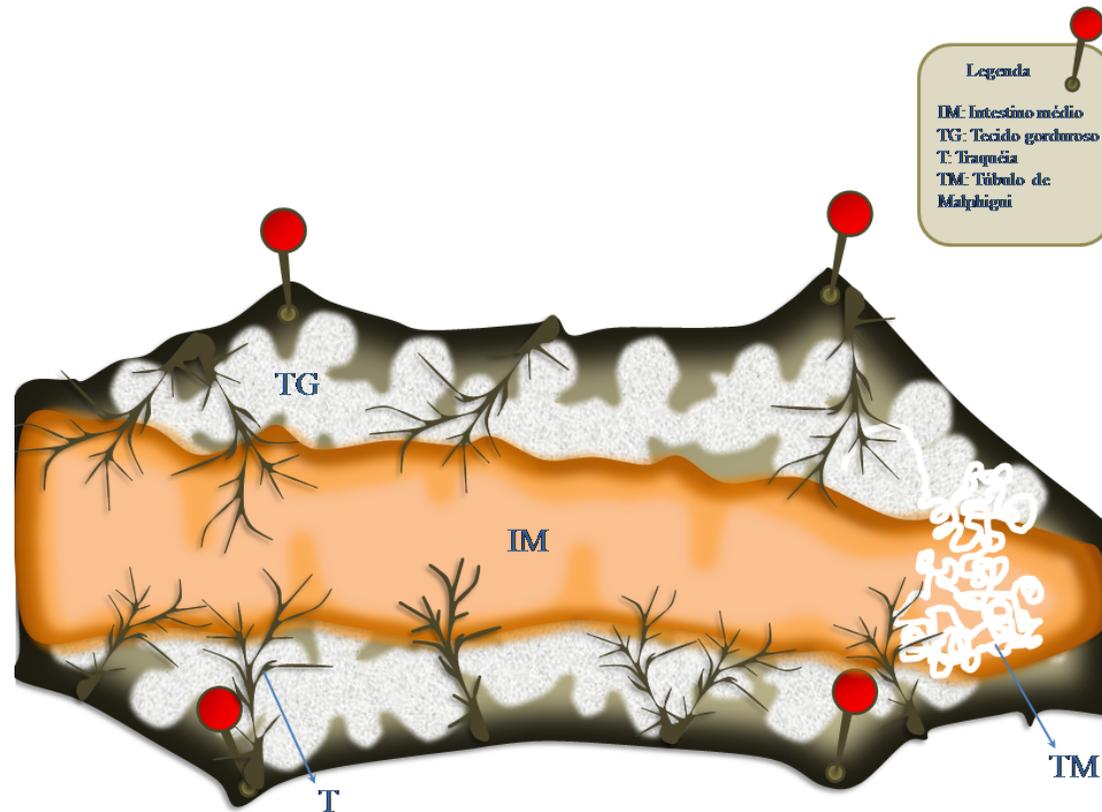


Figura 7: Esquema mostrando as estruturas internas de uma lagarta de *S. frugiperda* não infectada.

A figura mostra uma lagarta de 6º instar aberta ao longo da parte dorsal, a partir da cabeça até o último par de patas, o intestino médio (IM), tecido gorduroso (TG), traquéia (T) e Túbulo de Malpighi (TM) de uma larva não infectada de *S. frugiperda* aberta dorsalmente. Ilustração feita por Maria Creuza do Espírito Santo Barros, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia, UnB.

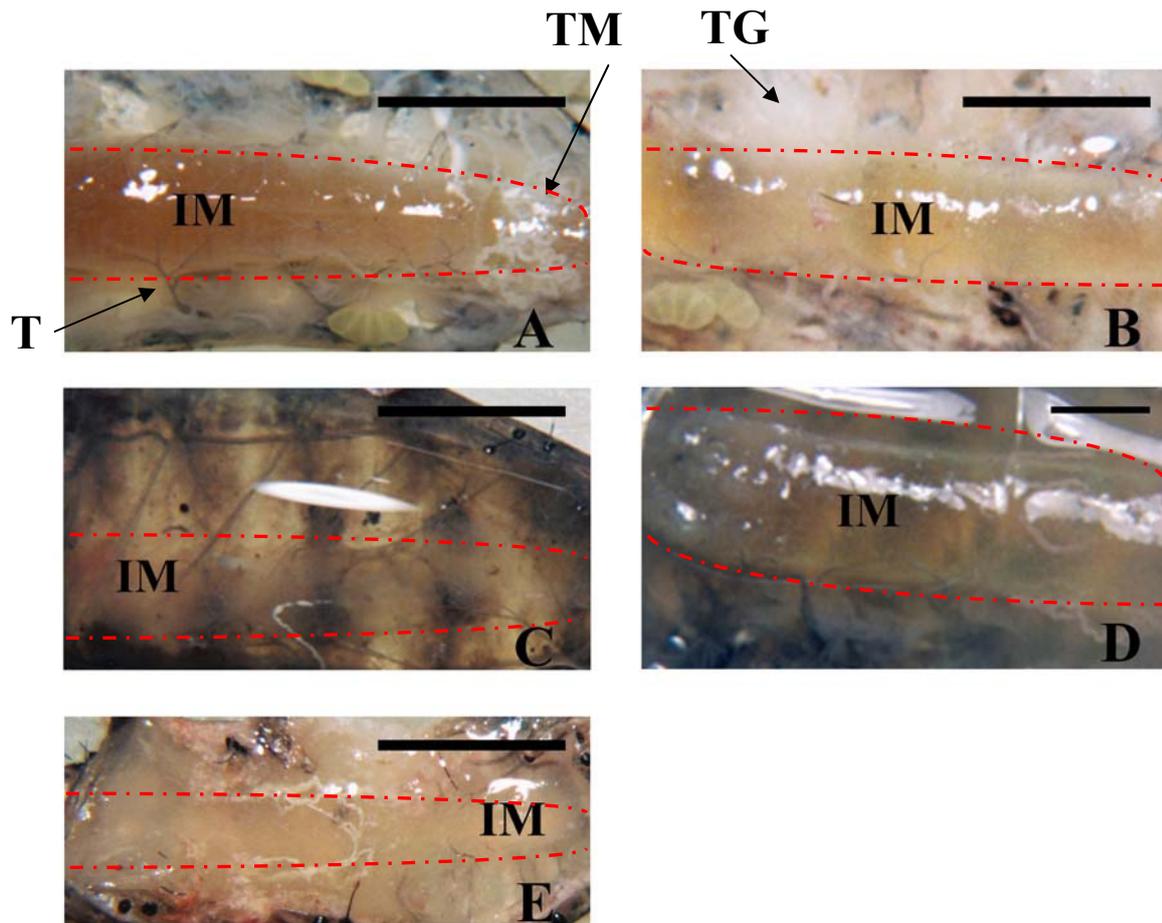


Figura 8: Análise estrutural dos tecidos internos de larvas de *S. frugiperda*.

Tecidos internos de lagartas não infectada (132 h p.i) (A), infectadas com o baculovírus AcMNPV (B), vSynScathL (C), vSynKerat (D) e vSynQuit (E). Em C e D observamos além da melanização da cutícula, diminuição de tecido gorduroso. A posição do intestino em cada figura está indicada em vermelho. IM – Intestino Médio, T – Traquéia, TM – Túbulos de Malphigi, TG – Tecido Gorduroso. Barra = 0,35 cm

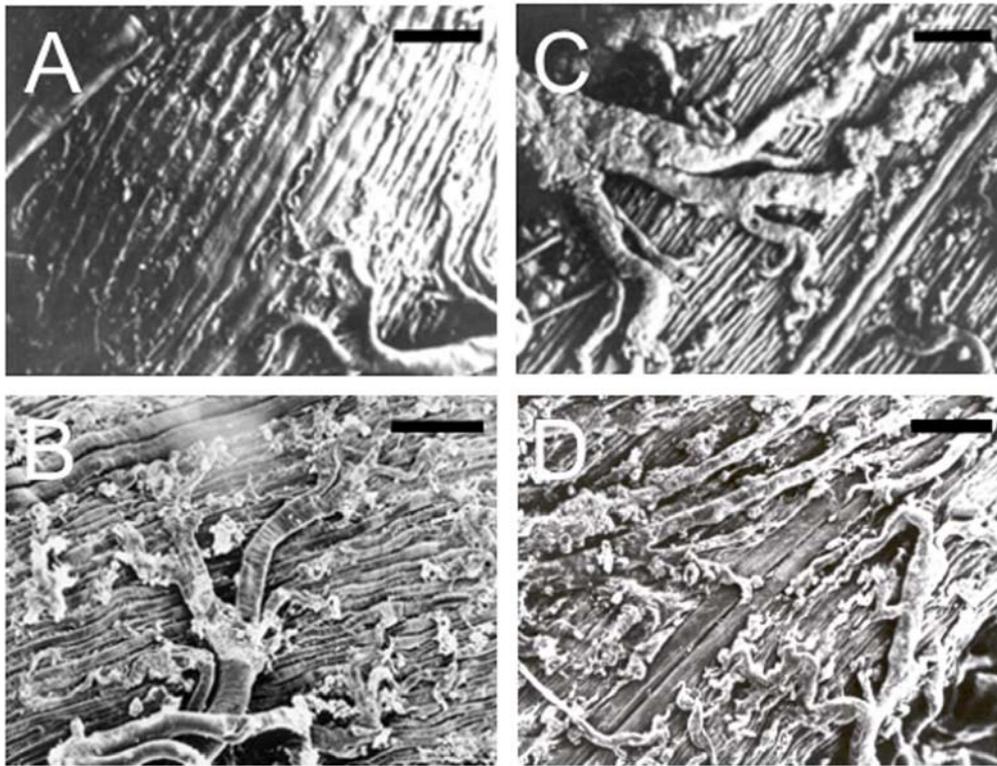


Figura 9: Ultraestrutura de intestinos de larvas *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes e o AcMNPV 96 h p.i..

Micrografias eletrônicas de varredura mostrando a integridade dos tecidos ao redor do intestino da lagarta não infectada (A), sistema traqueal firmemente aderido ao intestino e destruição parcial do tecido conectivo em larva infectada com o vírus selvagem AcMNPV (C) e afrouxamento do sistema traqueal e intensa destruição tecidual em larva infectada com vSynScathL (B) e vSynKerat (D). Barra = 100 μ M.

4.4. Atividade de fenoloxidase

A atividade de fenoloxidase foi determinada através do espectrofotômetro pela medida da formação de L-DOPA a 475 nm em amostras de hemolinfa de insetos não infectados e infectados com AcMNPV, vSynScathL e vSynKerat (Figura 10). Foi observado um aumento expressivo da atividade de fenoloxidase em hemolinfa de larvas *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSynScathL (0,23) e vSynKerat (0,17) quando

comparado com hemolinfa não infectada (0,10) e infectada com AcMNPV (0,05). O experimento foi repetido três vezes.

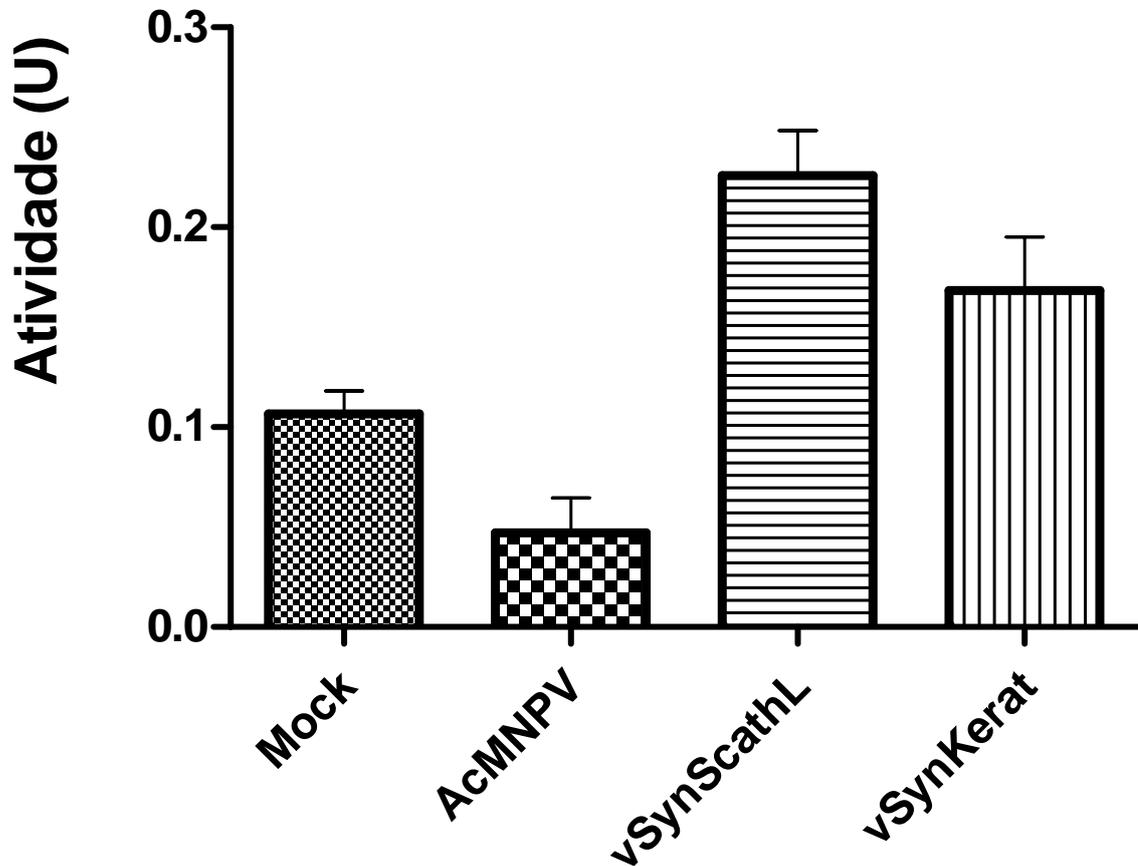


Figura 10: Atividade de fenoloxidase em hemolinfa de *S. frugiperda* infectada.

A hemolinfa foi coletada 72 h p.i, as células foram removidas por centrifugação e a atividade de fenoloxidase foi determinada pelo espectrofotômetro utilizando a hemolinfa (113µg) e 1-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) como substrato. Esse experimento foi repetido três vezes. Notar que a hemolinfa de insetos infectados com os vírus recombinantes vSynScathL e vSynKerat mostram uma ativação desta enzima.

4.5. Atividade de quitinase

O ensaio enzimático com quitina regenerada mostrou uma diferença quitinolítica significativa em relação aos corpos de oclusão do vírus recombinante vSynQuit (3,53) em comparação ao vírus selvagem AcMNPV (0,63), o mesmo ocorreu utilizando o substrato quitina azul (dados não mostrados), (Figura 11).

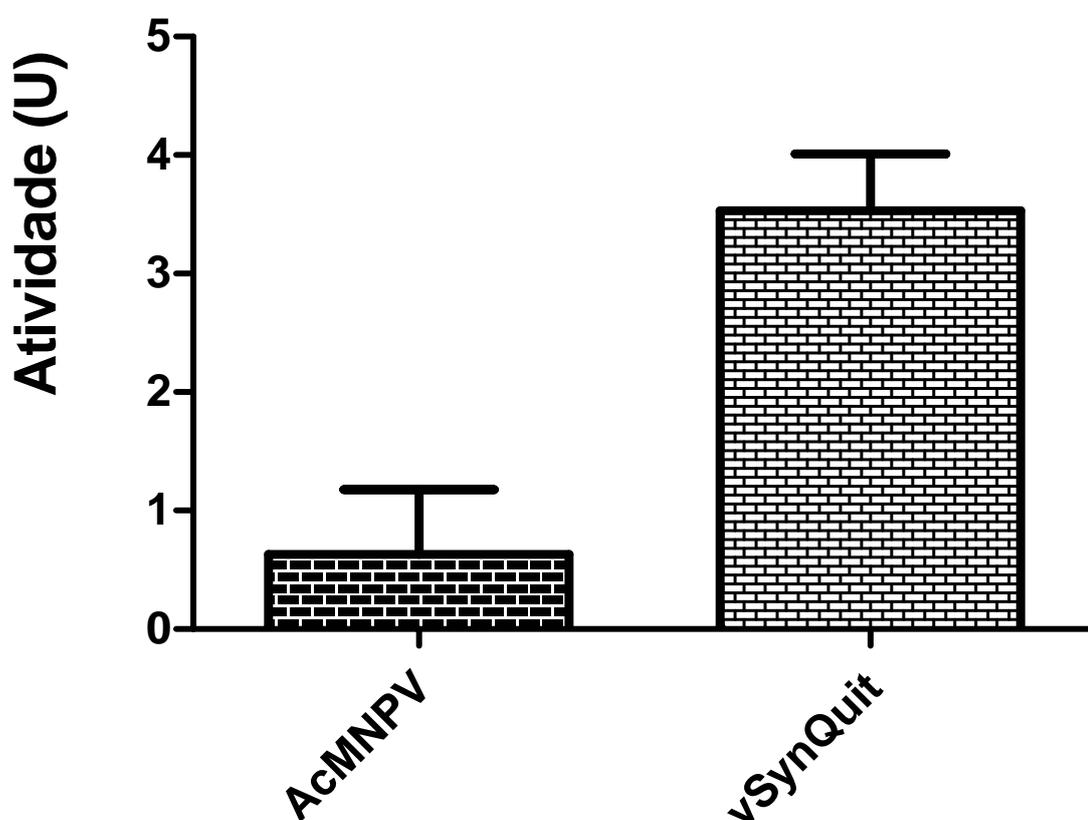


Figura 11: Atividade quitinolítica de amostras de poliedros de AcMNPV e vSynQuit. A figura mostra a diferença significativa de atividade quitinolítica de poliedros de AcMNPV e vSynQuit por unidade arbitrária em cada 100 μ g de proteína total determinada pela absorbância a 550 nm.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi inserido os genes ScathL de *S. peregrina*, queratinase de *A. fumigatus* e de uma quitinase de *M. anisopliae* no genoma do baculovírus AcMNPV utilizando o vetor pSynXIVVI+X3 e analisados os efeitos da patogenicidade viral. O vírus recombinante vSynScathL construído neste trabalho, confirmou os dados previamente mostrados por Harrison & Bonning (2001), ocorrendo uma expressão aumentada do gene ScathL e da velocidade de morte quando comparado ao vírus selvagem AcMNPV. O recombinante vSynScathL apresentou uma TL₅₀ e TD de 47 horas e 2,62 dias, respectivamente, enquanto o AcMNPV uma TL₅₀ de 136 horas e TD de 5,37 dias, respectivamente, o que representa uma diminuição significativa de 65,5% para TL₅₀ e 50,09% para TD, no tempo de sobrevivência de *S. frugiperda* quando 10⁶ pfu foram inoculados na hemolinfa em larvas de 3º instar. Já em larvas neonatas de *S. frugiperda* o vSynScathL mostrou uma TL₅₀ de 77 horas comparado ao AcMNPV de 104 horas quando inoculado com 10² corpos de oclusão/nL, já o TD foi de 3,46 dias para o vírus recombinante e 4,16 dias para o AcMNPV. Isso representa uma redução de 26% na TL₅₀ e 16,82% para TD no tempo necessário para matar os insetos infectados quando comparado ao vírus selvagem AcMNPV. Harrison & Bonning (2001) mostraram uma redução de 49% no tempo de sobrevivência de larvas neonatas de *H. virescens* quando inoculadas *per os* com AcMNPV recombinante contendo o gene ScathL sob o comando do promotor *p6.9* (AcMLF9.ScathL) quando comparado ao vírus selvagem AcMNPV. Além disso, Li *et al.* (2008) mostrou que a ScathL purificada foi capaz de matar insetos na ausência de infecção por baculovírus por injeção da protease na hemocele. A diferença no tempo de sobrevivência das larvas do trabalho de Harrison

& Bonning (2001) e deste trabalho pode ser devido à diferença de promotores utilizados para a expressão do gene ScathL e da diferença de susceptibilidade dos insetos testados, pois *S. frugiperda* é 1000x menos susceptível ao AcMNPV pela inoculação oral quando comparado às larvas de *T. ni* (Clarke *et al.*, 2002).

Também foi introduzido o gene queratinase (uma serino-protease) do fungo *A. fumigatus* no genoma do AcMNPV utilizando o mesmo vetor, ocorrendo um aumento na velocidade de morte em larvas de *S. frugiperda*. A TL₅₀ e TD para o vírus vSynKerat foi de 91 horas e 3,70 dias, respectivamente, com uma redução de 32,8% para TL₅₀ e 30,21% para TD, no tempo necessário para o vírus matar os insetos infectados quando comparado ao vírus AcMNPV ocorrendo a inoculação de 10⁶ pfu de BVs na hemolinfa em larvas de 3º instar. A TL₅₀ do vírus vSynKerat em larvas de *S. frugiperda* neonatas foi de 54 horas, com uma redução de 48% comparado ao vírus AcMNPV e o TD de 3,87 dias, reduzindo 6,97% no tempo necessário para matar os insetos. Serino proteases fúngicas são conhecidas por suas propriedades que reforçam a invasibilidade fúngica (Blanco *et al.*, 2002; Kolattukudy *et al.*, 1993). A produção da serino protease de *A. fumigatus* é capaz de degradar elastina e mucina, além de outros substratos (St Leger *et al.*, 1996 a). Como o vSynKerat possui o gene de uma serino protease de *A. fumigatus*, nós então, esperávamos que a expressão desta proteína dentro de larvas de insetos infectados aumentasse a patogenicidade viral semelhantemente à ScathL, degradando proteínas da matriz extracelular e/ou interferindo na atividade da fenoxidase no inseto hospedeiro.

Outro gene introduzido no genoma do baculovírus AcMNPV neste trabalho, foi o de uma quitinase de *M. anisopliae*. O AcMNPV possui um gene de quitinase (Ayres *et al.*, 1994), sendo expresso como uma proteína da fase tardia de 58 kDa com atividade de endoquitinase e exoquitinase (Hawtin *et al.*, 1995). As proteínas virais

quitinase (Hawtin *et al.*, 1997) e catepsina (Rawlings *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1995) funcionam juntas para promover a liquefação do hospedeiro antes da morte. Desse modo, a progênie viral e a transmissão horizontal da infecção são facilitadas. A larva torna-se flácida e a cutícula extremamente frágil, rompendo sob qualquer pressão. Ocorre a degradação dos componentes protéicos da membrana basal dos tecidos internos dos insetos infectados e a melanização da cutícula (Hom & Volkman, 2000). O gene da catepsina de AcMNPV pode ser deletado sem afetar a replicação viral em cultura de células ou insetos, mas a deleção da quitinase ou catepsina revoga o processo de liquefação (Slack *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997). A desintegração do inseto infectado pelo AcMNPV é vantajosa, pois permite uma disseminação máxima de poliedros no ambiente (Saville *et al.*, 2004). Desta forma, a super expressão de quitinases em insetos infectados com o AcMNPV recombinante contendo, além do gene de quitinase viral, o gene da quitinase do fungo *M. anisopliae*, poderia aumentar a sua virulência pela maior degradação da cutícula do inseto ou pela presença de mais vírus na membrana peritrófica. No presente trabalho, o vírus recombinante vSynQuit, apresentou uma TL₅₀ de 110,67 horas, o que foi 23,6% menor do que o vírus selvagem, AcMNPV (TL₅₀ de 144,97) em larvas de 3º instar, confirmando o aumento na virulência do vírus recombinante em relação ao vírus selvagem. Já em relação às larvas neonatas, o vírus recombinante vSynQuit apresentou uma TL₅₀ de 86 horas, 45,2% menor em relação ao vírus selvagem e o TD de 3,75 dias comparado com o vírus selvagem de 4,43 dias, representando uma redução de 15,34% no tempo necessário para matar os insetos. Um AcMNPV contendo o gene da quitinase de *M. sexta*, sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*), foi construído. Esse recombinante mostrou uma velocidade maior de morte contra a larva de *S. frugiperda*, 75 horas, via injeção de BV na hemocele, quando comparado ao vírus selvagem, 100 h, representando uma

redução de 25% no tempo de sobrevivência dos insetos infectados (Gopalakrishnan *et al.*, 1995).

A introdução de genes no genoma dos baculovírus tem sido realizada com diversas finalidades, como, por exemplo, para aumentar a virulência do vírus em seu hospedeiro (Castro *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2002), e como vetor de expressão de proteínas heterólogas em cultura de células de insetos (Luckow & Summers, 1988; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Jarvis *et al.*, 1997; Jehle *et al.*, 2006).

Diferentes genes foram introduzidos no genoma dos baculovírus com o objetivo de aumentar a patogenicidade contra seus hospedeiros. Por exemplo, AcMNPV recombinantes expressando JHE do vírus selvagem e versões mutadas do JHE foram capazes de aumentar a patogenicidade viral e reduzir o consumo de alimento pela larvas de *H. virescens* e *T. ni* (Hammock *et al.*, 1990; Bonning *et al.*, 1997; Bonning, *et al.*, 1999).

A toxina derivada do ácaro *Pyemotes tritici*, TxP-1, foi também introduzida no genoma de AcMNPV e mostrou uma melhora na atividade inseticida. Os baculovírus recombinantes, expressando TxP-1, tiveram uma redução no tempo de morte de 30-40% mais rápido comparado ao vírus selvagem (Tomalski & Miller, 1991, 1992; Lu *et al.*, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados com a toxina AaIT do escorpião *Androctonus australis*, com uma redução no tempo letal de 25-40% comparado ao vírus selvagem (McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; Zlotkin *et al.*, 2000; Treacy *et al.*, 2000). Outras toxinas de escorpiões (Froy *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2000), de aranhas (Prikhod'ko *et al.*, 1998), de anêmonas do mar (Prikhod'ko *et al.*, 1998) e de *B. thuringiensis* (Ribeiro & Crook, 1993; Ribeiro *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2003) foram também expressas usando baculovírus, tendo mostrado a maioria redução no tempo letal dos vírus recombinantes.

Promotores fortes como os presentes no vetor de transferência pSynXIVVI⁺X3 (Wang *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1992) são amplamente utilizados para expressar proteínas heterólogas em altos níveis em células de inseto. Este vetor possui dois promotores em tandem (pSyn e PXIV) que são ativos das fases tardia à muito tardia da transcrição (Wang *et al.*, 1991) e são responsáveis pelos altos níveis de expressão da proteína heteróloga durante a infecção. Este vetor possui também o gene *polh* que facilita a detecção e o isolamento do vírus recombinante quando co-transfectado com DNA de vírus sem o gene da poliedrina.

Baculovírus recombinantes que expressam proteases que potencialmente degradam a membrana basal dos tecidos dos insetos também foram desenvolvidos. Um AcMNPV recombinante foi construído com a introdução do gene ScathL de *S. peregrina*, sob o comando do promotor *p6.9.*, reduzindo significativamente para 49% o tempo de sobrevivência do inseto neonato *H. virescens* e também diminuindo o consumo de alimento da lagarta infectada quando comparado ao vírus selvagem (Harrison & Bonning, 2001).

A melanização da cutícula, observada nos bioensaios com os vírus recombinantes vSynScathL e vSynKerat, pode ter sido provocada pela presença, na hemolinfa do inseto, da enzima fenoxidase, encontrada na forma de pro-enzima na hemolinfa. Nos invertebrados, a presença de antígenos e o aparecimento de injúrias teciduais provocam a deposição de melanina ao redor do tecido lesado ou do antígeno e também da esclerotização da cutícula (Cerenius & Soderhall, 2004). A melanização da cutícula e dano tecidual, incluindo ruptura do intestino e fragmentação do tecido gorduroso foi mostrado em larvas de *H. virescens* infectadas com o vírus AcMNPV recombinante contendo o gene da ScathL (Harrison & Bonning., 2001; Tang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007), sugerindo que a ScathL foi capaz de causar fragmentação no

inseto antes de sua morte e ativar a cascata acionada por serino-proteases que leva à conversão da pro-fenoloxidase em sua forma ativa ou ativação da fenoloxidase diretamente. No entanto, Li *et al.* (2008) mostrou que a atividade de cisteíno protease da ScathL purificada não foi capaz de ativar a pro-fenoloxidase em fenoloxidase *in vitro* e a atividade de fenoloxidase na hemolinfa de larvas *H. virescens* não foi alterada pelo vírus recombinante contendo o gene da ScathL sob o comando do promotor *p6.9* (AcMLF9.ScathL).

No presente trabalho foi visto que os dois recombinantes (vSynScathL e vSynKerat) contendo os genes ScathL e queratinase, sob o comando de promotores fortes, foram capazes de aumentar a atividade de fenoloxidase na hemolinfa de larvas *S. frugiperda*. Como a queratinase é uma serino-protease, este resultado é esperado, pois serino proteases são enzimas envolvidas na produção de melanina (Cerenius & Soderhall., 2004). O aumento da atividade de fenoloxidase na hemolinfa pelo vírus vSynScathL pode ser explicada, em parte, pelo alto nível de expressão dessa proteína nos insetos infectados. No entanto, maiores análises são necessárias para compreender o papel da ScathL no aumento da atividade de fenoloxidase.

A CL_{50} dos três vírus recombinantes não mostrou diferença significativa quando comparado ao vírus selvagem (Tabela 3 e 4).

Apesar dos baculovírus recombinantes ainda não serem amplamente utilizados para o controle de pragas, eles constituem uma alternativa viável ao uso dos inseticidas químicos. Os baculovírus recombinantes contendo genes de proteases podem ser adicionados à lista de baculovírus recombinantes com grande potencial para serem usados em programas integrados de controle de pragas.

Capítulo II

Análise da expressão diferencial de genes de baculovírus *in*

vivo

1. INTRODUÇÃO

Várias técnicas que fornecem aos pesquisadores a habilidade do estudo de expressão gênica diferencial em um organismo ou célula, identificando gene(s) envolvido(s) em um determinado processo ou tratamento, foram desenvolvidas (Liang & Pardee, 1992; Diatchenko *et al.*, 1996). Essas inovações permitem a detecção de mudanças na expressão gênica pelo enriquecimento seletivo de uma população de RNAm sem qualquer conhecimento prévio de sequência dos genes específicos em questão (Pastorian *et al.*, 2000). Os métodos mais utilizados são: Análise de Diferença Representacional (RDA) (Hubank & Schatz, 1994) (Figura 12); Apresentação Diferencial (do inglês, “differential display”, DD) (Liang & Pardee, 1992); PCR de Oligonucleotídeo-ligado Arbitrário (do inglês, “arbitrarily primed polymerase chain reaction”, RAP-PCR), (Mathieu-Daude *et al.*, 1999) e Hibridização Subtrativa (do inglês, “subtractive hybridization”, SH) (Diatchenko *et al.*, 1996). Basicamente, todos estes métodos são desenhados para amplificar sequências de ácidos nucleicos presentes em uma amostra e ausentes em outra (ou expressas em menor extensão). Embora cada um destes procedimentos tenha sido utilizado para clonar RNAm raros e novos, uma considerável atenção deve ser dada para cada método com o objetivo de determinar qual é mais adequado para um dado experimento (Wan *et al.*, 1996). Dentre os fatores que

influenciam a escolha de um método específico estão a habilidade de amplificação de RNAs potencialmente raros, os níveis de diferença detectável, a habilidade de comparação de múltiplas amostras simultaneamente e o número de falsos positivos. Experimentos de expressão diferencial de genes podem ser laboriosos e consumir muito tempo. Desta maneira, a velocidade e a facilidade de uso de cada técnica são considerações importantes, visto que a maioria do trabalho concentra-se em etapas posteriores de sequenciamento, identificação, clonagem e obtenção de cDNAs completos e análise de função.

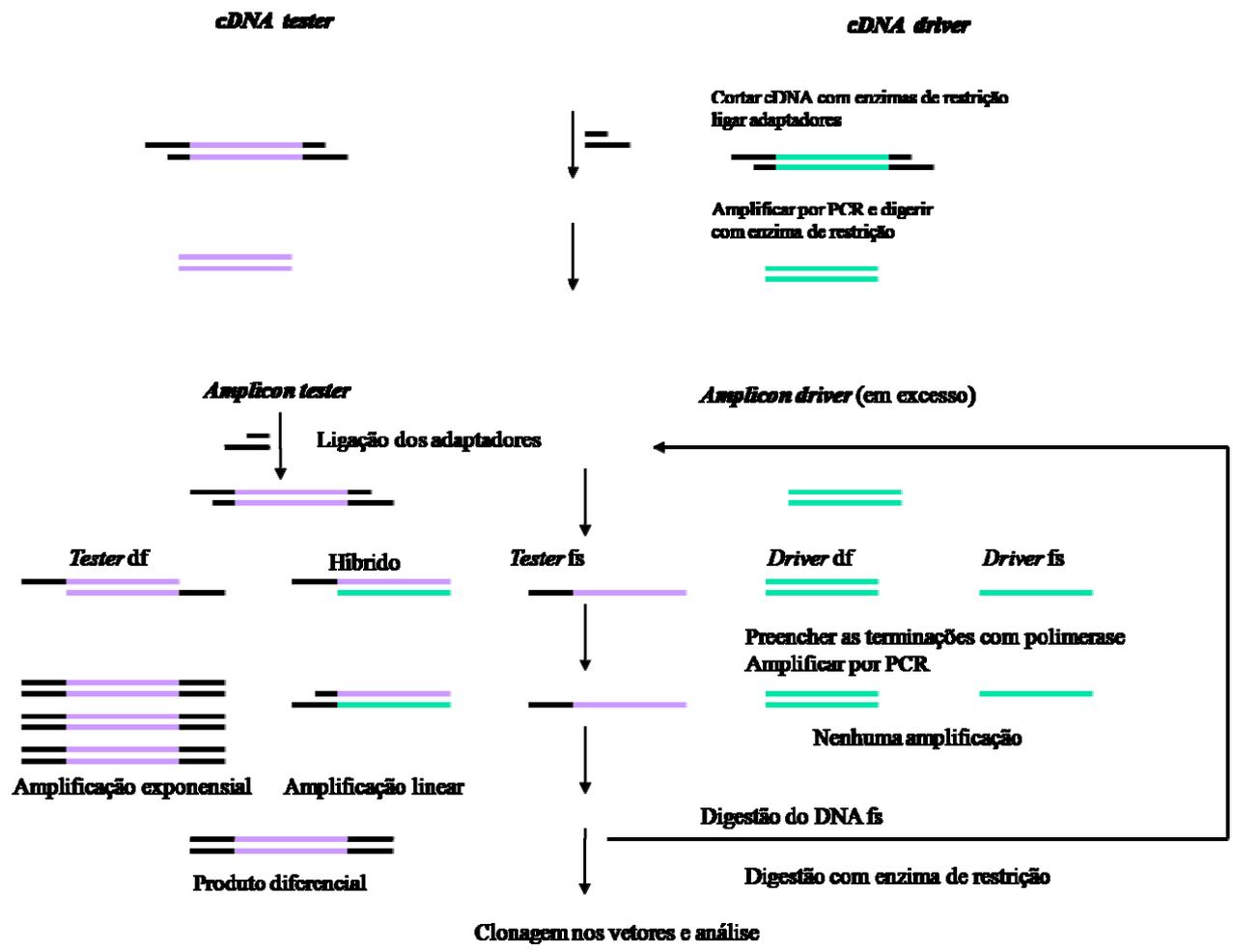


Figura 12: Esquema da metodologia de RDA. Os cDNAs são digeridos com a enzima de restrição *Sau3AI* para gerar fragmentos menores para serem mais eficientemente amplificáveis por PCR e com sítios de restrição para ligar os adaptadores. Os produtos da digestão são purificados em sistema comercial GFX (GE), ligados aos adaptadores (16 h a 16°C) e amplificados por PCR (25 ciclos de 45 s a 95°C e 4 min a 72°C, cada). Os produtos finais da reação de PCR são purificados com o sistema comercial GFX. Ambos, *tester* e *driver* são digeridos com *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e purificados antes da ligação de um novo par de adaptadores somente no *tester*. Para a geração do primeiro produto diferencial, *driver* e *tester* são hibridizados, numa relação de 10:1, por 16 a 42h a 67°C e amplificados por PCR (7 ciclos de 45 s a 95°C e 4 min a 72°C, cada). Os produtos são submetidos a uma nova etapa de amplificação (30 ciclos) para remoção dos cDNAs fita simples não desejados. Para geração de um segundo produto diferencial, novos adaptadores são ligados ao primeiro produto diferencial, que é hibridizado ao *driver* em uma relação de 100:1, assim também para o terceiro produto diferencial em uma relação 1000:1.

O RDA é uma ferramenta poderosa e sensível na identificação de genes diferencialmente expressos. Nela ocorre um processo de subtração acoplado à amplificação, originalmente desenvolvido para uso com DNA genômico como um método capaz de isolar as diferenças entre dois genomas complexos. Esta técnica elimina aqueles fragmentos presentes em ambas populações, deixando apenas as diferenças. O RDA genômico se baseia na geração, por digestão com enzima de restrição e amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase), de versões simplificadas dos genomas sob investigação conhecidos como “representações”. Se um fragmento de restrição amplificável (o alvo) existe numa representação (*tester*) e está ausente em outra (*driver* – controle), um enriquecimento cinético do alvo pode ser alcançado por hibridização subtrativa do *tester* na presença de um excesso de *driver*. Sequências homólogas no *driver* não são amplificadas, enquanto o alvo hibridiza apenas com ele mesmo e retém a habilidade de ser amplificável por PCR. Interações sucessivas da subtração e o processo de PCR produzem fragmentos de DNA visíveis num gel de agarose correspondendo ao alvo enriquecido (Hubank & Schatz, 1994). A técnica de RDA é flexível porque as populações de cDNA podem ser fracionadas por um número de enzimas de restrição com sequências curtas de reconhecimento para produzir conjuntos de cDNAs de tamanho pequeno. Este aspecto da RDA melhora grandemente as chances de se clonar com sucesso espécies diferencialmente expressas. Além disso, pelo fato de que cada cDNA ser restringido no seu comprimento, o procedimento de RDA oferece múltiplas chances de se recuperar um gene de interesse (Pastorian *et al.*, 2000).

A imunidade em insetos tem sido investigada por 35 anos focada na resposta imune contra bactéria e fungo. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta antiviral, a não ser pelo fato de muitas doenças virais em insetos estarem catalogadas. Em

lepidópteros, fagocitose e encapsulação mediada por hemócitos e a apoptose são parte da resposta contra infecção viral. Porém, muitos estudos sugerem a presença de fatores não conhecidos envolvidos na defesa antiviral. Um desses fatores pode ser a superexpressão da proteína hemolina, após a infecção por baculovírus, sugerindo uma interação primária hemolina-vírus (Terenius, 2008). Essa proteína pertence à família de imunoglobulinas contendo quatro domínios de imunoglobulinas (Su *et al.*, 1998) e é uma das mais importantes moléculas da defesa humoral e celular em lepidópteros (Yu & Kanost, 2002; Kanost *et al.*, 2004).

A infecção de células de inseto por baculovírus em pode induzir alterações nas propriedades da célula hospedeira incluindo alteração do citoesqueleto, parada no ciclo celular e interrupção da transcrição de proteínas hospedeiras. A infecção por baculovírus altera os níveis das proteínas (Carstens *et al.*, 1979) e dos RNAm celulares (Ooi & Miller, 1988; Van Oers *et al.*, 1999; Van Oers *et al.*, 2001; Nobiron *et al.*, 2003), causando desligamento da síntese das proteínas em células infectadas por AcMNPV em torno de 18 h p.i. Ooi & Miller (1988) demonstraram que a produção de RNAm dos genes celulares, *actina*, *hsp70* e *histona*, foi reduzida a partir de 12 h p.i. em células de *S. frugiperda* IPLB-SF21-AE (Sf21) infectadas pelo AcMNPV. Nobiron *et al.* (2003), utilizando a técnica de “restriction fragment differential display” (RFDD) confirmaram, de uma maneira global, a diminuição de vários RNAm celulares durante a infecção de células de inseto pelo vírus AcMNPV. Além disso, mostraram que, o nível de RNAm de pelo menos um gene celular, aumenta na fase inicial da infecção e posteriormente diminui em estágios mais avançados da infecção. Esse transcrito corresponde à proteína Hsc70 (cognato da proteína de choque térmico de 70 kDa) que é uma chaperona celular, que foi implicada em vários eventos da infecção de diferentes vírus tal como empacotamento viral, prevenindo uma montagem prematura do capsídeo

no citoplasma e no transporte nuclear de proteínas e de ácidos nucléicos virais (Sainis *et al.*, 2000). Exemplos desses vírus são os adenovírus tipo 5 (Macejak & Luftig, 1991), vírus vaccinia (Jindal & Young, 1992), poliovírus (Macejak & Sarnow, 1992) e poliomavírus (Cripe *et al.*, 1995). Popham *et al.* (2010) também identificaram por análise proteômica a presença das proteínas Hsp70 e Hsc70 sendo induzidos 24 h p.i. em células de inseto permissivas (Hv-AM1) ao AcMNPV.

Pouco se sabe a respeito das sequências genômicas de insetos da ordem Lepidoptera. Deng *et al.* (2006) identificaram “expression sequence tags” (EST) de *S. frugiperda* pela construção da biblioteca de cDNA de células Sf21. Essas seqüências podem ser úteis para comparação de genomas dentro e fora da ordem Lepidoptera, estabelecendo microarranjos e sondas para cada gene, possibilitando estudos de expressão gênica em *Spodoptera* e em outros lepidópteros e durante a infecção por seus patógenos. Sistemas de microarranjos podem ajudar na compreensão da expressão de genes em tempos específicos no curso da infecção. Seu início pode estar relacionado com sequências de promotores conservados e o início da expressão pode predizer o padrão de expressão gênica viral (Jiang *et al.*, 2006). Van Munster *et al.* (2006) mostraram que microarranjos confirmaram a cascata temporal de expressão dos genes virais e os níveis que são necessários para a infecção por *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV).

Iwanaga *et al.* (2004) construíram um microarranjo de DNA para estudar o perfil da expressão de células BmN e Sf9 infectados com AcMNPV ou BmNPV para identificação de características em células permissivas e não permissivas. Todos os genes de AcMNPV são expressos em ambas as células, mas para os genes *p10* e *polh* ocorre uma diminuição na expressão em BmN; já para BmNPV em células Sf9 também ocorre a diminuição na expressão de vários genes virais.

A expressão gênica do baculovírus AcMNPV em células de mamíferos também tem sido estudada usando microarranjo de DNA, sugerindo a transcrição de vários genes virais e o aumento do transcrito celular β -actina (Fujita *et al.*, 2006). Esta é essencial para o transporte do vírus para o núcleo em células de inseto e mamífero (Van Loo *et al.*, 2001). Isso indica que os baculovírus afetam a fisiologia das células de mamíferos, apesar de não se replicarem nessas células.

2. OBJETIVO

Analisar o padrão da expressão de genes da célula hospedeira em resposta à infecção viral visando identificar genes potencialmente relacionados com a susceptibilidade ou resistência à infecção aos vírus AgMNPV e AcMNPV, respectivamente. Com isso, pretendemos testar a hipótese de que a infecção de hemócitos de insetos permissivos e semi-permissivos dispara um mecanismo de expressão gênica celular diferente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus

Foram utilizados os baculovírus selvagens *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV isolado L-1) (Lee & Miller, 1978) e *Anticarsia*

gammatales multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV, isolado 2D) (Johnson & Maruniak, 1989).

3.2. Insetos

Foram utilizadas trinta larvas de terceiro e quarto ínstar de *A. gammatales* para inoculação dos vírus AcMNPV (semipermissivo) e AgMNPV (permissivo) diretamente na hemocele (10^6 pfu) utilizando microseringas de insulina e larvas infectadas com meio de cultura, como controle. A hemolinfa foi coletada (12 h p.i.), aproximadamente 500 μ L, para obter os hemócitos infectados e não infectados, e colocadas em tampão anticoagulante, pH 4,5 (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M EDTA, 0,041 M ácido cítrico). Para a PCR em tempo real (qPCR) a hemolinfa foi coletada 6, 12 e 24 h p.i..

3.3. Extração do RNA total e síntese dos cDNAs

O RNA total foi purificado com Trizol® (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante, utilizando os hemócitos (aproximadamente 500 μ L de hemolinfa) das larvas infectadas e não infectadas. As amostras de RNA total foram mantidas a -80°C . A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a transcriptase reversa (200 U/ μ L, 2 μ L utilizados) (RT Superscript II, Invitrogen), utilizando aproximadamente 1 μ g de RNA total, e os oligonucleotídeos cDNA (10 μ M, Tabela 7) e CDS (10 μ M, Tabela 7) (72°C por 2 minutos e 42°C por 1 hora e 30 minutos, seguida da adição de tampão 10mM Tris/1mM EDTA, 72°C por 7 minutos). A primeira fita de cDNA foi utilizada como molde para síntese da segunda fita (95°C por 1 minuto, 21 ciclos de 95°C por

15 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 5 minutos e extensão final de 68°C por 7 minutos), com a utilização do oligonucleotídeo PCR (Tabela 7). O cDNA foi preparado utilizando o sistema comercial para síntese de cDNA SMART PCR da Clontech Laboratories, EUA.

3.4. Hibridização subtrativa e obtenção de bibliotecas subtraídas

A técnica de Análise Diferencial Representacional (RDA) foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por Hubank & Schatz (1994) e modificado por Pastorian *et al.* (2000). O cDNA dupla-fita foi digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* (GE). Os produtos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose, purificados utilizando-se o sistema comercial GFX (GE) e ligados a adaptadores (um de 24 bases e um de 12 bases). Para a geração dos produtos diferenciais, os cDNAs *driver* e *tester* foram hibridizados a 67°C e amplificados por PCR com o adaptador de 24 bases. Para se obter uma amplificação seletiva subtrativa, a hibridização foi realizada de acordo com Pastorian *et al.* (2000). Os cDNAs construídos a partir de RNAs de *A. gemmatalis* infectadas com os vírus AcMNPV e AgMNPV e não infectadas foram utilizadas como testes (*tester*) e como controle (*driver*) e vice-versa. Os oligonucleotídeos utilizados foram adquiridos da empresa Invitrogen e IDT. Foram realizadas três etapas sucessivas de subtração e amplificação por PCR, usando as relações de hibridização *tester-driver* de 1:10 para gerar o primeiro produto diferencial, 1:100 para gerar o segundo produto diferencial e 1:1000 para gerar o terceiro produto diferencial. Os adaptadores foram trocados entre cada etapa de hibridização e os produtos diferenciais foram purificados com o sistema comercial GFX (GE) (Dutra *et al.*, 2004). Os produtos diferenciais de

cDNAs amplificados foram purificados e clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega) e sequenciados utilizando-se seqüenciador automático MegaBace 1000 (GE Healthcare).

3.5. Sequenciamento dos cDNAs e geração de ESTs

Uma alíquota dos produtos finais do RDA, do terceiro produto diferencial foi ligada ao vetor pGEM®-T Easy (Promega). Células competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos da ligação pelo método de eletroporação conforme descrito por Sambrook & Rousset (2001).

Os DNAs plasmidiais foram preparados a partir dos clones selecionados das bibliotecas subtraídas e sequenciados com o kit Dyenamic ET Dye Terminator no seqüenciador MegaBace (GE), usando oligonucleotídeo T7 correspondente ao vetor pGEM-T Easy (Tabela 7). O programa Phred foi utilizado para avaliar as seqüências de nucleotídeos dos clones de cDNA (Ewing *et al.*, 1998) e as seqüências de vetores foram removidas usando o programa Crossmatch (www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/Swat.cfm). Seqüências com pelo menos 100 nucleotídeos e qualidade do Phred maior ou igual a 20 foram analisadas. As seqüências resultantes foram comparadas no banco de dados GenBank usando o programa BLASTX, restringindo-se ou não a busca por Lepidopteros (Altschul *et al.*, 1997).

A seqüência completa do gene e da proteína do cognato de choque térmico de 70 kDa (Hsc70) de *A. gemmatalis* foi obtida.

3.6. Processamento das ESTs, anotação e análise de expressão diferencial

O processamento das ESTs, a montagem dos bancos de dados bem como as análises de expressão diferencial foram realizadas como descrito por Bastos *et al.* (2007) e Costa *et al.* (2007).

3.7. PCR em tempo real (qPCR)

O RNA foi extraído da hemolinfa de *A. gemmatalis* não infectada e infectada com os vírus AcMNPV e AgMNPV 6, 12 e 24 h p.i. O RNA total foi tratado com DNase e utilizado para transcrição reversa (RT Enzyme Mix, Applied Biosystem). A qPCR foi realizado em triplicata para cada amostra nos diferentes tempos pós-infecção no sistema de PCR em tempo real (Applied Biosystems). O programa de PCR foi de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) foi adicionado a 10 µM de cada oligonucleotídeo para os genes hsc70 e β actina (Tabela 7) e ao cDNA como molde. Um controle negativo foi utilizado, com todos os reagentes, exceto o cDNA. As reações foram realizadas em triplicatas. As curvas padrões foram geradas utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente diluídas (1:5 da diluição original). Os dados foram normalizados com o transcrito codificante para a proteína β-actina amplificados em cada conjunto de experimentos de qPCR. O nível de expressão relativa do gene de interesse hsc foi calculado utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa (Bookout *et al.*, 2006).

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados nas etapas do RDA, sequenciamento, clonagem e PCR em tempo real.

Oligonucleotídeo	Sequência	Utilização
cDNA	5' AGCAGTGGTATCAACGACAGAGTACGCGGG 3'	Síntese da primeira fita do cDNA
CDS	5' AAGCAGTGGTATCAACGACAGAGTACT(30)N ₁ N 3'	Síntese da primeira fita do cDNA
PCRII	5' AAGCAGTGGTATCAACGACAGAGT 3'	Síntese da segunda fita do cDNA
JBam12	5' GATCCGTTTCATG 3'	Adaptador 1 (RDA)
JBam24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'	Adaptador 1 (RDA)
NBam12	5' GATCCTCCCTCG 3'	Adaptador 2 (RDA)
NBam24	5' AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG 3'	Adaptador 2 (RDA)
RBam12	5' GATCCTCGGTGA 3'	Adaptador 3 (RDA)
RBam24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG 3'	Adaptador 3 (RDA)
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	Sequenciamento dos cDNAs
qHscF	5' TRCGKCCGATRAGACGTTTG 3'	PCR em tempo real
qHscR	5' ATCATCGCMAAYGACCAG 3'	PCR em tempo real
bactinaF	5' CGCACACGGTGCCCATCTA 3'	PCR em tempo real
bactinaR	5' CTCGGTGAGGATCTTCATCA 3'	PCR em tempo real

4. RESULTADOS

4.1. Síntese das fitas de cDNAs e ensaio de RDA

Para a obtenção da primeira fita de cDNA foi realizado a extração de RNA total a partir dos hemócitos de *A. gemmatalis* não infectados (mock) como sendo *driver* e hemócitos infectados (12 h p.i.) com os vírus AcMNPV e AgMNPV como *tester*. A primeira fita sintetizada a partir dos RNAs foi utilizada como molde para a obtenção da segunda fita. A Figura 13 mostra o perfil eletroforético da segunda fita de cDNA do *driver* e sua clivagem com a enzima *Sau3AI*, além do primeiro produto diferencial do *tester*. As segundas fitas, *driver* e *tester*, obtidas foram purificadas e quantificadas por espectrofotometria a 260nm. Uma hibridização eficiente e a subsequente amplificação por PCR não podem ser realizados usando a fita completa de cDNA. Com a finalidade de obter-se fragmentos menores e com sítios de restrição que se ligassem aos adaptadores, os cDNAs *driver* e *tester*, foram submetidos à clivagem utilizando-se a enzima de restrição *Sau3AI* (10 U/ μ L). Os cDNAs clivados foram purificados analisados em gel de agarose 1,5% e quantificados por espectrofotometria.

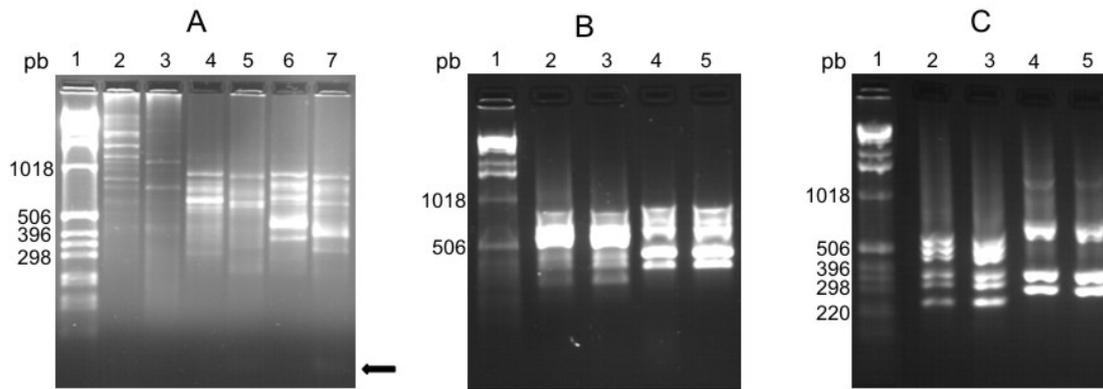


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5% da segunda fita de cDNAs *driver* e produtos diferenciais corados com brometo de etídeo. Em 1 (A, B e C), marcador 1 kb DNA ladder (Invitrogen), em 2 (A): cDNA do *driver* (mock) 2ª fita; em 3 (A), digestão com *Sau3AI* da 2ª fita do cDNA do *driver* (mock); em 4 (A), primeiro produto diferencial do *tester* AcMNPV; em 5 (A), primeiro produto diferencial do *tester* AcMNPV digerido com *Sau3AI*; em 6 (A), primeiro produto diferencial do *tester* AgMNPV; em 7 (A), primeiro produto diferencial do *tester* AgMNPV digerido com *Sau3AI*. Observar a seta indicando que nos poços 5 e 6 (A) existe um pequeno fragmento de DNA, correspondente aos adaptadores utilizados no primeiro. A foto (A) representa a primeira etapa da subtração, utilizando-se a proporção *tester/driver* 1/10. As fotos (B) e (C) representam a segunda e terceira etapas da subtração, utilizando-se, respectivamente, a proporção *tester/driver* 1/100 (B) e 1/1000 (C). Nos poços 2 (B) e 2 (C): segundo e terceiro produtos diferenciais do *tester* AcMNPV após 7 ciclos de PCR.; em 3 (B) e 3 (C), segundo e terceiro produtos diferenciais do *tester* AcMNPV após 30 ciclos de PCR, respectivamente; em 4 (B) e 4 (C), segundo e terceiro produtos diferenciais do *tester* AgMNPV após 7 ciclos de PCR, respectivamente; em 5 (B) e 5 (C), segundo e terceiro produtos diferenciais do *tester* AgMNPV após 30 ciclos de PCR, respectivamente.

A partir dos fragmentos de cDNA amplificados diferencialmente, realizou-se a primeira subtração dos cDNA. Um segundo par de adaptadores foi ligado somente no *tester*. A subtração foi realizada através de uma precipitação (hibridização) *Tester/Driver* (subtração) em uma proporção 1/100. Durante a hibridização, os cDNAs comuns às duas populações são efetivamente removidos, pois estes se anelam para formar híbridos de cDNAs *tester/driver* que não são exponencialmente amplificados nas etapas de PCR (Pastorian *et al*, 2000). A cada etapa da hibridização subtrativa, a quantidade de DNA do *driver* permanece constante. A quantidade do *tester* (o produto do passo prévio de hibridização) vai diminuindo etapa por etapa gerando apenas as espécies diferencialmente expressas.

Uma etapa subsequente de RDA foi conduzida de maneira quase idêntica à anterior. O produto diferencial da segunda etapa foi clivado usando enzima de restrição, quantificado, ligado a um terceiro par de adaptadores e, em seguida, submetido a uma nova hibridização *tester/driver*, agora na proporção 1/1000, com o *driver* original. O decréscimo na quantidade de cDNA do *tester* relativo ao cDNA do *driver* seleciona os fragmentos de cDNA que foram originados dos RNAs diferencialmente expressos. Durante as etapas do RDA, um conjunto de adaptadores é usado somente uma vez, o que protege contra a amplificação de produtos formados nas etapas anteriores que ainda poderiam possuir sequências dos adaptadores derivados de uma etapa anterior do processo (Pastorian *et al.*, 2000).

Também foram realizadas as três etapas da subtração utilizando os hemócitos não infectados (mock) como sendo *tester* e os infectados com os baculovírus AcMNPV e AgMNPV como *driver*, conforme ilustrado na Figura 14.

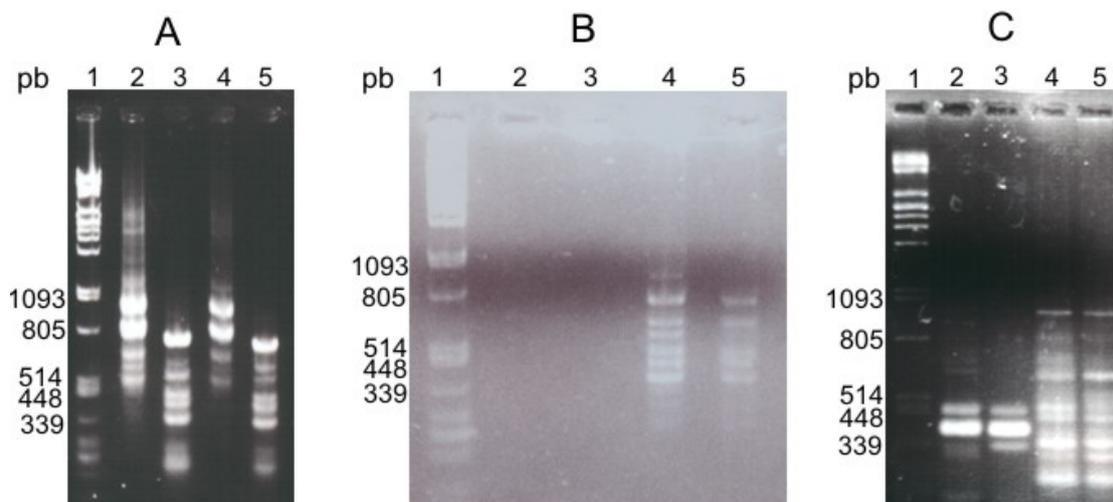


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos diferenciais corados com brometo de etídeo. Em 1 (A, B e C), marcador λ DNA digerido com *Pst*I; no poço 2 (A), primeiro produto diferencial do *driver* AcMNPV; em 3(A), primeiro produto diferencial do *driver* AcMNPV digerido com *Sau*3AI; em 4 (A), primeiro produto diferencial do *driver* AgMNPV; em 5 (A), primeiro produto diferencial do *driver* AgMNPV digerido com *Sau*3AI. A foto (A) representa a primeira etapa da subtração, utilizando-se a proporção *tester/driver* 1/10. As fotos (B) e (C) representam a segunda e terceira etapas da subtração utilizando a proporção de 1/100 e 1/1000, respectivamente. Nos poços 2 em (B) e (C), segundo e terceiro produtos diferenciais do *driver* AcMNPV após 7 ciclos de PCR, respectivamente; em 3 (B), segundo produto diferencial do *driver* AgMNPV após 7 ciclos de PCR, em 3 (C), terceiro produto diferencial do *driver* AcMNPV após 30 ciclos de PCR, em 4 (B) segundo produto diferencial do *driver* AcMNPV após 30 ciclos de PCR, em 4 (C) terceiro produto diferencial do *driver* AgMNPV após 7 ciclos de PCR, em 5 (B e C), segundo e terceiro produtos diferenciais do *driver* AgMNPV após 30 ciclos de PCR, respectivamente.

4.2. Análise das seqüências dos clones obtidos

Após o sequenciamento de 947 clones utilizando os vírus AcMNPV e AgMNPV como *tester* (genes induzidos) e *driver* (genes reprimidos) (320 clones e 213 para AcMNPV, como *driver* e *tester*, respectivamente, e 228 e 186 para AgMNPV

como *driver* e *tester*, respectivamente) e das células não infectadas como *tester* (genes induzidos) e *driver* (genes reprimidos), estes foram comparados no banco de dados GenBank usando o programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) e os resultados são mostrados na tabelas. Não houve diferença para as condições do AcMNPV como *tester* e AgMNPV como *tester* e *driver* quando foi restrita a busca para sequências de Lepidopteros, utilizando o programa BLASTX. Em relação ao AcMNPV como *driver*, houve uma diferença nos transcritos identificados, todos foram de cisteíno-protease ou o seu precursor, diferentemente quando a busca não foi restringida para Lepidopteros, identificado-se catepsina viral de GV ou de NPV (Tabela 8).

O transcrito de uma catepsina L foi identificado como sendo reprimido durante a infecção por AcMNPV (Tabela 8) e os genes induzidos foram o de uma mucina, uma proteína ribossomal, um cognato da proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsc70), uma aminopeptidase, uma serino-protease, uma proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70), uma quimiotripsina, uma β 1,3 glicanase (Tabela 9). Em relação à infecção pelo AgMNPV, os transcritos que foram reprimidos foram um precursor de serino-protease, uma Hsc70, uma serino-protease, uma Hsp70, uma carboxipeptidase, uma proteína ribossomal, nitrito redutase, além de uma lipase (Tabela 10). Já os genes induzidos foram um transcrito da proteína induzida pelo hormônio juvenil, subunidade β ATP sintase transportadora de H⁺ e proteína ribossomal e β -actina (Tabela 11). A tabela 13 mostra a categoria dos transcritos obtidos. A tabela 12 informa a frequência dos transcritos gênicos obtidos por RDA.

O gene hsc70 de *A. gemmatalis* foi depositado no Genbank e recebeu o número de acesso HQ223341, (Figura 15).

Tabela 8: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtrativa obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatilis* infectadas e não infectadas, mostrando genes reprimidos quando utilizado o AcMNPV como *driver*

Contig	Frequência	E-value	Gene	Tamanho da sequência (pb)	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Acesso
Contig 1	136	2e-15	Catepsina	674	<i>Helicoverpa armigera</i>	43/118 (36)	NP 075125.1
			<i>Helicoverpa armigera</i>		nucleopoliedrovírus		
			G4		G4		
Contig 2	32	6e-17	ORF 11 Catepsina	601	<i>Cydia pomonella</i>	42/115 (36)	NP 148795.1
			<i>Cydia pomonella</i>		granulovírus		
			granulovírus				
Contig 3	42	3e-17	ORF 11 Catepsina	436	<i>Cydia pomonella</i>	42/115 (36)	NP 148795.1
			<i>Cydia pomonella</i>		granulovírus		
			granulovírus				

Contig 4	96	9e-16	Catepsina	426	<i>Helicoverpa</i>	43/118 (36)	NP 075125.1
			<i>Helicoverpa</i>		<i>armigera</i>		
			<i>armigera</i>		nucleopoliedrovirus		
			nucleopoliedrovirus		G4		
			G4				
Contig 5	8	8e-16	Catepsina	478	<i>Helicoverpa</i>	43/118 (36)	NP 075125.1
			<i>Helicoverpa</i>		<i>armigera</i>		
			<i>armigera</i>		nucleopoliedrovirus		
			nucleopoliedrovirus		G4		
			G4				
Contig 6	2	1e-13	Catepsina L <i>Bombyx</i>	189	<i>Bombyx mori</i>	35/55 (63)	NP 001128673.1
			<i>mori</i>				
Total	316						

Tabela 9: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatilis* infectadas e não infectadas, mostrando genes induzidos quando utilizado o AcMNPV como *tester*.

Contig	Frequência	E-value	Gene	Tamanho da sequência (pb)	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Acesso
Contig 1	24	3e-25	Mucina IIM14 intestinal de inseto	425	<i>Trichoplusia ni</i>	51/102 (50)	AAC47556.1
Contig 2	12	1e-45	Proteína Ribossomal L5	525	<i>Manduca sexta</i>	89/94 (94)	ACY95338.1
Contig 3	24	6e-57	Hsc70	678	<i>Helicoverpa zea</i>	113/114 (100)	ACV32641.1
Contig 4	25	3e-45	Aminopectidase N3	1253	<i>Bombyx mori</i>	104/206 (50)	NP_001104835.1
Contig 5	13	2e-57	Precursor de serino- protease	602	<i>Bombyx mori</i>	128/189 (67)	NP_001036826.1
Contig 6	27	2e-32	Serino-protease tripsina	430	<i>Ostrinia nubilalis</i>	69/132 (52)	AAX62034.1
Contig 7	16	2e-87	Hsp70	678	<i>Trichoplusia ni</i>	109/110 (100)	ABH09732.1
Contig 8	16	2e-26	Hsc70	697	<i>Nilaparvata lugens</i>	62/63 (98)	ADE34170.1

Contig 9	16	9e-25	Mucina IIM14	525	<i>Helicoverpa</i>	47/81 (58)	ABW98670.1
			intestinal de inseto		<i>armigera</i>		
Contig 10	05	3e-18	Serino-protease SP1	443	<i>Heliothis</i>	61/142 (43)	ABR88240.1
					<i>virescens</i>		
Contig 11	05	2e-10	Protease	524	<i>Heliothis</i>	25/34 (73)	ABR88239.1
			quimiotripsina C9		<i>virescens</i>		
Contig 12	02	1e-26	β -1,3-glicanase	460	<i>Diatraea</i>	61/97 (62)	ABR28479.1
					<i>saccharalis</i>		
Total	185						

Tabela 10: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatilis* infectadas e não infectadas, mostrando genes reprimidos quando utilizado o AgMNPV como *driver*.

Contig	Frequência	E-value	Gene	Tamanho da sequência (pb)	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Acesso
Contig 1	44	6e-21	Precursor de serino- protease	823	<i>Bombyx mori</i>	71/125 (56)	NP_001036826.1
Contig 2	10	3e-94	Hsc70	656	<i>Helicoverpa zea</i>	189/192 (98)	ACV32641.1
Contig 3	20	4e-28	Serino-protease	892	<i>Bombyx mandarina</i>	64/86 (74)	ACD44927.1
Contig 4	14	2e-18	lipase	591	<i>Helicoverpa armigera</i>	41/64 (64)	ACB54944.1
Contig 5	04	3e-17	Similar a serino carboxipeptidase corpo gorduroso/ saliva	705	<i>Tribolium castaneum</i>	29/69 (42)	XP_969249.1
Contig 6	02	3e-16	Proteína ribossomal L5	194	<i>Manduca sexta</i>	52/61 (85)	ACY95338.1

Contig 7	18	3e-20	Precursor de serino- protease	651	<i>Bombyx mori</i>	70/124 (56)	NP_001036826.1
Contig 8	03	7e-10	Serino carboxipeptidase	496	<i>Triatoma infestans</i>	34/70 (48)	AAZ43093.1
Contig 9	05	3e-08	Catalase	774	<i>Campylobacter jejuni</i>	17/17 (100)	Q59296.1
Contig 10	04	2e-20	Precursor de serino- protease	452	<i>Bombyx mori</i>	67/104 (64)	NP_001036826.1
Contig 11	09	4e-28	Precursor de serino- protease	870	<i>Bombyx mori</i>	71/126 (56)	NP_001036826.1
Contig 12	03	4e-28	Hsc70	479	<i>Nilaparvata lugens</i>	75/76 (98)	ADE34170.1
Contig 13	04	1e-05	Nitrito redutase	640	uncultured bacterium	28/48 (58)	BAH95949.1
Contig 14	06	2e-32	Hsp70	612	<i>Chilo suppressalis</i>	69/72 (95)	ADE05296.1

Contig 15	02	1e-20	Precursor de serino- protease	523	<i>Bombyx mori</i>	68/108 (62)	NP_001036826.1
Contig 16	02	2e-27	Hsc70	524	<i>Nilaparvata lugens</i>	75/76 (98)	ADE34170.1
Contig 17	02	1e-29	Hsc70	505	<i>Sesamia nonagrioides</i>	79/90 (87)	AAV26452.2
Total	152						

Tabela 11: Análise dos contigs por Blastx derivados de ESTs resultantes do sequenciamento da biblioteca subtraída obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatilis* infectadas e não infectadas, mostrando genes induzidos quando utilizado o AgMNPV como *tester*.

Contig	Frequência	E-value	Gene	Tamanho da sequência (pb)	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Acesso
Contig 1	42	1e-18	Proteína induzida pelo hormônio juvenil	1027	<i>Galleria mellonella</i>	49/63 (77)	AAK07569.1
Contig 2	49	3e-19	Proteína induzida pelo hormônio juvenil	1251	<i>Galleria mellonella</i>	54/81 (66)	AAK07569.1
Contig 3	03	8e-59	subunidade β ATP sintase transportadora de H ⁺	402	<i>Nasonia vitripennis</i>	118/124 (95)	NP_00115336 6.1
Contig 4	50	1e-21	Proteína ribossomal S8	646	<i>Manduca sexta</i>	50/74 (92)	ACY95327.1
Contig 5	08	7e-62	Proteína ribossomal P0	937	<i>Manduca sexta</i>	76/79 (96)	ACY95307.1
Contig 6	02	3e-59	Proteína ribossomal L5	399	<i>Manduca sexta</i>	123/130 (94)	ACY95338.1
Contig 7	02	4e-32	β -actina	242	<i>Eriocheir sinensis</i>	68/69 (98)	ADH43622.1
Total	156						

Tabela 12: Transcritos gênicos e frequência obtidos pelo sequenciamento através da técnica RDA.

Produto gênico	Frequência			
	AcMNPV	AcMNPV	AgMNPV	AgMNPV
	induzido	reprimido	induzido	reprimido
Catepsina L	-	316	-	-
Serino-protease	75	-	-	104
Mucina	40	-	-	-
Hsc70	40	-	-	17
Hsp70	16	-	-	06
Proteína ribossomal	12	-	60	02
β 1,3 glicanase	02	-	-	-
β -Actina	-	-	02	-
Lipase	-	-	-	14
Proteína induzida pelo hormônio juvenil	-	-	91	-
subunidade β ATP sintase transportadora de H ⁺	-	-	3	-
Nitrito redutase	-	-	-	4
Catalase	-	-	-	5

-: ausência do produto gênico

Tabela 13: Produtos gênicos e categorias dos transcritos obtidos do sequenciamento da biblioteca subtrativa obtida de cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatilis* infectadas e não infectados.

Categoria	Produto
Proteases	Serino-protease, cisteíno-protease, aminopeptidase
Síntese protéica	Proteínas ribossomais
Resposta a estresse	Hsp70 e Hsc70
Metabolismo	Lipase
Desenvolvimento	Proteína induzida pelo hormônio juvenil

11 atggcagcaaaagcaccgcgctgtaggtattgatttgggtaccacttactcatgcgctgggagttttccagcatggtaaggtggagatcatc
M A A K A P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I
101 gccaacgaccagggcaacaggaccacgcctcatatgtcgccttcacagacaccgagcgcctcatcggatgatgccgccaagaaccaggtg
A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V
191 gcgatgaacccaacaacactatccccgatgccaacgctcttatcggccgtaaattcgaagatgctaccgtccaagctgacatgaagcac
A M N P N N T I F D A K R L I G R K F E D A T V Q A D M K H
281 tggcctttcgaggttgctcagtgatggtggtaaaccaaagattaaggtcgcctacaagggagaagacaaaaccttctccctgaggaagtc
W P F E V V S D G G K P K I K V A Y K G E D K T F F P E E V
371 agctctatggtgctcacaaagatgaaggaaacagccgaggcctacctcggcaaacgggtgcagaacgcagtaatcacggttccagcgtac
S S M V L T K M K E T A E A Y L G K T V Q N A V I T V P A Y
461 ttcaacgactctcagggacaagccacaaaagatgcggggtaccatctctggcttgaatgttctccgtattatcaacgaaccgactgctgct
F N D S Q G Q A T K D A G T I S G L N V L R I I N E P T A A
551 gcgattgcgtacggccttgacaagaagggtagtggagaacgtaacgtcctgattttcgatctcggcggcggtaccttcgacgtgtccatc
A I A Y G L D K K G S G E R N V L I F D L G G G T F D V S I
641 ctgaccatcgaggatggtatcttcgaagtaaagtcaccgcggtgacactcacttgggaggagaggacttcgacaaccgcatggtcaac
L T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R M V N
731 cactttgtccaggaattcaagaggaagtacaagaaggacctcgctaccaacaagagggccctcaggcgactccgcaccgctgagagagg
H F V Q E F K R K Y K K D L A T N K R A L R R L R T A C E R
821 gcgaagagaactctctcatcgtccaccaggctagcatcgaaatcgactctctgtttgagggtatcgatttctacacatccatcaccagg

A K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S I T R
911 gcccgtttcgaggaactgaacgccgacctgttcagatccaccatggagcccgtggagaagtccctccgtgacgcgaagatggacaagtcc
A R F E E L N A D L F R S T M E P V E K S L R D A K M D K S
1001 caaatccacgacatcgtacttgtgggtgggtccactcgtatccccaaggtacagaagctcctccaagacttcttcaacggcaaggagctg
Q I H D I V L V G G S T R I P K V Q K L L Q D F F N G K E L
1091 aacaaatccatcaaccccgatgaggccgtagcttacggcgctgccgtccaggccgcatctcgcacggagacaagtccgaggaggtgcag
N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L H G D K S E E V Q
1181 gatctgcttctgctcgacgtgaccccgctgtctctcggtatcgagaccgctggcggtgtcatgaccaccctcatcaagcgcaacaccacc
D L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T T L I K R N T T
1271 atccctaccaagcagactcagaccttcaccacctactccgacaaccagcccgggtgactcatccaagtattcgaggggtgagcgtgccatg
I P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V F E G E R A M
1361 accaaggacaacaacctgctcggaaagtccgagctgaccggcattcctcccgcgccacgtggcggtgccccagatcgaggtcaccttcgac
T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D
1451 atcgacgccaacgggtatcttgaacgtgtccgccgtcgagaagtcgaccaacaaggagaacaagatcaccatcaccaacgacaagggccgt
I D A N G I L N V S A V E K S T N K E N K I T I T N D K G R
1541 ctgtccaaggaggagatcgagcgcattggtcaacgaggctgagaagtacaggaacgaggacgagaagcagaaggagaccatccaggctaag
L S K E E I E R M V N E A E K Y R N E D E K Q K E T I Q A K
1631 aacgcgctcgagtcttactgcttcaacatgaagtcgaccatggaggatgagaagctcaaggagaagatctcagacaccgacaagcagacc
N A L E S Y C F N M K S T M E D E K L K E K I S D T D K Q T

1721 atcctcgacaagtgcaacgacaccatcaagtggcttgactccaaccagctggctgacaaggaggaatacgaacacaagcagaaggagctt
 I L D K C N D T I K W L D S N Q L A D K E E Y E H K Q K E L
 1811 gaaggtatctgcaaccccatcatcacgaagatgtaccagggtgccggcgccatgccggcggtatgcctggagggcatgcctggcttcccc
 E G I C N P I I T K M Y Q G A G G M P G G M P G G M P G F P
 1901 ggcggtgctcccggagccggagggcgccggccccgggtggcggtgccggacctaccatcgaggaggtcgactaa 1972
 G G A P G A G G A A P G G G A G P T I E E V D *

Figura 15: Sequência de nucleotídeos do gene e de aminoácidos da proteína do cognato de choque térmico de 70 kDa de *A. gemmatalis*. Os códons de iniciação e terminação estão em vermelho. O asterisco indica o códon TAA, que corresponde ao códon de terminação do gene hsc.

4.3. PCR em tempo real (qPCR)

A qPCR foi analisada utilizando-se o programa da Applied Biosystem (Figura 16). A figura mostra a diferença da quantificação relativa dos cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatalis* infectados com os vírus AcMNPV e AgMNPV e não infectados nos diferentes tempos pós infecção. É possível perceber uma diferença em relação ao AcMNPV possuindo o gene hsc sendo induzido mais fortemente comparado ao Mock e ao AgMNPV. A maior diferença acontece a 6 h p.i., mostrando a indução deste gene nos estágios iniciais da infecção pelo AcMNPV. O gene também está sendo induzido a 12 e 24 h p.i. em comparação ao Mock e AgMNPV. Não houve uma diferença entre o Mock e o AgMNPV nas diferentes h p.i..

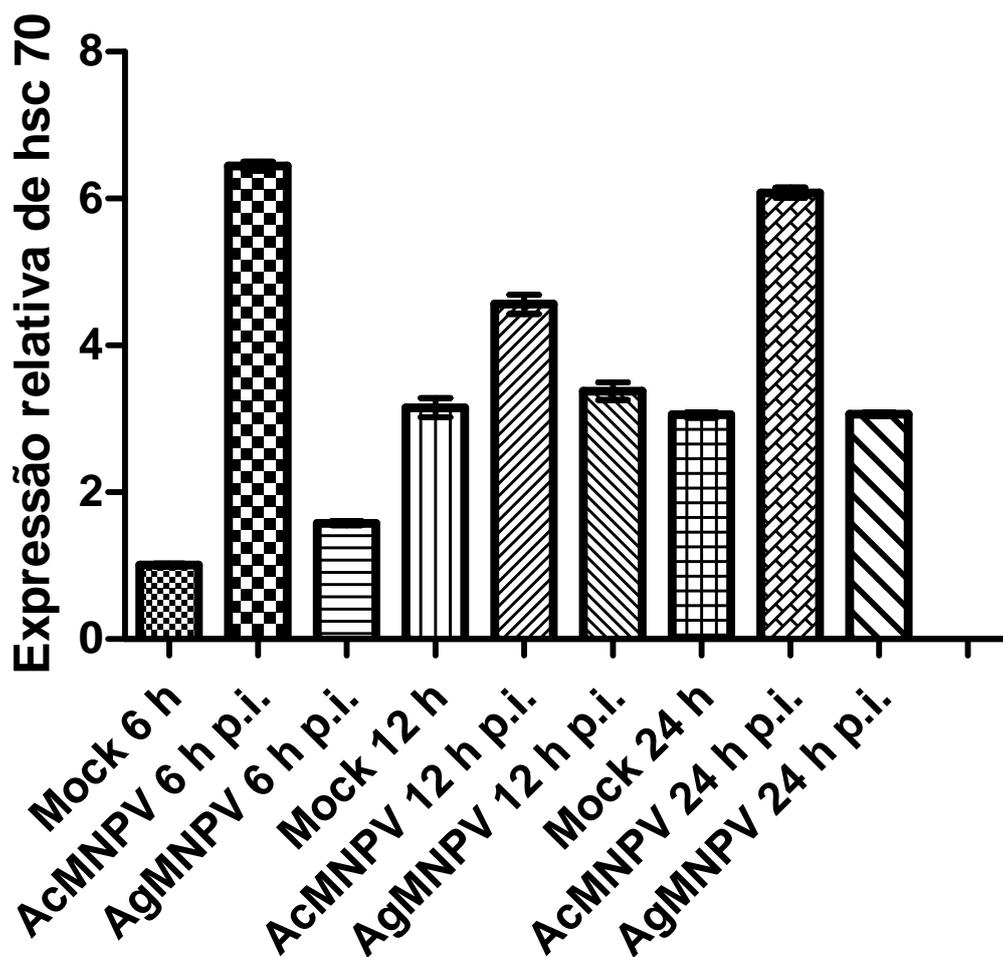


Figura 16: PCR em tempo real (qPCR) do gene *hsc70*. A figura mostra a quantificação relativa dos diferentes cDNAs de hemócitos das larvas de *A. gemmatalis* infectadas e não infectadas. O nível de expressão foi calculado de acordo com a curva padrão relativa. Os valores de expressão do gene *hsc70* foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene codificante para β -actina.

5. DISCUSSÃO

A resposta imune inata em relação à infecção viral em vertebrados tem sido objeto de investigação por décadas (Guidotti & Chisari, 2001). Em contraste, existe uma compreensão limitada do entendimento dos mecanismos pelos quais os insetos resistem às infecções virais, reconhecem as células infectadas e recrutam células do sistema imune para o foco da infecção (Popham *et al.*, 2004). Como os invertebrados não possuem imunidade adquirida, provavelmente outros fatores estão envolvidos na defesa contra patógenos virais (Nakazawa *et al.*, 2004). Barreiras epiteliais, como a membrana peritrófica e as células do intestino médio são determinantes na resistência de larvas de lepidópteros à infecção por baculovírus (Cory & Myers, 2003). Alguns lepidópteros resistem à infecção por baculovírus por apoptose seletiva ou descamação de células infectadas fora do intestino (Federici & Hice, 1997; Clem, 2001), porém muitos baculovírus codificam genes que interrompem a resposta apoptótica do hospedeiro (Clem, 2001). Uma vez que a infecção por baculovírus rompeu a barreira do intestino, existem poucos mecanismos conhecidos para eliminar a infecção na combinação vírus-hospedeiro (Cory & Myers, 2003).

Ooi & Miller (1988) demonstraram que ocorre uma parada na transcrição de vários genes celulares depois de uma infecção por AcMNPV em células Sf21. Eles mostraram, por Northern blot, que os níveis de mRNAs de actina, histona e proteína de choque térmico de 70 kDa foram substancialmente reduzidos de 12 a 18 h p.i..

Diversos estudos mostram a interação de proteínas chaperonas hospedeiras nos diferentes estágios do ciclo de vida dos vírus (Sullivan & Pipas, 2001). O cognato da proteína de choque térmico de 70 kDa, Hsc70, é expresso constitutivamente. Além do dobramento e não dobramento, estas tem funções na translocação de proteínas

(Zimmermann, 1998) em associação com vários fatores, como Hsp40 (Hohfeld, 1998). Embora não tenha sido encontrado em associação com baculovírus até o momento, tem sido envolvido na replicação e montagem de outros vírus de DNA. Sainis *et al.* (2000) sugeriram que Hsc70, juntamente com a proteína do capsídeo VP1, possui função no empacotamento viral. A proteína do capsídeo de poliomavírus também tem sido encontrada associada com Hsc70 durante a infecção (Cripe *et al.*, 1995). Autores sugerem funções na prevenção da montagem prematura do capsídeo no citossol ou transporte nuclear. Nobiron *et al.* (2003) mostraram que mRNAs hospedeiros são induzidos no início da infecção e podem ser importantes para facilitar a infecção por baculovírus. Além disso, os mRNAs de células Sf9 foram reprimidos no final da infecção. Através de RFDD observaram que somente um transcrito celular em estágios iniciais da infecção de células Sf9 pelo baculovírus AcMNPV foi induzido, o Hsc70, encontrado também em nosso trabalho e evidenciado por PCR em tempo real. Essa chaperona pode ter um papel importante no ciclo de vida do baculovírus e de outros vírus de DNA. Entretanto, não ocorreu uma indução desse gene quando hemócitos de *A. gemmatalis* foram infectados pelo AgMNPV. Essa aparente contradição pode estar relacionada com a diferente susceptibilidade de *A. gemmatalis* para os dois vírus. Além disso, Popham *et al.* (2010) identificaram por análise proteômica, em células de inseto Hv-AM1, quando infectadas com AcMNPV, as proteínas Hsp70 e Hsc70 sendo induzidas a 24 h p.i. Essas proteínas estabilizam e auxiliam no dobramento de proteínas, agindo na degradação de proteínas irreversivelmente danificadas (Popham *et al.*, 2010).

Uma lipase (Bmlipase-1) foi encontrada também por Ponnuvel *et al.* (2003) possuindo, possivelmente, uma atividade antiviral em larvas de *B. mori* contra BmNPV. Um transcrito de uma lipase também foi encontrado em nosso trabalho quando utilizamos o vírus AgMNPV, o que significa que a sua expressão foi diminuída pela

infecção viral. Gatehouse *et al.* (2009) analisaram por PCR em tempo real (qPCR), a expressão de 135 genes de larvas de *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) cinco dias após a infecção pelo *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (EppoNPV). Vinte e um genes tiveram sua expressão aumentada e 31 genes tiveram sua expressão diminuída. Entre esses genes, um gene codificando uma lipase teve sua expressão diminuída, o que dá suporte à hipótese de que essa proteína pode ter um papel na defesa do inseto contra patógenos e que a infecção pelos baculovírus diminui a expressão dessa proteína para facilitar a infecção viral, limitando a resposta antiviral do hospedeiro.

No que se refere às serino-proteases, vários trabalhos (Kanost *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2006) demonstram a cascata de pro-fenoxidase disparada em resposta à defesa antiviral. Cascata de serino-proteases existe em insetos para mediar reações rápidas e locais em respostas fisiológicas ou patológicas. Na hemolinfa de *M. sexta*, foi encontrado serino-proteases, como a scolexina, onde a síntese ocorre na epiderme e no intestino em resposta à infecção bacteriana ou viral. Assim, as serino-proteases e seus precursores encontrados neste trabalho podem estar envolvidos na resposta do hospedeiro à infecção viral. Além disso, uma serino-protease (tripsina) é necessária para a ativação da proteína P74, uma proteína viral presente no envelope da forma ODV dos baculovírus que é um fator viral de ativação *per os*, responsável pelo reconhecimento do envelope viral pela membrana das células do intestino médio a sua fusão (Slack & Lawrence, 2005; Slack *et al.*, 2008). Desta forma, a ativação de genes de tripsinas pode estar associada com um aumento na eficiência da infecção durante os estágios iniciais de infecção. Popham *et al.* (2004) mostraram, pela purificação de uma serino-protease de *B. mori*, BmSP2, uma forte atividade antiviral em relação aos corpos de oclusão (ODV) dos BmNPV derivado do suco digestivo de larvas de *B. mori*. Embora os

mecanismos de BmSP2 e Bmlipase-1 em relação aos ODV não parecem claras até o momento, é concebível que a inativação dos vírus ingeridos por enzimas digestivas no início da infecção antes da propagação para o intestino e dispersão da infecção para a hemolinfa é uma eficiente estratégia do hospedeiro contra BmNPV, protegendo as larvas da infecção viral, mostrando uma resposta do sistema imune dos insetos no início de uma infecção viral. O plasma de larvas de *H. virescens* mostrou atividade antiviral contra BVs de *H_zSNPV* *in vitro* (Shelby & Popham, 2006). Além da fenoloxidase, existem outras enzimas, que geram intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio, que estão presentes na hemolinfa e podem contribuir para a atividade antiviral e serem responsáveis pelos efeitos virucidas (Shelby & Popham, 2006). A presença de radicais livres na hemolinfa de insetos, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), é resposta à infecção microbiana, parasitóide ou filarióide (Nappi *et al.*, 2004; Nappi & Christenson 2005) e a inibição do H₂O₂ pela enzima catalase em reações *in vitro* reduziu a atividade virucida (Shelby & Popham, 2006). Desta forma, a redução dos transcritos do gene da catalase em hemócitos de *A. gemmatalis* pode estar envolvida na redução da resposta do hospedeiro à infecção viral.

No nosso trabalho, os transcritos de proteínas ribossomais foram tanto reprimidas quanto induzidas, mostrando uma maior indução do que repressão a 12 h p.i.. Neste momento da infecção, essas proteínas provavelmente devem ser produzidas para manter a síntese de precursores para replicação e montagem viral. Entretanto, em células Sf9 infectadas com AcMNPV, várias proteínas ribossomais foram drasticamente reprimidas a 24 h p.i. (Nobiron *et al.*, 2003). Essa diferença pode estar relacionada com o desligamento global da síntese de proteínas do hospedeiro em estágios tardios da infecção.

Outra proteína encontrada em nosso trabalho foi a proteína induzida pelo hormônio juvenil. A função do hormônio juvenil nos insetos é a manutenção da sua morfologia. Depois de uma infecção por microrganismos, os insetos vão sofrer uma pupação mais precoce do que o normal, deixando seus ovos preservados para o futuro. No entanto, depois de uma infecção por granulovírus, os insetos não sofrem pupação, indicando que as concentrações do hormônio juvenil são mantidas em um nível alto depois da infecção (Goldberg *et al.*, 2002). Huang *et al.* (2009) detectaram muitos genes relacionados ao hormônio juvenil que são induzidos em uma infecção oral por NPV. Zhou *et al.* (2002) e Gan *et al.* (2001) mostraram que o hormônio juvenil sintético pode melhorar a produção de NPV em células de insetos, indicando uma função na reprodução dos NPV.

Com relação à detecção da indução de transcritos da β -glicanase pela infecção de AcMNPV, Kanost *et al.* (2004) mostraram que muitas proteínas presentes na hemolinfa de *M. sexta*, como a β 1,3 glicanase, se ligam a moléculas de superfície microbiana, ativando respostas do sistema imune dos insetos. Desta forma, essa enzima pode ter um efeito na destruição de carboidratos da parede de microrganismos como fungos e bactérias e possivelmente na superfície viral.

Transcritos para 13 genes celulares foram identificados. Os mais abundantes foram para proteases celulares, que estão provavelmente envolvidas na resposta do inseto à infecção viral. Outros genes, como, por exemplo, hsp70 e hsc70, proteínas ribossomais, aminopeptidase, β 1,3 glicanase, proteína induzida pelo hormônio juvenil, lipase, também foram detectados. Todos esses transcritos podem de alguma maneira ter um papel na defesa celular e/ou estabelecimento da infecção viral. Outros genes devem ser analisados por PCR em tempo real para confirmar sua expressão diferencial.

Alguns genes em nosso trabalho foram induzidos na infecção por AcMNPV e reprimidos na infecção por AgMNPV. Isso pode ter ocorrido pela diferença de suscetibilidade das larvas de *A. gemmatalis* aos diferentes baculovírus utilizados, apresentando uma aparente contradição.

PERSPECTIVAS

A introdução dos genes das proteases ScathL e Queratinase no genoma do baculovírus AcMNPV é capaz de aumentar a virulência do baculovírus contra a lagarta do cartucho do milho *S. frugiperda*, pois demonstrou um tempo de morte reduzido em relação ao vírus selvagem. Além disso, esses recombinantes foram capazes de induzir a melanização da cutícula no final da infecção. Esses mesmos genes foram inseridos em um vetor de transferência para inserção no genoma do baculovírus mais utilizado do mundo, o AgMNPV, para controle da lagarta da soja *A. gemmatalis*.

A análise da expressão diferencial de baculovírus pode facilitar estudos funcionais de genes que são induzidos ou reprimidos durante uma infecção em insetos, podendo ser confirmada com a análise da PCR em tempo real (qPCR) para os genes encontrados neste trabalho.

Visando dar continuidade ao trabalho, pretende-se:

1. Isolar baculovírus recombinantes, baseados no AgMNPV, contendo os genes ScathL e Queratinase para a análise de suas propriedades inseticidas contra larvas de *A. gemmatalis*;
2. Realizar bioensaios com a lagarta da soja *A. gemmatalis* com a utilização dos baculovírus selvagem AgMNPV e recombinantes construídos e;
3. Proceder análises por qPCR para validação dos resultados obtidos para outros genes encontrados na expressão diferencial de baculovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar RW, Martins ES, Valicente FH, Carneiro NP, Batista AC, Melatti VM, Monnerat RG, Ribeiro BM: A recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. *Curr Microbiol.* 2006; 53 :287-92.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Science; 2002.

Alves, S.B.; Lopes, R.B.. Controle Microbiano de Pragas na América Latina. Avanços e Desafios. FAELQ: Piracicaba – SP, 2008: 414 .

Airenne KJ, Peltomaa E, Hytonen VP, Laitinen OH, Yla-Herttuala S. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 2003, 31.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997, 25: 3389-3402.

Ashe PC, Berry MD: Apototic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003, 27: 199-214.

Ashour MB, Ragheb DA, El-Sheikh el-SA, Gomaa El-AA, Kamita SG, Hammock BD. Biosafety of recombinant and wild type nucleopolyhedroviruses as bioinsecticides. *Int J Environ Res Public Health* 2007, 4 :111-25.

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopezferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa-californica* nuclear *polyhedrosis-virus*. *Virology* 1994, 202:586-605.

Barrett JW, Brownwright AJ, Primavera MJ, Palli SR. Studies of the *nucleopolyhedrovirus* infection process in insects by using the Green Fluorescence Protein as a reporter. *Journal of Virology* 1998, 72: 3377-3382.

Barros MCES: Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências da Saúde-Patologia Molecular, Universidade de Brasília, 2007.

Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *Bmc Microbiology* 2007, 7.

Bettencourt R, Lanz-Mendoza H, Lindquist KR, Faye I. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *European Journal of Biochemistry* 1997, 250: 630-637.

Bilimoria SL. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In *Viruses of Invertebrates*. Edited by Kurstak. New York: Marcel Dekker; 1991: 1-72.

Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T, Munoz P, Molina JP, Garcia ME. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40: 1811-1813.

Bonning BC, Hammock BD. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology* 1996, 41: 191-210.

Bonning BC, Ward VK, VanMeer MMM, Booth TF, Hammock BD. Disruption of lysosomal targeting is associated with insecticidal potency of juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94: 6007-6012.

Bonning BC, Possee RD, Hammock BD. Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase. *Journal of Invertebrate Pathology* 1999, 73: 234-236.

Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF. High throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 2006: 15.8.1 and 15.8.28.

Booth TF, Bonning BC, Hammock BD. Localization of juvenile-hormone esterase during development in normal and in recombinant baculovirus-infected larvae of the moth *Trichoplusia ni*. *Tissue & Cell* 1992, 24: 267-282.

Bressolier P, Letourneau F, Urdaci M, Verneuil B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65: 2570-2576.

Brown WJ, Farquhar MG. The mannose-6-phosphate receptor for lysosomal-enzymes is concentrated in cis golgi cisternae. *Cell* 1984, 36: 295-307.

Burden JP, Hails RS, Windass JD, Suner MM, Cory JS. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2000, 75: 226-236.

Carbonell LF, Hodge MR, Tomalski MD, Miller LK. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* 1988, 73: 409-418.

Carstens EB, Tjia ST, Doerfler W. Infection of *Spodoptera-frugiperda* cells with *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus. 1. Synthesis of intracellular proteins after virus-infection. *Virology* 1979, 99: 386-398.

Carstens EB, Ball LA. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2009, 154 :1181-8.

Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.

Immunological Reviews 2004, 198: 116-126.

Chang JH, Choi JY, Jin BR, Roh JY, Olszewski JA, Seo SJ, O' Reilly DR, Je YH. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *Journal of Invertebrate Pathology* 2003, 84: 30-37.

Charnley, A.K. & ST. Leger, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *Cole ET, Hoch HC Fungal spore disease initiation in plants and animals*. Edited by Plenum Press, London. New York; 1991: 267–287.

Clarke TE, Clem RJ. 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* 2002, 83: 1565-1572.

Clarke TE, Clem RJ. Insect defenses against virus infection: The role of apoptosis. *International Reviews of Immunology* 2003, 22: 401-424.

Clem RJ. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death and Differentiation* 2001, 8: 137-143.

Condreay JP, Kost TA. Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets*. 2007, 8 :1126-31.

Cory JS, Hirst ML, Williams T, Hails RS, Goulson D, Green BM, Carty TM, Possee RD, Cayley PJ, Bishop DHL. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 1994, 370:138-140.

Cory JS, Myers JH. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 2003, 34: 239-272.

Costa M, Borges CL, Bailao AM, Meirelles GV, Mendonca YA, Dantas S, De Faria FP, Felipe MSS, Molinari-Madlum E, Mendes-Giannini MJS, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology-Sgm* 2007, 153: 4194-4207.

Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL. In-vivo and in-vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 1995, 69: 7807-7813.

Crook, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In *Kurstak E, Viruses of invertebrates*. Edited by Kurstak. New York: Marcel Dekker; 1991: 73-110.

Cruz I, Figueiredo M, De LC, Matoso MJ. Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos Trichogramma. Sete Lagoas. *Circular Técnica 30*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Embrapa Milho e Sorgo; 1999.

Castro MEB, De Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria*

Brasileira 1999, 34: 1733-1761.

Castro MEB, Ribeiro ZMA, De Souza ML. Infectivity of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* to different insect cell lines: Morphology, viral production, and protein synthesis. *Biological Control* 2006, 36: 299–304.

Dalmolin CC, da Silva FR, Mello LV, Rigden DJ, Castro ME. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. *Virus Res.* 2005, 110 :99-109.

Daimon T, Katsuma S, Kang W, Shimada T. Comparative studies of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* chitinase and its host ortholog, BmChi-h. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 345: 825-833.

Deng YP, Dong YH, Thodima V, Clem RJ, Passarelli AL. Analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Bmc Genomics* 2006, 7.

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93: 6025-6030.

Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 2004, 155: 245-251.

Dwyer KG, Granados RR. Mapping *Pieris-rapae* granulosis-virus transcripts and their invitro translation products. *Journal of Virology* 1988, 62: 1535-1542.

Eldridge, R, O'Reilly, DR; Hammock, BD; Miller, LK. Insecticidal properties of genetically engineered baculovirus expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58: 1583-1591.

Engelhard EK, Kammorgan LNW, Washburn JO, Volkman LE. 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* 1994, 91: 3224-3227.

Engelhard EK, Volkman LE. Developmental resistance in 4th-instar *Trichoplusia-ni* orally inoculated with *Autographa-californica* M nuclear polyhedrosis-virus. *Virology* 1995, 209:384-389.

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

Federici, BA. Baculovirus pathogenesis. In *Lois K. Miller The baculoviruses*. Edited by Plenum Press. New York. 1997: p. 33-59

Federici BA, Hice RH. Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV. *Archives of Virology* 1997, 142: 333-348.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, Sraus SE. *Field-Virology*. Edited by Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 2950.

Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. Classification and nomenclature of viruses. In *Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses*: Archives of Virology Supplement; 1991: 117-123.

Frosco M, Chase T, Macmillan JD. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus-fumigatus*. *Infection and Immunity* 1992, 60: 728-734.

Froy O, Zilberberg N, Chejanovsky N, Anglister J, Loret E, Shaanan B, Gordon D, Gurevitz M. Scorpion neurotoxins: structure/function relationships and application in agriculture. *Pest Management Science* 2000, 56: 472-474.

Fujita R, Matsuyama T, Yamagishi J, Sahara K, Asano S, Bando H. Expression of *Autographa californica Multiple nucleopolyhedrovirus* genes in mammalian cells and Upregulation of the host beta-actin gene. *Journal of Virology* 2006, 80: 2390-2395.

Funk CJ, Consigli RA. Evidence for zinc-binding by 2 structural proteins of *Plodia-interpunctella* granulosis-virus. *Journal of Virology* 1992, 66: 3168-3171.

Fuxa JR. Insect control with baculoviruses. *Biotechnology Advances* 1991, 9: 425-442.

Gallo, D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RDL, Batista GC, De Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C: *Manual de entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ; 2002: 920.

Gan H, Wang Y, Jiang HB, Mita K, Kanost MR. A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2001, 31: 887-898.

Gatehouse HS, Poulton J, Markwick NP, Gatehouse LN, Ward VK, Young VL, Luo Z, Schaffer R, Christeller JT. Changes in gene expression in the permissive larval host lightbrown apple moth (*Epiphyas postvittana*, Tortricidae) in response to EppoNPV (Baculoviridae) infection. *Insect Molecular Biology* 2009, 18: 635-648.

Gillespie, AT. Use of fungi to control pests of agricultural importance. In *Fungi in biological control systems*. Edited by Burge MN. Manchester: Manchester University Press; 1988: 37-60.

Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. *Molecular Therapy* 2002, 6: 5-11.

Goldberg AV, Romanowski V, Federici BA, de Cap AS. Effects of the Epa granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 2002, 80: 148-159.

- Gooday, G.W. Aggressive and defensive roles for chitinases. In *Chitin and Chitinases*. Edited by Muzzarelli RAA, Jolles P. Birkhäuserverlag, 1999: 157-169.
- Gopalakrishnan B, Muthukrishnan S, Kramer KJ. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene - properties of the recombinant protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1995, 25: 255-265.
- Gorman MJ, Paskewitz, SM. Mosquito immunity and malaria parasites. *American Entomologist* 1999, 45: 80-94.
- Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2000 a, 30: 35-46.
- Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene* 2000 b, 251: 9-17.
- Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2001, 31: 257-262.
- Granados RR, Lawler KA. In vivo pathway of *Autographa-californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 1981, 108: 297-308.
- Granados RR, Li GX, Derksen ACG, McKenna KA. 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* 1994, 64: 260-266.
- Gröner A. Specificity and safety of baculoviruses. In *The biology of baculoviruses. Volume 1*. Edited by Granados, RR & Federici, BA. Boca Raton: CRC; 1986:177-202.
- Gross CH, Shuman S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5'-triphosphatase. *Journal of Virology* 1998, 72: 7057-7063.
- Guarino LA, Xu B, Jin JP, Dong W. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of Virology* 1998, 72: 7985-7991.
- Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annual Review of Immunology* 2001, 19: 65-91.
- Hallwass M. Uso do bioinseticida baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) como vetor de expressão de proteínas com interesse fitopatológico e como sistema biológico para análise da interação vírus/hospedeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia; 2005.
- Hammock BD, Bonning BC, Possee RD, Hanzlik TN, Maeda S. Expression and effects of the juvenile-hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* 1990, 344: 458-461.
- Harrison RL, Bonning BC. Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses. *Biological Control* 2001, 20: 199-209.

Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, Zanotto PMD, Howard SC, Gooday GW, Chappell LH, Kitts PA, King LA, Possee RD. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus genome. *Virology* 1995, 212: 673-685.

Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD. Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 1997, 238: 243-253.

Hayakawa T, Shimojo E, Mori M, Kaido M, Furusawa I, Miyata S, Sano Y, Matsumoto T, Hashimoto Y, Granados RR. Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus enhancin gene. *Applied Entomology and Zoology* 2000, 35: 163-170.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol.* 2009; 54: 285-302.

Herniou EA, Olszewski JA, Cory JS, O'Reilly DR. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol.* 2003;48: 211-34.

Herniou EA, Jehle JA. Baculovirus phylogeny and evolution. *Curr Drug Targets.* 2007 8: 1043-50.

Hink WF. Established insect cell line from cabbage looper, *Trichoplusia-ni*. *Nature* 1970, 226: 466-467.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999, 284: 1313-1318.

Hohfeld, J. Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol Chem* 1998, 379: 269-274.

Hom LG, Volkman LE. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. *Virology* 2000, 277: 178-183.

Homma K, Kurata S, Natori S. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin-l from the culture-medium of NIH-Sape-4, an embryonic-cell line of *Sarcophaga-peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal disks. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 15258-15264.

Homma K & Natori S. Identification of substrate proteins for cathepsin L that are selectively hydrolyzed during the differentiation of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina*. *European Journal of Biochemistry* 1996, 240: 443-447.

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

Huang LL, Cheng TC, Xu PZ, Cheng DJ, Fang T, Xia QY. A Genome-Wide Survey for Host Response of Silkworm, *Bombyx mori* during Pathogen *Bacillus bombyseptieus* Infection. *Plos One* 2009, 4.

Hubank M & Schatz DG. Identifying differences in Messenger-RNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* 1994, 22:5640-5648.

Hughes PR & Wood HA. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 1981, 37: 154-159.

Hughes PR, Wood HA, Breen JP, Simpson SF, Duggan AJ, Dybas JA. Enhanced bioactivity of recombinant baculoviruses expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 1997, 69: 112-118.

Imai N, Ali SES, El-Singabi NR, Iwanaga M, Matsumoto S, Iwabuchi K, Maeda S. Insecticidal effects of a recombinant baculovirus expressing a scorpion toxin LqhiT2. *J Seric Sci Jpn* 2000, 69: 197-205.

Ishidoh K, Kominami E. Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. *Biological Chemistry* 1998, 379: 131-135.

Iwanaga M, Takaya K, Katsuma S, Ote M, Tanaka S, Kamita SG, Kang WK, Shimada T, Kobayashi M. Expression profiling of baculovirus genes in permissive and nonpermissive cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 323: 599-614.

Jarvis DL. Baculovirus expression vectors. In *The Baculoviruses* Edited by Miller LK. New York: Plenum Press, 1997: 389-431.

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* 2006, 151: 1257-1266.

Jiang SS, Chang IS, Huang LW, Chen PC, Wen CC, Liu SC, Chien LC, Lin CY, Hsiung CA, Juang JL. Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica multiple nucleopolyhedrosis* virus. *Journal of Virology* 2006, 80: 8989-8999.

Jindal S & Young RA. Vaccinia virus-infection induces a stress response that leads to association of hsp70 with viral-proteins. *Journal of Virology* 1992, 66: 5357-5362.

Johnson DW, Maruniak JE. Physical map of *Anticarsia-gemmatalis* nuclear polyhedrosis-virus (AgMNPV-2) DNA. *Journal of General Virology* 1989, 70: 1877-1883.

Kageyama T & Takahashi SY. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *European Journal of Biochemistry* 1990, 193: 203-210.

Kanost MR, Jiang HB, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* 2004, 198: 97-105.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972, 26: 239.

Kim MG, Shin SW, Bae KS, Kim SC, Park HY. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1998, 28: 163-171.

Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. Linearization of baculovirus dna enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Research* 1990, 18: 5667-5672.

Klowden MJ. Physiological systems in insects. San Diego: Academic Press; 2002.

Kolattukudy PE, Lee JD, Rogers LM, Zimmerman P, Ceselski S, Fox B, Stein B, Copelan EA. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine-protease in *Aspergillo*sis. *Infection and Immunity* 1993, 61: 2357-2368.

Kornfeld S. Trafficking of lysosomal-enzymes. *Faseb Journal* 1987, 1: 462-468.

Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology* 1989, 5:483-525.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23: 567-575.

Kothary MH, Chase T, Macmillan JD. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus-fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive *Aspergillo*sis in mice. *Infection and Immunity* 1984, 43: 320-325.

Koyama AH, Fukumori T, Fujita M, Irie H, Adachi A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes and Infection* 2000, 2: 1111-1117.

Kramer KJ, Corpuz L, Choi HK, Muthukrishnan S. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca-sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1993, 23: 691-701.

Kramer KJ & Muthukrishnan S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1997, 27: 887-900.

Langereis MA, Acosta-Rosas G, Mulder K, Wilson VG. Production of sumolytated proteins using a baculovirus expression system. *Journal of Virological Methodos* 2007, 139: 189-194.

Larcher G, Bouchara JP, Annaix V, Symoens F, Chabasse D, Tronchin G. Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus-fumigatus* culture filtrate. *Febs Letters* 1992, 308: 65-69.

Lauzon HAM, Garcia-Maruniak A, Zanotto P, Clemente JC, Herniou EA, Lucarotti CJ, Arif BM, Maruniak JE. Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific Open Reading Frames. *Journal of General Virology* 2006, 87:

1477-1489.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 32: 1295–1309.

Lee HH & Miller LK. Isolation of genotypic variants of *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Virology* 1978, 27: 754-767.

Lee KS, Kim SR, Park NS, Kim I, Kang PD, Sohn BH, Choi KH, Kang SW, Je YH, Lee SM, Sohn HD, Jin BR. Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005, 35: 73-84.

Lehane SM, Assinder SJ, Lehane MJ. Cloning, sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. *European Journal of Biochemistry* 1998, 254: 290-296.

Li HR, Tang HL, Harrison RL, Bonning BC. Impact of a basement membrane-degrading protease on dissemination and secondary infection of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens* (Fabricius). *Journal of General Virology* 2007, 88: 1109-1119.

Li HR, Tang HL, Sivakumar S, Philip J, Harrison RL, Gatehouse JA, Bonning BC. Insecticidal activity of a basement membrane-degrading protease against *Heliothis virescens* (Fabricius) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Insect Physiology* 2008, 54: 777-789.

Li QJ, Li LL, Moore K, Donly C, Theilmann DA, Erlandson M. Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. *Journal of General Virology* 2003, 84: 123-132.

Liang P & Pardee AB. Differential display of eukaryotic Messenger-RNA by means of the polymerase chain-reaction. *Science* 1992, 257: 967-971.

Lu A, Seshagiri S, Miller LK. Signal sequence and promoter effects on the efficacy of toxin-expressing baculoviruses as biopesticides. *Biological Control* 1996, 7: 320-332.

Lu A, Miller LK. Regulation of baculoviruses late and very late expression. In *The baculoviruses*. Edited by Lois K Miller. New York: Plenum Press; 1997: 193-216.

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia-coli*. *Journal of Virology* 1993, 67: 4566-4579.

Luckow VA & Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio-Technology* 1988, 6: 47-55.

Macejak DG & Luftig RB: Association of hsp70 with the adenovirus type-5 fiber protein in infected HEP-2 cells. *Virology* 1991, 180: 120-125.

Macejak DG & Sarnow P. Association of heat-shock protein-70 with enterovirus capsid precursor p1 in infected human-cells. *Journal of Virology* 1992, 66: 1520-1527.

Maeda S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989, 165: 1177-1183.

Markaryan A, Morozova I, Yu HS, Kolattukudy PE. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus-fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infection and Immunity* 1994, 62: 2149-2157.

Martens JWM, Knoester M, Weijts F, Groffen SJA, Hu ZH, Bosch D, Vlak JM. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus-thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 1995, 66: 249-257.

Martignoni, ME. Baculovirus: an attractive biological alternative. In, *Chemical and biological controls in forestry*. Edited by Garner WY; Harvey Junior J. Washington, DC: American Chemical Society; 1984: 55-67.

Martins ES, Aguiar RW, Martins NF, Melatti VM, Falcão R, Gomes AC, Ribeiro BM, Monnerat RG. Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J Appl Microbiol.* 2008, 104: 1363-71.

Maruniak JE. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In *The Biology of Baculoviruses*. Edited by Granados RR, Federici BA, Boca Raton.; 1986: 129-146.

Mathieu-Daude F, Trenkle T, Welsh J, Jung B, Vogt T, McClelland M. Identification of differentially expressed genes using RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cdna Preparation and Characterization* 1999, 303: 309-324.

Matos TGT, Giugliano LG, Ribeiro BM, Bao SN. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A-gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 1999, 28: 195-201.

McCutchen BF, Choudary PV, Crenshaw R, Maddox D, Kamita SG, Palekar N, Volrath S, Fowler E, Hammock BD, Maeda S. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin - potential for pest-control. *Bio-Technology* 1991, 9: 848-852.

Means JC, Penabaz T, Clem RJ. Identification and functional characterization of AMVp33, a novel homolog of the baculovirus caspase inhibitor p35 found in *Amsacta moorei* entomopoxvirus. *Virology* 2007, 358: 436-447.

Melo IS & Azevedo JL. Controle biológico. Edited by Embrapa. Jaguariúna, SP; 1998: 264.

- Merryweather AT, Weyer U, Harris MPG, Hirst M, Booth T, Possee RD. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus-thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 delta-endotoxin. *Journal of General Virology* 1990, 71: 1535-1544.
- Merzendorfer H & Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 2003, 206: 4393-4412.
- Mikitani K, Sugasaki T, Shimada T, Kobayashi N, Gustafsson JA. The chitinase gene of the silkworm, *Bombyx mori*, contains a novel Tc-like transposable element. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 37725-37732.
- Miller DW, Safer P, Miller LK. An Insect Baculovirus Host-Vector For High-Level Expression Of Foreign Genes. In *Genetic engineering*. Edited by Setlow JK, Hollaender A. New York: Plenum; 1986: 277-298.
- Miller LK, Miller D, Adang M. An insect virus for genetic engineering: developin baculovirus polyhedron substitution vectors. In *Genetic engineering in eukaryotes*. Edited by Lurquin P, Kleinhofs A. New York: Plenum Press; 1983: 89-97.
- Miller, GL. Use of dinitrosalicilic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, New York 1959, 31: 426-428.
- Molano J, Duram A, Cabib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using triated chitin. *Analytical Biochemistry*, New York 1977, 83: 648-656.
- Monod M, Paris S, Sanglard D, Jattonogay K, Bille J, Latge JP. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus-fumigatus*. *Infection and Immunity* 1993, 61: 4099-4104.
- Moody D.E. Genomics techniques. An overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Sci.* 79, 2001: 128-135.
- Morales L, Moscardi F, Sosa-Gomez DR, Paro FE, Soldorio IL. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) *nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control* 2001, 20: 247-253.
- Moscardi F. Utilização de Baculovirus *Anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. In *Comunicado técnico*, 23. Edited by Embrapa-CNPSO. Londrina PR; 1983: 13.
- Moscardi F & Correa-Ferreira, Bs. Biological control of soybean caterpillars. In *World Soybean Research Conference*, 3: 1984, Edited by Boulder: Westview; 1985: 703-711.
- Moscardi F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84; 1989: 51-56.

Moscardi F, Sosa-Gómez DR. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In *Pest management in soybean*. Edited by Copping IG, Green MB, Reeds RT. London: Elsevier Applied Science; 1992: 98-109.

Moscardi F, Sosa-Gómez DR. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In *International Crop Science Congress*, 1 Edited by Madison, Crop Science Society of America. Ames, Iowa; 1993: 115-119.

Moscardi F, Sosa-Gómez DR. Utilización de virus a campo. In *Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Edited by Lecuona, R.E. Buenos Aires: Taller Mariano Mass; 1996: 261-276.

Moscardi F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In *Controle microbiano de insetos*. Edited by ALVES, SB. Piracicaba: FEALQ; 1998: 509-539.

Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol*. 1999; 44: 257-89.

Moscardi F & Santos B. Produção comercial de nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. Anais , IX. *Simpósio de Controle biológico*. Recife PE, 2005: 42.

Moser M, Menz G, Blaser K, Cramer R. Recombinant expression and antigenic properties of a 32-kilodalton extracellular alkaline protease, representing a possible virulence factor from *Aspergillus-fumigatus*. *Infection and Immunity* 1994, 62: 936-942.

Munier AI, Medzhitov R, Janeway CA, Doucet D, Capovilla M, Lagueux M. Graal: a *Drosophila* gene coding for several mosaic serine proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2004, 34: 1025-1035.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Springer-Verlag Wien; 1995: 104-113.

Nakajima Y, Tsuji Y, Homma K, Natori S. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) - Its purification and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272: 23805-23810.

Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology* 2004, 321: 154-162.

Nappi AJ, Kohler L, Mastore M. Signaling pathways implicated in the cellular innate immune responses of *Drosophila*. *Invertebrate Survival Journal* 2004, 1: 5-33.

Nappi AJ & Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005, 35: 443-459.

Nobiron I, O'Reilly D, Olzewski JA. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus

infection of *Spodoptera frugiperda* cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach. *Journal of General Virology* 2003, 84: 3029-3039.

Noronha EF, de Lima BD, de Sa CM, Felix CR. Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* queratinase in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2002, 18: 563-568.

Ohkawa T, Majima K, Maeda S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx-mori* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Virology* 1994, 68: 6619-6625.

Oliveira JVD, Wolff JLC, Garcia-Maruniak A, Ribeiro BM, Castro MEB, de Souza ML, Moscardi F, Maruniak JE, Zanotto PMD. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 2006, 87: 3233-3250.

Ooi BG, Miller LK. Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 1988, 166: 515-523.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.

O'Reilly DR. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1995, 25: 541-550.

O'Reilly DR, Miller LK. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 1989, 245: 1110-1112.

O'Reilly DR & Miller LK. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP glucosyltransferase Gene. *Journal of Virology* 1990, 64: 1321-1328.

Pang Y, Frutos R, Federici BA. Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector. *Journal of General Virology* 1992, 73: 89-101.

Passarelli AL & Miller LK. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus genome. *Virology* 1993, 197: 704-714.

Pastorian K, Hawel L, Byus CV. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry* 2000, 283: 89-98.

Payne CC. Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie* 1986, 32: 183-200.

Praça LB, Silva Neto SB, Monnerat RG. *Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. *Documentos 199*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2006.

Peng JX, Zhong J, Granados RR. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology* 1999, 45: 159-166.

Pennock GD, Shoemaker C, Miller LK. Strong and regulated expression of *Escherichia-coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Molecular and Cellular Biology* 1984, 4: 399-406.

Pinedo FJR, Moscardi F, Luque T, Olszewski JA, Ribeiro BM. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biological Control* 2003, 27: 336-344.

Ponnuvel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 2003, 77: 10725-10729.

Popham HJR, Bischoff DS, Slavicek JM. Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus Enhancin genes contribute to viral potency. *Journal of Virology* 2001, 75:8639-8648.

Popham HJR, Shelby KS, Brandt SL, Coudron TA. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 2004, 85: 2255-2261.

Popham HJR, James J. Grasela, Cynthia L. Goodman, Arthur H. McIntosh. Baculovirus infection influences host protein expression in two established insect cell lines. *Journal of Insect Physiology* 2010, 56: 1237–1245.

Prikhod'ko GG, Popham HJR, Felcetto TJ, Ostlind DA, Warren VA, Smith MM, Garsky VM, Warmke JW, Cohen CJ, Miller LK. Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides. *Biological Control* 1998, 12: 66-78.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998, 62: 597.

Räty JK, Lesch HP, Wirth T, Ylä-Herttuala S. Improving safety of gene therapy. *Curr Drug Saf.* 2008, 3: 46-53.

Rawlings ND, O' Brien E, Barrett AJ. MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Research* 2002, 30: 343-346.

Rawlings ND, Pearl LH, Buttle DJ. The baculovirus *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus genome includes a papain-like sequence. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1992, 373:1211-1215.

Ribeiro BM & Crook NE. Expression of full-length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus-thuringiensis* subsp *kurstaki* in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 1993, 62:

121-130.

Ribeiro BM, Souza ML, Kitajima EW. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. In *Alves, BS Controle Microbiano de Insetos*. Edited by UNESP. São Paulo, 1998: 481-503.

Richardson, C.D. Baculovirus expression protocols. *Methods Mol Biol* 1995, 39: 418.

Rodrigues JCM, De Souza ML, O' Reilly D, Velloso LM, Pinedo FJR, Razuck FB, Ribeiro B, Ribeiro BM. Characterization of the ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 2001, 22: 103-112.

Roelvink PW, Vanmeer MMM, Dekort CAD, Possee RD, Hammock BD, Vlak JM. Dissimilar expression of *Autographa-californica multiple* nucleocapsid nuclear polyhedrosis-virus polyhedron and p10 genes. *Journal of General Virology* 1992, 73: 1481-1489.

Sainis I, Angelidis C, Pagoulatos GN, Lazaridis I. HSC70 interactions with SV40 viral proteins differ between permissive and nonpermissive mammalian cells. *Cell Stress & Chaperones* 2000, 5: 132-138.

Sambrook J & Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Keene KM, Franz AWE, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Research* 2004, 102: 65-74.

Santos R, Firmino AAP, De Sa CM, Felix CR. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Current Microbiology* 1996, 33: 364-370.

Santos, RMDB: Hidrólise de queratina pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. Purificação e caracterização da proteinase queratinolítica com potencial biotecnológico. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Molecular, 1996.

Saville GP, Patmanidi AL, Possee RD, King LA. Deletion of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase KDEL motif and in vitro and in vivo analysis of the modified virus. *Journal of General Virology* 2004, 85: 821-831.

Saville GP, Thomas CJ, Possee RD, King LA. Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *Journal of General Virology* 2002, 83: 685-694.

Schafellner C, Eizaguirre M, Lopez C, Sehnal F. Juvenile hormone esterase activity in the pupating and diapausing larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Physiology* 2008, 54: 916-921.

Schafellner C, Marktl RC, Schopf A. Inhibition of juvenile hormone esterase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae parasitized by *Glyptapanteles*

- liparidis* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Insect Physiology* 2007, 53: 858-868.
- Secchi VA. Baculovirus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável* 2002, 3.
- Shelby KS & Popham HJR. Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal. *Journal of Insect Science* 2006, 6: 1-12.
- Shinoda T, Kobayashi J, Matsui M, Chinzei Y. Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2001, 31: 521-532.
- Sieburth PJ & Maruniak JE. Growth-characteristics of a continuous cell-line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia-gemmatalis* hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1988, 24: 195-198.
- Silveira EB, Cordeiro BA, Ribeiro BM, Bao SN. 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* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Research in Microbiology* 2005, 156: 1014-1025.
- Silveira EB, Cordeiro BA, Ribeiro BM, Castro MEB, Soares EF, Bao SN. An *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* mutant, vApAg, induces hemocytes apoptosis in vivo and displays reduced infectivity in larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Research* 2007, 130: 182-192.
- Slack JM, Kuzio J, Faulkner P. Characterization of v-cath, a cathepsin l-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa-californica multiple nuclear polyhedrosis-virus*. *Journal of General Virology* 1995, 76: 1091-1098.
- Slack JM & Lawrence SD. Evidence for proteolytic cleavage of the baculovirus occlusion-derived virion envelope protein P74. *Journal of General Virology* 2005, 86: 1637-1643.
- Slack JM, Lawrence SD, Krel PJ, Arif BM. Trypsin cleavage of the baculovirus occlusion-derived virus attachment protein P74 is prerequisite in per os infection. *Journal of General Virology* 2008, 89: 2388-2397.
- Smith CR, Heinz KM, Sansone CG, Flexner JL. Impact of recombinant Baculovirus applications on target heliothines and nontarget predators in cotton. *Biological Control* 2000, 19: 201-214.
- Smith GE, Vlak JM, Summers MD. Physical analysis of *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight protein. *Journal of Virology* 1983, 45: 215-225.
- Smith GE, Fraser MJ, Summers MD. Molecular engineering of the *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus genome - deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology* 1983 a, 46: 584-593.

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* 1983 b, 3: 2156-2165.

Soares JS & Ribeiro BA. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A-gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. *Research in Microbiology* 2005, 156: 263-269.

Souza MLS, Castro MEB, Silher W, Ribeiro ZMA, Moscardi F. Caracterização de baculovirus utilizados no controle de pragas. *Biotechnologia: Ciência e Desenvolvimento* 2002, 24: 18-20.

Stewart LMD, Hirst M, Ferber ML, Merryweather AT, Cayley PJ, Possee RD. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 1991, 352: 85-88.

StLeger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium-anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1991, 58: 415-426.

StLeger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 1995 a, 73: S1119-S1125.

StLeger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Protein-synthesis in *Metarhizium-anisopliae* growing on host cuticle. *Mycological Research* 1995 b, 99: 1034-1040.

StLeger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* 1996 a, 62: 1257-1264.

StLeger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996 b, 93: 6349-6354.

Su XD, Gastinel LN, Vaughn DE, Faye I, Poon P, Bjorkman PJ. Crystal structure of hemolin: A horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* 1998, 281: 991-995.

Sullivan CS & Pipas JM. The virus-chaperone connection. *Virology* 2001, 287: 1-8.

Summers MD, Smith GE, Knell JD, Burand JP. Physical maps of *Autographa-californica* and *Rachiplusia-ou* nuclear polyhedrosis-virus recombinants. *Journal of Virology* 1980, 34: 693-703.

Summers MD & Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. In *Texas Agricultural Experiment Station. Bulletin 1555*. Texas A&M University College Station, Department of Entomology, Texas; 1987: 56.

Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz W, de Souza ML. Baculoviruses -
142

re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 2006, 24: 143-160.

Szewczyk B, Barski P, Sihler W, Rabalski L, Skrzecz I, Hoyos-Carvajal L, de Souza ML. Detection and identification of baculovirus pesticides by multitemperature single-strand conformational polymorphism. *J Environ Sci Health B* 2008, 43: 539-45.

Takahashi SY, Yamamoto Y, Shionoya Y, Kageyama T. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx-mori* - identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in-vivo and in-vitro. *Journal of Biochemistry* 1993, 114: 267-272.

Tan A, Tanaka H, Tamura T, Shiotsuki T. Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102: 11751-11756.

Tang H, Li H, Lei SM, Harrison RL, Bonning BC. Tissue specificity of a baculovirus-expressed, basement membrane-degrading protease in larvae of *Heliothis virescens*. *Tissue & Cell* 2007, 39: 431-443.

Tani H, Limn CK, Yap CC, Onishi M, Nozaki M, Nishimune Y, Okahashi N, Kitagawa Y, Watanabe R, Mochizuki R, Kohji M, Yoshiharu M. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *Journal of Virology* 2003, 77: 9799-9808.

Teodoro JG & Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* 1997, 71: 1739-1746.

Terenius O. Hemolin - A lepidopteran anti-viral defense factor? *Developmental and Comparative Immunology* 2008, 32: 311-316.

Theilmann DA, Blissard GW, Bonning B, Jehle JA, O'Reilly DR, Rohrmann GF, Thiem F, Vlak JM. Baculoviridae. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005: 177-185. *Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.

Thiem SM, Du XL, Quentin ME, Berner MM. Identification of a Baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. *Journal of Virology* 1996, 70: 2221-2229.

Thomas CJ, Brown HL, Hawes CR, Lee BY, Min MK, King LA, Possee RD. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 1998, 72: 10207-10212.

Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Possee RD. Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *Journal of General Virology* 2000, 81: 1403-1411.

Todd JW, Passarelli AL, Lu A, Miller LK. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *Journal of Virology* 1996, 70: 2307-2317.

Tomalski MD & Miller LK. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 1991, 352: 82-85.

Tomalski MD & Miller LK. Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides. *Bio-Technology* 1992, 10: 545-549.

Treacy MF & All JN. Impact of insect-specific AaHIT gene insertion on inherent bioactivity of baculovirus against tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Proc. Beltwide Cotton Conference*, 1996. Nashville, TN.

Treacy MF, Rensner PE, All JN. Comparative insecticidal properties of two nucleopolyhedrovirus vectors encoding a similar toxin gene chimera. *Journal of Economic Entomology* 2000, 93: 1096-1104.

Trudeau D, Washburn JO, Volkman LE. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *Journal of Virology* 2001, 75: 996-1003.

Turnipseed SG & Kogan M. Integrated control of insect pests. In *Soybeans: improvement, production and uses*. Edited by Wilcox, JR: Madison: Agronomy; 1987: 779-817.

Valicente FH. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. *Circular Técnica. Embrapa Milho e Sorgo* 2009; 105: 1-9.

Van Beek NAM & Hughes PR. The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 1998, 72: 338-347.

Van Loo ND, Fortunati E, Ehlert E, Rabelink M, Grosveld F, Scholte BJ: Baculovirus infection of nondividing mammalian cells. Mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology* 2001, 75: 961-970.

Van Munster M, Willis LG, Elias M, Erlandson MA, Brousseau R, Theilmann DA, Masson L. Analysis of the temporal expression of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus genes following transfection of BT1-Tn-5B1-4 cells. *Virology* 2006, 354: 154-166.

Van Oers MM, Van Marwijk M, Kwa MSG, Vlak JM, Thomas AAM. Cloning and analysis of cDNAs encoding the hypusine-containing protein eIF5A of two lepidopteran insect species. *Insect Molecular Biology* 1999, 8: 531-538.

Van Oers MM, Van der Veken L, Vlak JM, Thomas AAM. Effect of baculovirus infection on the mRNA and protein levels of the *Spodoptera frugiperda* eukaryotic initiation factor 4E. *Insect Molecular Biology* 2001, 10: 255-264.

Van Oers MM. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res.* 2006, 68: 193-253.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. Establishment of 2 cell lines from insect *Spodoptera-frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* 1977, 13: 213-217.

Vilmos P & Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 1998, 62: 59-66.

Volkman L, Storm K, Aivazachvili V, Oppenheimer D. Overexpression of actin in AcMNPV-infected cells interferes with polyhedrin synthesis and polyhedra formation. *Virology* 1996, 225: 369-376.

Volkman LE. Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Curr Drug Targets*. 2007, 8: 1075-83.

Vonfigura K & Hasilik A. Lysosomal-enzymes and their receptors. *Annual Review of Biochemistry* 1986, 55: 167-193.

Wan JS, Sharp SJ, Poirier GMC, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Horn YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander MG. Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology* 1996, 14: 1685-1691.

Wang P & Granados RR. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 1998, 72: 57-62.

Wang XZ, Ooi BG, Miller LK. Baculovirus vectors for multiple gene-expression and for occluded virus production. *Gene* 1991, 100: 131-137.

Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE. Comparative pathogenesis of *Autographa-californica* M nuclear polyhedrosis-virus in larvae of *Trichoplusia-ni* and *Heliothis-virescens*. *Virology* 1995, 209: 561-568.

Williams GV & Faulkner P. Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In *The baculoviruses*. Edited by Miller LK. Plenum New York; 1997: 61-107.

Winstanley D & Crook NE. Replication of *Cydia-pomonella* granulosis-virus in cell-cultures. *Journal of General Virology* 1993, 74: 1599-1609.

Xi ZY, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *Plos Pathogens* 2008, 4.

Xu B, Yoo S, Guarino LA. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters - fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. *Journal of Virology* 1995, 69: 2912-2917.

Yan J, Cheng QY, Li BB, Aksoy S. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Molecular Biology* 2001, 10: 47-56.

Yarygin DV, Klunova SM, Filippovich YB. Isolation, purification, and properties of cysteine proteinase from *Bombyx mori* L. eggs. *Biochemistry-Moscow* 2003, 68: 63-67.

Yousef GM, Kopolovic AD, Elliott MB, Diamandis EP. Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 305: 28-36.

Yu XQ & Kanost MR. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid - An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *European Journal of Biochemistry* 2002, 269: 1827-1834.

Zanotto PMD, Kessing BD, Maruniak JE. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses - evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* 1993, 62: 147-164.

Zhang JH, Washburn JO, Jarvis DL, Volkman LE. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus early GP64 synthesis mitigates developmental resistance in orally infected noctuid hosts. *Journal of General Virology* 2004, 85: 833-842.

Zhang P, Yang K, Dai XJ, Pang Y, Su DM. Infection of wild-type *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of *Spodoptera litura* larvae. *Journal of General Virology* 2002, 83: 3003-3011.

Zheng YP, Retnakaran A, Krell PJ, Arif BM, Primavera M, Feng QL. Temporal, spatial and induced expression of chitinase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology* 2003, 49: 241-247.

Zheng Y, Zheng S, Cheng X, Ladd T, Lingohr EJ, Krell PJ, Arif BM, Retnakaran A, Feng Q. A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 32: 1813-1823.

Zimmermann R. The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biological Chemistry* 1998, 379:275-282.

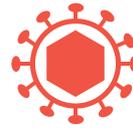
Zlotkin E, Fishman Y, Elazar M. AaIT: From neurotoxin to insecticide. *Biochimie* 2000, 82: 869-881.

Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang HB. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Molecular Biology* 2006, 15: 603-614.

ANEXO

Anexo I Artigo publicado na revista Virology Journal.

Welzel-Gramkow A, Perecmanis S, Sousa RLB, Noronha EF, Felix CR, Nagata T, Ribeiro BM: **Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinants baculovirus.** *Virology J* 2010, **7**: 143.



RESEARCH

Open Access

Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses

Aline Welzel Gramkow, Simone Perecmanis, Raul Lima Barbosa Sousa, Eliane Ferreira Noronha, Carlos Roberto Felix, Tatsuya Nagata and Bergmann Morais Ribeiro*

Abstract

Background: Baculovirus comprise the largest group of insect viruses most studied worldwide, mainly because they efficiently kill agricultural insect pests. In this study, two recombinant baculoviruses containing the ScathL gene from *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL), and the Keratinase gene from the fungus *Aspergillus fumigatus* (vSynKerat), were constructed. and their insecticidal properties analysed against *Spodoptera frugiperda* larvae.

Results: Bioassays of third-instar and neonate *S. frugiperda* larvae with vSynScathL and vSynKerat showed a decrease in the time needed to kill the infected insects when compared to the wild type virus. We have also shown that both recombinants were able to increase phenoloxidase activity in the hemolymph of *S. frugiperda* larvae. The expression of proteases in infected larvae resulted in destruction of internal tissues late in infection, which could be the reason for the increased viral speed of kill.

Conclusions: Baculoviruses and their recombinant forms constitute viable alternatives to chemical insecticides. Recombinant baculoviruses containing protease genes can be added to the list of engineered baculoviruses with great potential to be used in integrated pest management programs.

Background

Baculovirus comprise the largest group of insect viruses most studied worldwide, mainly because they efficiently kill agricultural insect pests. They are specific to one or a few related insect species [1], and have infectious particles protected in protein crystals which allows the formulation of biopesticides with easy application technology. Their use as bioinsecticides are a safe alternative to chemical insecticides [2,3].

They are large double-stranded, circular DNA viruses with a genome size ranging from 80 to 200 kilobases (kb) [4]. Baculoviruses have enveloped rod-shaped virions and two distinct phenotypes in a single cycle of infection: the budded virus (BV), which is responsible for transmitting the virus from cell to cell and the occlusion-derived virus (ODV), which is occluded in a proteinaceous occlusion

body, [5] and is responsible for horizontal transmission of the virus from insect to insect.

The type species of the Baculoviridae family is the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) which is the most studied baculovirus at the molecular level, having a wide spectrum of hosts and has been widely used as an expression vector for heterologous proteins in insect cells and insects [6]. To speed up the death of their hosts, recombinant baculoviruses have been constructed, increasing their biopesticide properties. Some of the most effective recombinant baculoviruses are the ones containing insect-specific neurotoxins genes [7-9]. In susceptible hosts, these neurotoxins, expressed during virus infection, reduce damage to crops and decrease the time required to kill the insects from 25 to 50% when compared to larvae infected with the wild type virus [10-14].

Besides insect-specific toxins, other proteins have been introduced into the genome of baculoviruses. For instance, one of the first effective recombinant baculovirus constructed with the intention of improving biological

* Correspondence: bergmann@unb.br

¹ Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasilia, DF, CEP 70910-970, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



cal control, contained the diuretic hormone gene from *Manduca sexta* that, when injected into larvae of *Bombyx mori*, was able to kill the insects 20% faster than wild-type virus [15]. The wild type and mutant juvenile hormone esterase (JHE) genes from *Heliothis virescens* were also inserted into the genome of AcMNPV [16-19]. The wild type JHE gene has shown an improvement on AcMNPV pathogenicity only towards *Trichoplusia ni* neonate larva [16]. However, mutated versions of the JHE gene that improved protein stability also showed increased pathogenicity towards *H. virescens* larvae [20]. Some baculoviruses produce during infection, the enzyme Ecdysteroid UDP-Glycosyl Transferase (EGT), which inactivates the hormone ecdysone of their hosts [21,22]. The deletion or inactivation of the *egt* gene can also result in reduced infected-insect time to death and reduced economic damage to crops [21,23].

Recombinant baculoviruses have also been constructed with enhancer genes from other baculoviruses. These recombinants were based on AcMNPV and were designed to improve the ability of the virus to gain access to midgut epithelium cells [24-26]. Also chitinases of some insect pathogens have also been used to increase baculovirus pathogenicity [27,28]. Some entomopathogenic microbes produce chitinases to penetrate the insect host body [27,29] and baculoviruses themselves also produce chitinases to liquefy the host body after their death by viral infection [30,31]. Another type of toxin gene used with the purpose of increasing baculovirus pathogenicity is the Cry toxin gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt). Some Cry toxin genes were inserted into AcMNPV genome and shown to produce large amounts of biological active toxins [32-37]. However, only a Cry toxin fused with the major occlusion body protein (polyhedrin) of the baculovirus AcMNPV was capable of improving the virus pathogenicity towards its insect host [37].

The only protease gene used with the aim of improving insecticidal activity of baculoviruses was the cathepsin-L (ScathL) gene of *Sarcophaga peregrina*, which showed reduced survival time and damage caused by infected larvae when compared with the wild virus [38].

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous species that attacks many economically important crops in several countries. In Brazil, this insect can attack the following crops: corn, sorghum, rice, wheat, alfalfa, beans, peanuts, tomato, cotton, potatoes, cabbage, spinach, pumpkin and cabbage [39,40].

Aspergillus fumigatus is found in nature as an opportunistic pathogen of the airways, affecting humans, birds and other animals. It is responsible for a variety of respiratory diseases and many invasive infections. This fungus produces many proteolytic enzymes such as elastases

[41-43], serine proteases [44] and collagenases [45], which are involved in many key events in the pathophysiology of *A. fumigatus* [46]. The Keratinase of the fungus *A. fumigatus* has been isolated, purified and characterized previously [46].

In this study, we constructed recombinant baculoviruses containing the ScathL gene from *S. peregrina*, and the Keratinase gene from the fungus *A. fumigatus*, under the command of two promoters in tandem and analysed their insecticidal properties against *S. frugiperda* larvae.

Methods

Virus and cell

Trichoplusia ni insect cells (BTI-Tn5B1-4) [47] and/or *S. frugiperda* IPLB-Sf21-AE (Sf-21) [48] were kept at 27°C in TC-100 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL). These cell lines were used for the *in vitro* propagation of AcMNPV and the recombinant vSynVI-gal, which contains the β -galactosidase (*lac-Z*) gene in place of the *polh* gene [49], and were also used for the construction of the recombinant viruses containing the ScathL and Keratinase genes, respectively.

Construction of recombinant plasmids and viruses

The cathepsin-L (ScathL) gene from *S. peregrina* was amplified by PCR using specific oligonucleotides (Protease F 5'-CCACCAGCAACCATCACCTTAAGCTT-TAACAC-3') (Protease R 5'-GAATTCAATTGAAAAAGGCAG-3') and DNA from the pKYH5 plasmid (courtesy of Dr. Robert Harrison, Iowa State University, USA). The Protease F oligonucleotide anneals at positions -10 to -35 and relative to the start codon (ATG) and the Protease R oligonucleotide anneals to positions +76 to +91 relative to the last nucleotide of the stop codon (TAA) of the ScathL gene. The position of the *Hind*III and *Eco*RI restriction sites are shown in italics, respectively. The amplified fragment was then cloned into vector pGEM⁺-T following the manufacturer's instructions (Promega). The plasmid pGEM-ScathL containing the gene for ScathL was digested with *Nco*I (Invitrogen) and *Not*I (Promega), the resulting fragment was separated by electrophoresis in an agarose gel (0.8%) and the fragment of 1,100 bp, corresponding to the ScathL gene was purified using the DNA extraction Perfect Gel Cleanup kit, according to manufacturer's instructions (Eppendorf). Next, we carried out a T4 DNA polymerase reaction (Invitrogen) using the purified fragment in order to create blunt ends, following the manufacturer's instructions (Invitrogen) and ligated the fragment to the transfer vector pSynXIVVI+X3 [49], which enables insertion of the heterologous gene under the control of two promoters in tandem (pSyn and pXIV)

[49], and previously digested with *Sma*I and dephosphorylated, according to the manufacturer's protocol (Promega). *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed with the ligation by electroporation [50] and the recombinant plasmid (pSynScathL) was obtained. The plasmid pGEMKerat containing the Keratinase gene from *A. fumigatus* [46] was amplified in DH5 α cells of *E. coli* and purified using the DNA extraction Concert kit, according to manufacturer's instructions (Invitrogen). The plasmid was digested with *Eco*RI (GE), the DNA fragment corresponding to 1,200 bp was purified from an agarose gel (0.8%), using the GFX DNA extraction kit, according to the manufacturer's instructions (GE). The purified fragment was ligated with the *Eco*RI-digested and dephosphorylated transfer vector pSynXIVVI+X3 [49], using the Rapid DNA Ligation[®] kit following the manufacturer's instructions (Promega). The ligation product was then used to transform DH5 α cells in order to obtain the transfer vector pSynKerat.

The plasmid DNAs from pSynScathL and pSynKerat (1 μ g each) were separately co-transfected with the DNA (0.5 μ g) of the *Bsu*36I-linearized vSynVI-gal recombinant virus in BTI-TN-5B1-4 cells (10^6), using liposomes following the manufacturer's instructions (CellFectin[®], Invitrogen).

Seven days after co-transfection, the supernatants of the co-transfected cells were collected and used for the isolation of the recombinant viruses vSynKerat and vSynScathL by serial dilution in 96-well plates [51].

Bioassays

Thirty 3rd instar *S. frugiperda* larvae (for each virus) were injected with 10 μ l of each viral stock (approximately 1×10^6 pfu) into the hemolymph, as a negative control, thirty *S. frugiperda* larvae were also injected with culture medium and the experiment was repeated three times. The inoculated larvae were placed individually in plastic cups with artificial diet and observed twice daily until death. Statistical analysis was performed using the Polo Plus program (LeOra Software).

Bioassays with occluded viruses were conducted using the droplet feeding method [52] with five different concentrations of occlusion bodies per nanoliter (10^2 , 10^1 , 1.0, 0.1, 0.01 occlusion bodies/nL). Thirty neonate larvae of *S. frugiperda* were used for oral inoculation with the different viral doses from each of the recombinant viruses, the wild type AcMNPV and with only dye (2% phenol red) as negative control. Mortality was scored until 10 d.p.i. and the data analyzed by probit analysis using the Polo Plus program (LeOra Software). The insects were monitored every eight hours for ten days. The inoculated larvae were placed individually in plastic

cups with artificial diet and the experiment was repeated three times. The mean time to death (TD) was calculated according to Morales et al. [53].

Structural and ultrastructural analysis of the internal tissues of virus-infected *S. frugiperda* larvae

Ten 3rd instar *S. frugiperda* larvae were injected with the recombinant viruses as described above and dissected at different times post infection. The insects were dissected by cutting along their backs with an entomological scissors to expose the gut and other organs and were photographed under a stereomicroscope (Stemi SV 11, Zeiss). An uninfected larvae was used as control. Furthermore, the infected insects were also prepared for scanning electron microscopy, as described in Matos et al. [54]. Briefly, the infected insects were fixed in a solution of 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M, pH 6.4 for 2 h at 4°C, washed by 3 cycles of 15 min with cacodylate buffer 0.1 M and post-fixed in osmium tetroxide and 1:1 potassium ferrocyanide for 2 h and then dehydrated with an ascending series of acetone and then dried (Balzer CPD30 critical point drier) and covered with gold in a sputter coater apparatus (Balzer SCD 050). The samples were then analyzed in a scanning electron microscope JEOL JSM 840 at 10 kV.

Phenoloxidase activity

Third-instar *S. frugiperda* larvae were separately inoculated with BV stocks (10^8 pfu/mL) with AcMNPV, vSynScathL, vSynKerat and mock infected as described above. At 72 h p.i., haemolymph was collected and placed into 100 μ l of anticoagulant buffer (0.098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M EDTA, 0.041 M Citric acid) and used for detection of phenoloxidase activity. Briefly, hemolymph samples were kept on ice, and hemocytes were pelleted by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 min at 4°C. The cell-free hemolymph, 113 μ g, was then transferred to a tube containing 800 μ L of 10 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and incubated for 20 min at 25°C and the mixture analyzed in a spectrophotometer at 475 nm.

Results

Construction of recombinant plasmids and viruses

The ScathL gene from *S. peregrina* was amplified by PCR from pKYH5 plasmid DNA and cloned into the vector pGEM⁺-T Easy (data not shown). The DNA fragment containing the gene was removed from the cloning vector by digestion with restriction enzymes and cloned into the transfer vector pSynXIVVI+X3 forming a new plasmid, called pSynScathL (data not shown). Similarly, the Keratinase gene was removed from a cloning vector by digestion with restriction enzymes and cloned into the transfer vector pSynXIVVI+X3 generating the plasmid pSynKerat

(data not shown). The recombinant viruses were constructed by separately co-transfecting insect cells with the pSynScathL and pSynKerat DNA and DNA from the recombinant vSynVI-gal in BTI-Tn5B1-4 cells. Within the insect cells, homologous recombination occurred between regions of the plasmid vector and viral genome. The recombinant viruses vSynScathL and vSynKerat were then isolated from the supernatant of co-transfected insect cells by end-point dilution (Figure 1).

Bioassays

Thirty 3rd instar *S. frugiperda* larvae were separately inoculated with approximately 10⁶ pfu per larvae of each recombinant and wild type virus via hemolymph. The recombinants vSynScathL and vSynKerat were able to induce insect death faster than the wild-type virus (Table 1). The vSynScathL showed a LT₅₀ and a mean time to death (TD) of 47 h and 2.62 days, respectively, while the AcMNPV, a LT₅₀ of 136 h and a TD of 5.37 days, respectively. This represents a significant 65.5% reduction in the time needed to kill the virus infected insects when compared to the wild type virus. The LT₅₀ and TD for the vSynKerat were 91 h and 3.70 days, respectively, with represents a reduction of 32.8% compared to AcMNPV. Moreover, in the final stages of infection, viruses with the ScathL and Kerat genes induced melanization of the cuticle, which was not observed with AcMNPV infected insects (Figure 2).

Droplet feeding bioassays were also carried out with neonate *S. frugiperda* larvae with different concentrations of occlusion bodies from AcMNPV, vSynScathL and

vSynKerat. The recombinant vSynScathL was also shown to induce death in neonate larvae faster compared to wild-type virus (Table 2). The vSynScathL showed a LT₅₀ of 77 h while the AcMNPV, a LT₅₀ of 104 h when inoculated with 102 PIBs/nL. This represents a reduction of 26% in the time needed to kill the infected insects when compared to the wild type virus. The LT₅₀ for the virus vSynKerat was 54 h, with a reduction of 48% compared to the virus AcMNPV. We also analysed the LC₅₀ for the two recombinants but no significant difference was observed when compared with the wild type virus (Table 3).

Structural and ultrastructural tissue analysis of *S. frugiperda* larvae infected with different viruses

S. frugiperda larvae uninfected and infected with AcMNPV, vSynScathL and vSynKerat were examined under a stereomicroscope (Figure 3) and a scanning electron microscope (Figure 4). The larvae infected with AcMNPV showed the presence of fat tissue (Figure 3) and tracheal system firmly attached to the gut of the caterpillar (Figure 4). On the other hand, larvae infected with vSynScathL (Figure 2) and vSynKerat (Figure 2) showed melanization of the cuticle, had little or no fat tissue and tracheal system was loosely connected to the midgut of the insect (Figure 4).

Phenoloxidase activity

Phenoloxidase activity was determined spectrophotometrically by measuring formation of dopachrome from L-DOPA at 475 nm in haemolymph samples from insects infected with vSynScathL, vSynKerat, AcMNPV and

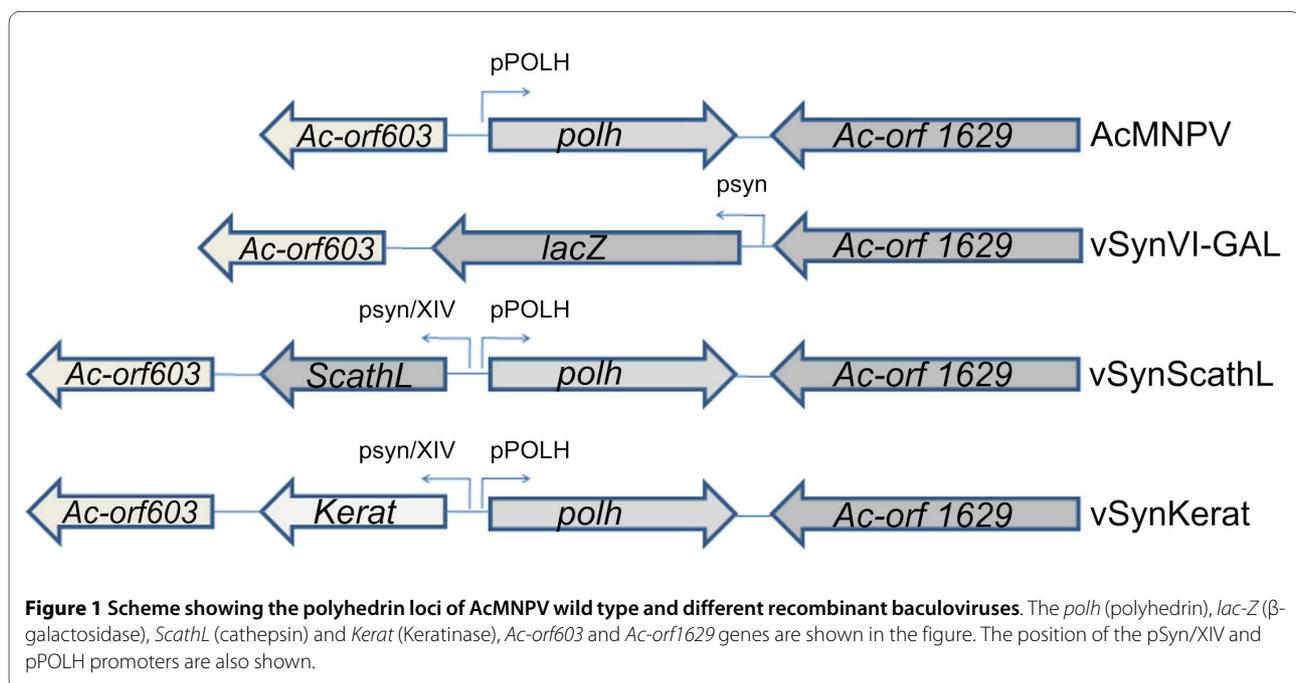


Table 1: LT₅₀ values for the wild type and recombinant viruses in 3rd instar *S. frugiperda* larvae.

Virus	LT ₅₀	CL (95%) Lower	CL (95%) Upper	TD/SD
AcMNPV	136.15	119.91	161.86	5.23(+/- 0.28)
vSynScathL	47.00	33.51	57.60	2.61(+/- 0.07)
vSynKerat	91.44	78.28	105.14	3.65(+/- 0.36)

LT₅₀: Lethal Time in 50% of the larvae, in hours

CL: confidence limits at 95%

TD: mean time to death in days

SD: standard deviation

Larvae were injected with 10⁶ pfu/larva into the hemolymph with the recombinant baculoviruses vSynScathL and vSynKerat and the wild type virus.

mock infected (figure 5). We observed an expressive increase in phenoloxidase activity in haemolymph from *S. frugiperda* larvae infected with vSynScathL (0.23) and vSynKerat (0.17) when compared with haemolymph from mock-infected (0.10) and AcMNPV-infected insects (0.05). The experiment was repeated three times.

Discussion

The introduction of heterologous genes into baculoviruses genomes has been performed for various purposes, such as to increase the virulence of these viruses towards their hosts [3,55] and for expression of heterologous proteins in cultured insect cells and insects [56,51,57,58].

Different genes have been introduced into the genome of baculovirus aiming the improvement of their pathogenicity towards their hosts. For instance, AcMNPV recombinants expressing wild type and mutated versions of JHE

were able to improve viral pathogenicity and reduce the consumption of food by the larvae of *H. virescens* and *T. ni* [16,59,20]. The TxP-1 toxin gene from the mite *Ptyemotes tritici*, was introduced into the genome of the AcMNPV and shown to have an improved insecticidal activity. The recombinant baculovirus expressing TxP-1 had a reduction of 30-40% in the time to induce insect death when compared to the wild type virus [60,13,61]. Similar results were found with the introduction of the scorpion toxin AaIT gene from *Androctonus australis* with lethal time reduced by 25-40% when compared to wild-type virus [11,12,62,8]. Other toxins from scorpions [63,64], spiders [65], sea anemones [65] and *B. thuringiensis* [34,35,37] were also expressed using recombinant baculoviruses, and most of them showed an improvement on the virus speed of kill. Strong promoters as those in the transfer vector pSynXIVVI+X3 [49,51] are widely

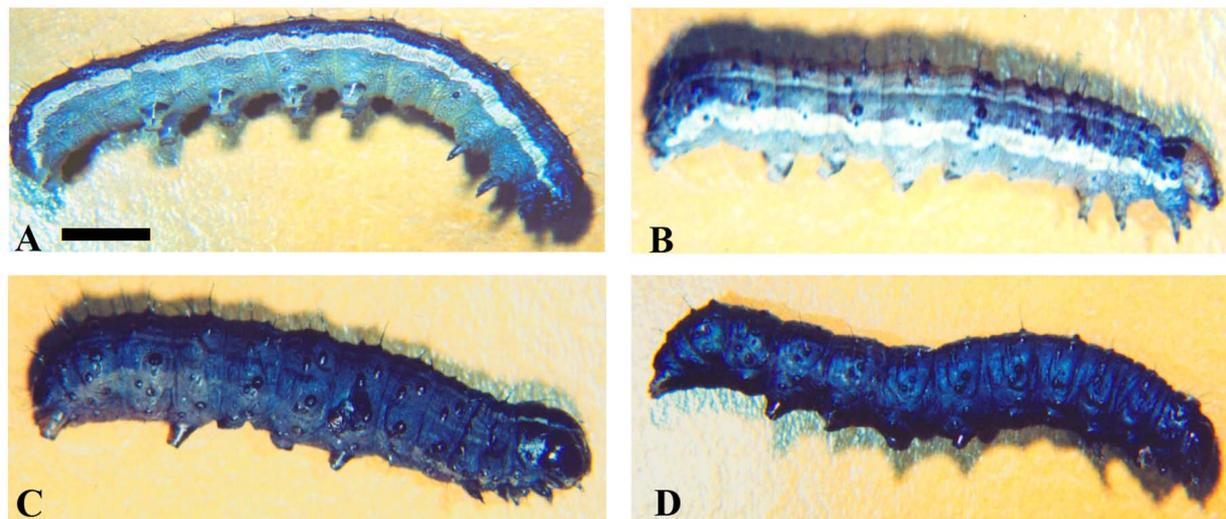


Figure 2 Structural analysis of the cuticle of larvae of *S. frugiperda* observed in a stereomicroscope. Uninfected larvae (A) and infected with type virus AcMNPV (120 h.p.i.) (B), recombinant vSynScathL (96 h.p.i.) (C), vSynKerat (96 h.p.i.) (D). Note melanization of cuticle in the larvae infected with vSynScathL and vSynKerat. Bar = 0.38 cm.

Table 2: LT₅₀ values for the wild type and recombinants vSynScathL and vSynKerat in neonate *S. frugiperda* larvae.

Virus	LT ₅₀	CL (95%) lower	CL (95%) Upper	TD/SD
AcMNPV	104	94.07	112.05	4.16/(+/- 0.6)
vSynScathL	77	49.26	93.91	3.46/(+/-0.4)
vSynKerat	54	37.71	71.29	3.87(+/- 0.58)

LT₅₀: LetaI Time in 50% of the larvae, in hours

CL: confidence limits at 95% TD: mean time to death in days

SD: standard deviation

Larvae were inoculated with 10² occlusion bodies/nL with the recombinant baculoviruses vSynScathL and vSynKerat and the wild type virus.

used for high levels of heterologous protein expression in insect cells. This vector has two promoters in tandem (pSyn and PXIV) that are active from the viral late through the very late phases of transcription [49] and are responsible for the high levels of heterologous protein expression during infection. This vector also have the *polh* gene that facilitates detection and isolation of recombinant viruses when co-transfected with occlusion negative (occ⁻) viral DNA.

Recombinant baculoviruses expressing proteases that potentially degrade the basement membrane of tissues of insects have also been developed. A recombinant AcMNPV was constructed with the introduction of the ScathL gene from *S. peregrina*, under the command of the *p6.9* promoter, and significantly reduced (49%) the survival time of infected neonate *H. virescens* larvae and the their consumption of food when compared to the wild type virus [38].

In this work, we inserted the genes of ScathL of *S. peregrina* and Keratinase of *A. fumigatus* in the genome of the baculovirus AcMNPV by using the vector pSynX-IVVI+X3 and analysed the effect on viral pathogenicity. The recombinant vSynScathL constructed in this work confirmed the data previously shown by Harrison et al.

[38] showing that the expression of the ScathL gene increase viral speed of kill when compared to the wild type AcMNPV. The recombinant vSynScathL showed a LT₅₀ of 47 h while the AcMNPV, a LT₅₀ of 136 h, which represents a significant reduction of 65.5% in the survival time of *S. frugiperda* when 10⁶ pfu of BVs were innoculated into the hemolymph of third-instar larvae. Furthermore, the vSynScathL showed a 26% reduction in survival time when neonate *S. frugiperda* larvae were orally inoculated with 10² occlusion bodies/nL. Harrison et al. [38] showed a 49% reduction in survival time of neonate *H. virescens* when infected with a AcMNPV recombinant containing the ScathL gene under the control of the *p6.9* promoter (AcMLF9.ScathL) when compared to the wild type AcMNPV. Furthermore, Li et al. [66] have shown that purified ScathL was able to kill insects in the absence of baculovirus infection by injecting the protease into the hemocoel. The difference in larval survival time from the work by Harrison et al. [38] and this work, might be due to the diferent promoters used for the expression of the ScathL gene and the different viral susceptibility of the insects tested, since *S. frugiperda* has been shown to be 1000 × less susceptible to AcMNPV by

Table 3: LC₅₀ values for the wild type and recombinants vSynScathL and vSynKerat in neonate *S. frugiperda* larvae.

Virus	LC ₅₀ (occlusion bodies/nL)	CL (95%) Lower	CL (95%) Upper	χ ² (df)
AcMNPV	32.32	19.10	47.84	1.49(3)
vSynScathL	8.15	1.73	26.72	3.99(3)
vSynKerat	30.41	17.58	51.17	1.28(3)

LC₅₀: LetaI Concentration in 50% of the larvae, in occlusion bodies/nL

CL: confidence limits at 95%,

χ²: qui-square

df: degrees of freedom.

Larvae were inoculated with different doses of occlusion bodies with the recombinant baculoviruses vSynScathL and vSynKerat and the wild type virus.

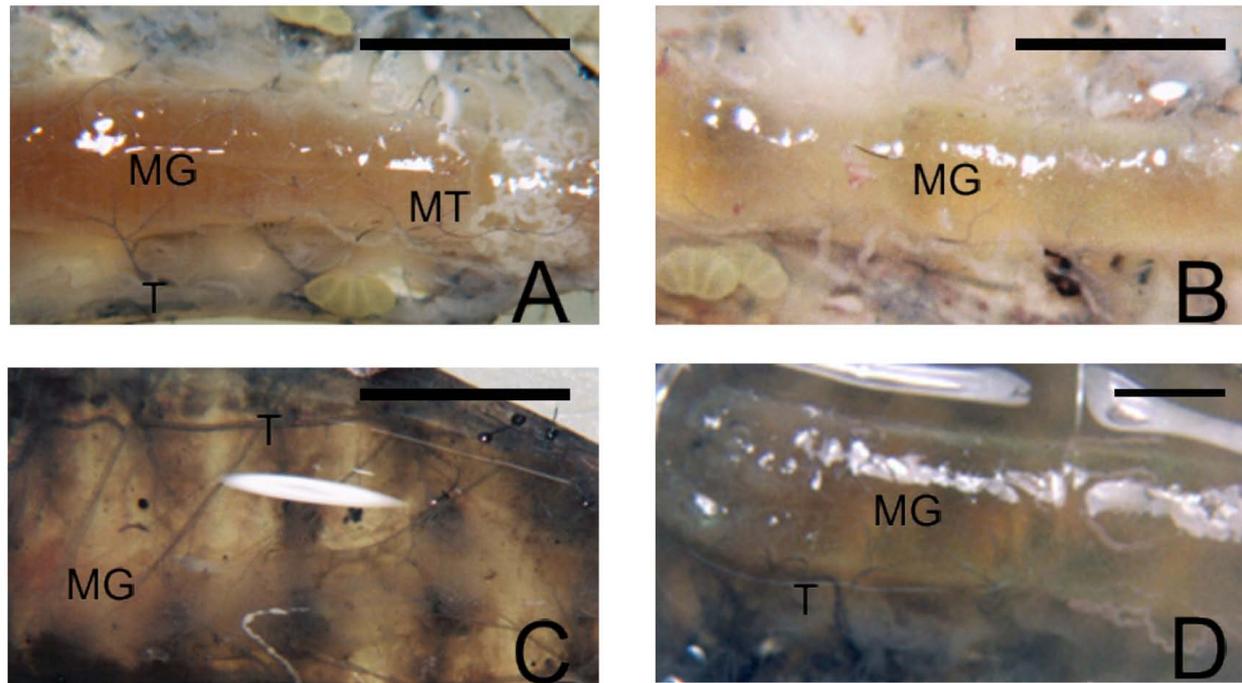


Figure 3 Structural analysis of the internal tissues of larvae of *S. frugiperda*. Uninfected larvae (132 h.p.i) (A), infected larvae with the baculovirus AcMNPV (B), vSynScathL (C) and vSynKerat (D). In C and D in addition to the observed melanization of the cuticle, it is also possible to see the reduction of fat tissue.

oral inoculation when compared to the more susceptible *T. ni* larvae [67].

We also introduced the Keratinase (a serine protease) gene from the fungus *A. fumigatus* into the AcMNPV genome using the same vector and also showed an increase in viral speed of kill towards *S. frugiperda*. The virus vSynKerat showed a 32.8% reduction in the LT_{50} when compared to wild type virus when 10^6 pfu of BVs were inoculated into the hemolymph of third instar larvae and 48% reduction when 10^2 occlusion bodies/nL were administered to neonate larvae. Fungal serine proteases are known for their elastolytic properties that enhance fungal invasiveness [68,69]. The production of *A. fumigatus* serine proteases capable of degrading elastin and mucin, among various other substrates has been previously observed [70]. Since the recombinant virus constructed in this work (vSynKerat) possesses a serine protease from *A. fumigatus* we would expect that the expression of this protein inside infected insect larvae would increase virus pathogenicity similarly to the ScathL by degrading extracellular matrix proteins and/or interfering with the phenoloxidase activity of the insect host. The LC_{50} for the two recombinants did not show significant differences when compared with the wild type virus (Table 2).

The melanization of the cuticle observed in insects infected with the recombinants vSynScathL and vSynKerat may have been caused by the activation of the insect phenoloxidase enzyme, found in the form of a proenzyme in the hemolymph. In invertebrates, the presence of antigens and the appearance of tissue damage results in the deposition of melanin around the damaged tissue or antigen as well as sclerotization of the cuticle [71]. Melanization of the cuticle and tissue damage, including rupture of the intestine and fragmentation of the fat tissue has been previously shown in larvae of *H. virescens* infected with a recombinant AcMNPV containing the ScathL gene [38,72,73], suggesting that ScathL was able to cause tissue fragmentation prior to insect death and activate the cascade triggered by serine proteases leading to conversion of pro-phenoloxidase in its active form phenoloxidase. However, Li et al. [66] have shown that the cysteine protease activity of purified ScathL was not able to activate pro-phenoloxidase to phenoloxidase *in vitro* and the phenoloxidase activity in the hemolymph of *H. virescens* larvae was not altered by a recombinant AcMNPV containing the ScathL gene under the baculovirus basic *p6.9* promoter (AcMLF9.ScathL).

We have shown that both recombinants (vSynScathL and vSynKerat) containing the ScathL and Keratinase genes under the command of strong promoters were able

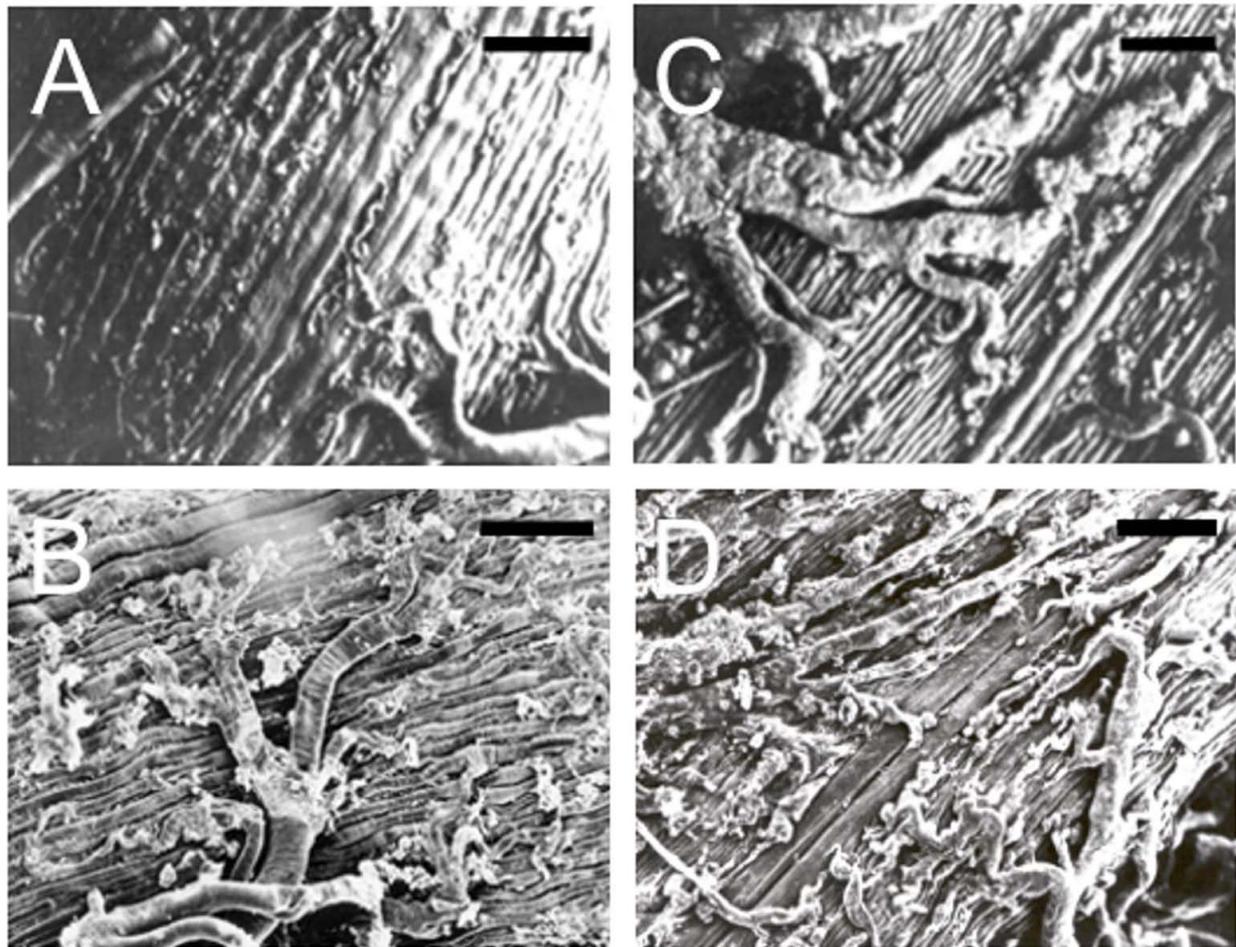


Figure 4 Ultrastructure of *S. frugiperda* midgut from virus-infected insects at 96 h.p.i. Scanning electron micrographs showing the integrity of the tissue around the gut of the caterpillar uninfected (A), tracheal system tightly attached to the midgut and partial destruction of the connective tissue in larvae infected with virus AcMNPV (B) and loosening of the tracheal system and intense tissue destruction in larvae infected with vSynScathL (C) and vSynKerat (D). Bar 100 µM.

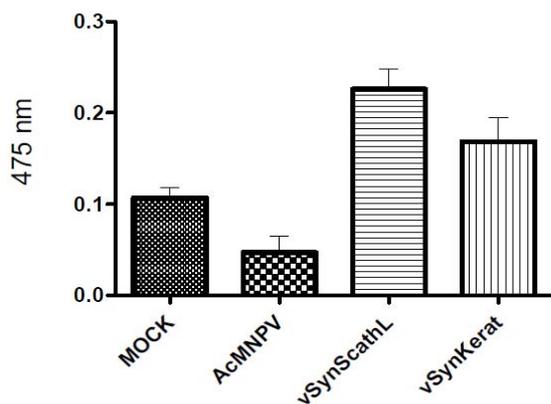


Figure 5 Phenoloxidase activity in haemolymph of infected *S. frugiperda* larvae. The haemolymph was collected at 72 h p.i., the cell removed by centrifugation and phenoloxidase activity was determined spectrophotometrically using the cell-free haemolymph (113 µg) and L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as a substrate. The experiment was repeated 3 times. Note that haemolymph from insects infected with the recombinant vSynScathL and vSynKerat showed increased activation of the enzyme.

to increase phenoloxidase activity in the hemolymph of *S. frugiperda* larva. Since the Keratinase is a serine protease this result was not a surprise, since insect serine proteases are known to be involved in melanin production [71]. The increased hemolymph phenoloxidase activity by the vSynScathL could be explained, in part, by the high level of expression of this protein in infected insects. However, further analysis will be necessary to clarify the role of the ScathL in this increase in phenoloxidase activity.

Conclusions

Although recombinant baculoviruses have not yet been widely used for the control of insect pests, they constitute a viable alternative to chemical insecticides. The recombinant baculoviruses containing protease genes can be added to list of engineered baculoviruses with great potential to be used in integrated pest management programs.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AWG carried out the study, performed analysis of data and drafted the manuscript. SP helped with the construction of recombinant viruses and with the structural and ultrastructural analysis of virus-infected *S. frugiperda* larvae. RLBS helped with bioassays. EFN and CRF developed the phenoloxidase assay protocol and provided the Keratinase gene. TN participated in the study design and sequencing of DNA constructs. BMR conceived the study, provided research funds, students supervision and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are deeply indebted to Dr. Rose Monnerat from Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil, for her kind supply of *S. frugiperda* larvae, and to Dr. Robert Harrison from Iowa State University, USA for DNA from the pKYH5 plasmid. This work was supported by the following Brazilian agencies: CNPq, CAPES, FAPDF.

Author Details

Cell Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-970, Brazil

Received: 14 April 2010 Accepted: 29 June 2010

Published: 29 June 2010

References

1. Gröner A: **Specificity and safety of baculoviruses.** In *The biology of baculoviruses Volume 1*. Edited by: Granados RR, Federici BA. Boca Raton: CRC; 1986:177-202.
2. Moscardi F: **Utilização de vírus entomopatogênicos em campo.** In *Controle microbiano de insetos* Edited by: Alves SB. Piracicaba: FEALQ; 1999:509-539.
3. Castro MEB, Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM: **Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1999, **34**:1733-1761.
4. Lauzon HAM, Garcia-Maruniak A, Zanotto P, Clemente JC, Herniou EA, Lucarotti CJ, Arif BM, Marunick JE: **Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames.** *J Gen Virol* 2006, **87**:1477-1489.
5. Smith GE, Vlaskovic JM, Summers MD: **Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight protein.** *J Gen Virol* 1983, **45**:215-225.
6. Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlaskovic JM: **On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision.** *Arch Virol* 2006, **151**:1257-1266.
7. Smith CR, Heinz KM, Sansone CG, Flexner JL: **Impact of recombinant Baculovirus applications on target heliothines and nontarget predators in cotton.** *Biol Control* 2000, **19**:201-214.
8. Treacy MF, Rensner PE, All JN: **Comparative insecticidal properties of two nucleopolyhedrovirus vectors encoding a similar toxin gene chimera.** *J Econ Entomol* 2000, **93**:1096-1104.
9. Van Beek NAM, Hughes PR: **The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses.** *J Invertebr Pathol* 1998, **72**:338-347.
10. Cory JS, Hirst ML, Williams T, Hails RS, Goulson D, Green BM, Carty TM, Possee RD, Cayley PJ, Bishop DHL: **Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide.** *Nature* 1994, **370**:138-140.
11. McCutchen BF, Choudary PV, Crenshaw R, Maddox D, Kamita SG, Palekar N, Volrath S, Fowler E, Hammock BD, Maeda S: **Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin - potential for pest-control.** *BioTechnology (N Y)* 1991, **9**:848-852.
12. Stewart LMD, Hirst M, Ferber ML, Merryweather AT, Cayley PJ, Possee RD: **Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene.** *Nature* 1991, **352**:85-88.
13. Tomalski MD, Miller LK: **Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides.** *BioTechnology (N Y)* 1992, **10**:545-549.
14. Treacy MF, All JN: **Impact of insect-specific aahit gene insertion on inherent bioactivity of baculovirus against tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and cabbage looper *Trichoplusia ni*.** *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference: 911-917*, Nashville 1996.
15. Maeda S: **Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **165**:1177-1183.
16. Hammock BD, Bonning BC, Possee RD, Hanzlik TN, Maeda S: **Expression and effects of the juvenile-hormone esterase in a baculovirus vector.** *Nature* 1990, **344**:458-461.
17. Booth TF, Bonning BC, Hammock BD: **Localization of juvenile-hormone esterase during development in normal and in recombinant baculovirus infected larvae of the moth *Trichoplusia ni*.** *Tissue Cell* 1992, **24**:267-282.
18. Roelvink PW, Vanmeer MMM, Dekort CAD, Possee RD, Hammock BD, Vlaskovic JM: **Dissimilar expression of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis-virus polyhedron and p10 genes.** *J Gen Virol* 1992, **73**:1481-1489.
19. Eldridge R, O'Reilly DR, Hammock BD, Miller LK: **Insecticidal properties of genetically engineered baculovirus expressing an insect juvenile hormone esterase gene.** *Appl Environ Microbiol* 1992, **58**:1583-1591.
20. Bonning BC, Possee RD, Hammock BD: **Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase.** *J Invertebr Pathol* 1999, **73**:234-236.
21. O'Reilly DR, Miller LK: **A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid udp-glucosyl transferase.** *Science* 1989, **245**:1110-1112.
22. Rodrigues JCM, De Souza ML, O'Reilly D, Velloso LM, Pinedo FJR, Razuck FB, Ribeiro B, Ribeiro BM: **Characterization of the ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus.** *Virus Genes* 2001, **22**:103-112.
23. Pinedo FJR, Moscardi F, Luque T, Olszewski JA, Ribeiro BM: **Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host.** *Biol Control* 2003, **27**:336-344.
24. Popham HJR, Bischoff DS, Slavicek JM: **Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus Enhancin genes contribute to viral potency.** *J Virol* 2001, **75**:8639-8648.
25. Li Q, Li L, Moore K, Donly C, Theilmann DA, Erlandson M: **Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancing and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant.** *J Gen Virol* 2003, **84**:123-132.
26. Hayakawa T, Shimojo E, Mori M, Kaido M, Furusawa I, Miyata S, Sano Y, Matsumoto T, Hashimoto Y, Granados RR: **Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus enhancin gene.** *Appl Entomol Zool* 2000, **35**:163-170.
27. Kramer KJ, Muthukrishnan S: **Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 1997, **27**:887-900.
28. Merzendorfer H, Zimoch L: **Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases.** *J Exp Biol* 2003, **206**:4393-4412.
29. Gooday GW: **Aggressive and defensive roles for chitinases.** In *Chitin and Chitinases* Edited by: Muzzarelli RAA, Jolles P. Birkhäuserverlag; 1999:157-169.
30. Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, Zanotto PMD, Howard SC, Gooday GW, Chappell LH, Kitts PA, King LA, Possee RD: **Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus genome.** *Virology* 1995, **212**:673-685.
31. Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD: **Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes.** *Virology* 1997, **238**:243-253.
32. Merryweather AT, Weyer U, Harris MPG, Hirst M, Booth T, Possee RD: **Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki HD-73 delta-endotoxin.** *J Gen Virol* 1990, **71**:1535-1544.
33. Pang Y, Frutos R, Federici BA: **Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial cryvid mosquito proteins expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector.** *J Gen Virol* 1992, **73**:89-101.
34. Ribeiro BM, Crook NE: **Expression of full-length and truncated forms of ribetal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses.** *J Invertebr Pathol* 1993, **62**:121-130.

35. Ribeiro BM, Souza ML, Kitajima EW: **Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos.** In *Alves, BS Controle Microbiano de Insetos* Edited by: UNESP. São Paulo; 1998:481-503.
36. Martens JWM, Knoester M, Weijts F, Groffen SJA, Hu ZH, Bosch D, Vlak JM: **Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins.** *J Invertebr Pathol* 1995, **66**:249-257.
37. Chang JH, Choi JY, Jin BR, Roh JY, Olszewski JA, Seo SJ, O'Reilly DR, Je YH: **An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin.** *J Invertebr Pathol* 2003, **84**:30-37.
38. Harrison RL, Bonning BC: **Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses.** *Biol Control* 2001, **20**:199-209.
39. Cruz I, Figueiredo M, De LC, Matoso MJ: **Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma. Sete Lagoas.*** In *Circular Técnica 30* Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Embrapa Milho e Sorgo; 1999.
40. Praça LB, Silva Neto SB, Monnerat RG: ***Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle.** In *Documentos 199* Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2006.
41. Frosco M, Chase T, Macmillan JD: **Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*.** *Infect Immun* 1992, **60**:728-734.
42. Markaryan A, Morozova I, Yu HS, Kolattukudy PE: **Purification and characterization of an elastolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung.** *Infect Immun* 1994, **62**:2149-2157.
43. Moser M, Menz G, Blaser K, Cramer R: **Recombinant expression and antigenic properties of a 32-kilodalton extracellular alkaline protease, representing a possible virulence factor from *Aspergillus fumigatus*.** *Infect Immun* 1994, **62**:936-942.
44. Larcher G, Bouchara JP, Annaix V, Symoens F, Chabasse D, Tronchin G: **Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate.** *FEBS Lett* 1992, **308**:65-69.
45. Monod M, Paris S, Sanglard D, Jatonogay K, Bille J, Latge JP: **Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*.** *Infect Immun* 1993, **61**:4099-4104.
46. Noronha EF, de Lima BD, De Sa CM, Felix CR: **Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* keratinase in *Pichia pastoris*.** *World J Microb Biot* 2002, **18**:563-568.
47. Granados RR, Li GX, Derksen ACG, mckenna KA: **A new insect-cell line from *Trichoplusia ni* (bti-tn-5b1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis-virus.** *J Invertebr Pathol* 1994, **64**:260-266.
48. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, Mccawley P: **Establishment of 2 cell lines from insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera-Noctuidae).** *In Vitro* 1977, **13**:213-217.
49. Wang XZ, Ooi BG, Miller LK: **Baculovirus vectors for multiple gene-expression and for occluded virus production.** *Gene* 1991, **100**:131-137.
50. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
51. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* New York: W.H. Freeman and Company; 1992.
52. Hughes PR, Wood HA: **A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses.** *J Invertebr Pathol* 1981, **37**:154-159.
53. Morales L, Moscardi F, Sosa-Gomez DR, Paro FE, Soldorio IL: **Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect.** *Biol Control* 2001, **20**:247-253.
54. Matos TGT, Giugliano LG, Ribeiro BM, Bao SN: **Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus.** *Int J Insect Morphol Embryol* 1999, **28**:195-201.
55. Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE: **Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy.** *Mol Ther* 2002, **6**:5-11.
56. Luckow VA, Summers MD: **Trends in the development of baculovirus expression vectors.** *BioTechnology (N Y)* 1988, **6**:47-55.
57. Richardson CD: **Baculovirus expression protocols.** *Methods Mol Biol* 1995, **39**:418.
58. Jarvis DL: **Baculovirus expression vectors.** In *The Baculoviruses* Edited by: Miller LK. New York: Plenum Press; 1997:389-431.
59. Bonning BC, Ward VK, Vanmeer MMM, Booth TF, Hammock BD: **Disruption of lysosomal targeting is associated with insecticidal potency of juvenile hormone esterase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:6007-6012.
60. Tomalski MD, Miller LK: **Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene.** *Nature* 1991, **352**:82-85.
61. Lu A, Seshagiri S, Miller LK: **Signal sequence and promoter effects on the efficacy of toxin-expressing baculoviruses as biopesticides.** *Biol Control* 1996, **7**:320-332.
62. Zlotkin E, Fishman Y, Elazar AAT: **From neurotoxin to insecticide.** *Biochimie* 2000, **82**:869-881.
63. Froy O, Zilberberg N, Chejanovsky N, Anglister J, Loret E, Shaanan B, Gordon D, Gurevitz M: **Scorpion neurotoxins: structure/function relationships and application in agriculture.** *Pest Manag Sci* 2000, **56**:472-474.
64. Imai N, Ali SES, El-Singabi NR, Iwanaga M, Matsumoto S, Iwabuchi K, Maeda S: **Insecticidal effects of a recombinant baculovirus expressing a scorpion toxin LqhIT2.** *J Seric Sci Jpn* 2000, **69**:197-205.
65. Prikhod'ko Prikhod'ko GG, Popham HJR, Felcetto TJ, Ostlind DA, Warren VA, Smith MM, Garsky VM, Warmke JW, Cohen CJ, Miller LK: **Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides.** *Biol Control* 1998, **12**:66-78.
66. Li HR, Tang HL, Sivakumar S, Philip J, Harrison RL, Gatehouse JA, Bonning BC: **Insecticidal activity of a basement membrane-degrading protease against *Heliothis virescens* (Fabricius) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris).** *J Insect Physiol* 2008, **54**:777-789.
67. Clarke T, Clem RJ: **Lack of involvement of haemocytes in establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection.** *J Gen Virol* 2002, **83**:1565-1572.
68. Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T, Munoz P, Molina JP, Garcia ME: **Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:1811-1813.
69. Kolattukudy PE, Lee LD, Rogers LM, Zimmerman P, Ceselski S, Fox B, Stein B, Copelan EA: **Evidence for a possible involvement of an elastolytic serine protease in Aspergillosis.** *Infect Immun* 1993, **61**:2357-2368.
70. Stleger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW: **Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:6349-6354.
71. Cerenius L, Soderhall K: **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** *Immunol Rev* 2004, **198**:116-126.
72. Tang H, Li H, Lei SM, Harrison RL, Bonning BC: **Tissue specificity of a baculovirus-expressed, basement membrane-degrading protease in larvae of *Heliothis virescens*.** *Tissue Cell* 2007, **39**:431-443.
73. Li HR, Tang HL, Harrison RL, Bonning BC: **Impact of a basement membrane-degrading protease on dissemination and secondary infection of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens* (Fabricius).** *J Gen Virol* 2007, **88**:1109-1119.

doi: 10.1186/1743-422X-7-143

Cite this article as: Gramkow et al., Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses *Virology Journal* 2010, **7**:143