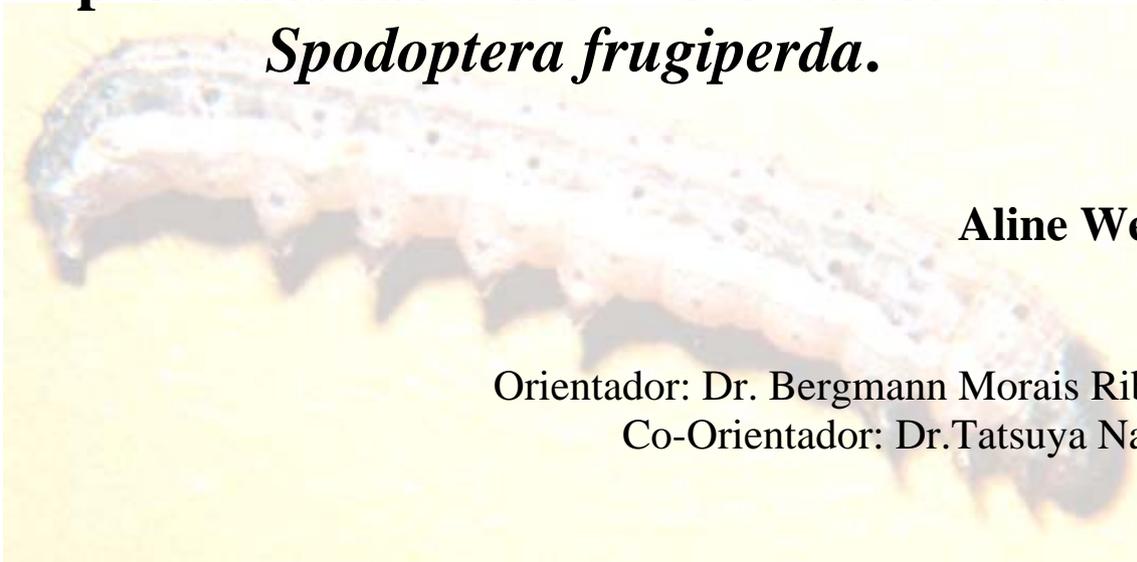




UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Baculovírus recombinantes contendo genes de
proteases são mais virulentos contra
Spodoptera frugiperda.**



Aline Welzel

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

**Dissertação 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
Mestre em Patologia Molecular.**

Brasília, 23 de março de 2006.



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

**Baculovírus recombinantes contendo
genes de proteases são mais virulentos
contra *Spodoptera frugiperda*.**

Aline Welzel

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

**Dissertação 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 Mestre
em Patologia Molecular.**

Brasília, 23 de março de 2006.

Trabalho realizado junto ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob orientação do Profº Ph.D. Bergmann Morais Ribeiro e Co-Orientação do Profº Ph.D. Tatsuya Nagata, e apoio institucional e financeiro do CNPq.

Aprovado por:

Dr. Bergmann Morais Ribeiro (orientador)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

Dra. Maria Elita Batista de Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Silene de Paulino Lozzi

Departamento de Genética e Morfologia

Universidade de Brasília

ÍNDICE

Figuras	vii
Tabelas.....	ix
Citações	x
Agradecimento a Deus.....	xi
Dedicatória	xii
Dedicatória	xiii
Oferecimento	xiv
Agradecimentos gerais	xv
Abreviaturas e símbolos	xvii
Resumo	xix
Abstract.....	xxi
1. Introdução.....	23
2. Revisão bibliográfica.....	26
2.1. Baculovírus.....	26
2.2. Modo de infecção <i>in vivo</i>	29
2.3. Regulação da expressão gênica	31
2.4. <i>Anticarsia gemmatalis</i> multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV).....	33
2.5. Baculovírus como vetor de expressão	35
2.6. Baculovírus recombinante para controle biológico.....	39
2.7. Proteases	42
2.7.1. Classificação	43
2.7.2. Queratinase	44
2.7.3. Catepsina-L.....	45
2.7.4. Quitinase.....	46

3. Objetivos.....	50
3.1. Geral	50
3.2. Específicos.....	50
4. Material e métodos	52
4.1. Vírus e células	52
4.2. Insetos.....	52
4.3. Construção dos vetores de transferência pSynCAT e p2100CAT contendo o gene da catepsina-L	53
4.4. Construção do vetor de transferência p2100QUERAT contendo o gene da queratinase.	54
4.5. Confirmação da construção do vetor de transferência pSynQUIT.	55
4.6. Transformação de células competentes por eletroporação e extração de DNA	56
4.7. Construção e purificação de baculovírus AcMNPV recombinantes (vSynCAT e vSynQUIT).....	58
4.8. Construção e purificação de baculovírus AgMNPV recombinantes (v2100CAT e v2100QUERAT)	59
4.9. Purificação e análise do DNA viral	60
4.10. Purificação de poliedros a partir de larvas infectadas	61
4.11. Análise transcricional (RT-PCR)	62
4.12. Bioensaios.....	63
4.13. Microscopia óptica	64
4.14. Ensaios de atividade proteolítica sobre substratos fluorogênicos	64
4.15. Detecção de atividade proteolítica em gel de poliacrilamida	66
5. Resultados.....	68

5.1. Construção do vetor de transferência contendo o gene da catepsina-L...	68
5.2. Construção do vetor de transferência contendo o gene da queratinase ...	75
5.3. Confirmação do clone pSynQUIT	75
5.4. Construção e purificação dos baculovírus AcMNPV recombinantes (vSynCAT e vSynQUIT).....	80
5.5. Construção e purificação do baculovírus AgMNPV recombinantes.....	81
5.6. Análise transcricional (RT-PCR)	83
5.7. Bioensaios.....	88
5.8. Análise estrutural dos tecidos das larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas pelos vírus AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT e vSynQUIT.....	94
5.9. Ensaio de atividade proteolítica sobre substratos fluorogênicos	96
5.10. Detecção de atividade proteolítica em gel de poliacrilamida	97
6. Discussão	99
7. Conclusões e perspectivas	108
8. Referências bibliográficas	109

FIGURAS

Figura 1: Foto mostrando uma larva de <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
Figura 2: Esquema mostrando os fenótipos virais característicos dos baculovírus.....	27
Figura 3: Esquema da infecção de uma larva de um inseto da ordem Lepidoptera por baculovírus, <i>in vivo</i> :.....	31
Figura 4: Foto de uma larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> morta pela infecção de um baculovírus.	34
Figura 5: Recipientes com dieta artificial utilizados nos bioensaios com <i>S. frugiperda</i>	64
Figura 6: Esquema de construção do vírus recombinante vSynCAT e vSynQUIT..	69
Figura 7: Confirmação da clonagem do gene <i>cathepsina-L</i> no plasmídeo pSynXIVX3+.	70
Figura 8: Esquema de construção do vírus recombinante v2100CAT e v2100QUERAT.	71
Figura 9: Confirmação da clonagem do gene <i>cathepsina-L</i> no plasmídeo p2100.....	72
Figura 10: Seqüência gênica da <i>cathepsina-L</i> de 1021 pb e 339 aminoácidos.....	73
Figura 11: Confirmação da clonagem do gene <i>queratinase</i> no plasmídeo p2100.....	76
Figura 12: Confirmação da clonagem do gene <i>quitinase</i> no plasmídeo pSynXIVX3+.	77
Figura 13: Seqüência gênica do pSynQUIT de 1275 pb e 424 aa.	78
Figura 14: Células de inseto infectadas com os diferentes baculovírus usados neste trabalho.	82
Figura 15: Seqüência gênica da <i>queratinase</i> de 1212 pb e 403 aa.....	83

Figura 16: Análise transcricional do gene <i>catapsina-L</i> em células de inseto infectadas com o recombinante vSynCAT.	86
Figura 17: Análise transcricional do gene <i>queratinase</i> em células de inseto infectadas com o recombinante vSynQUERAT (72 h.p.i.).	87
Figura 18: Análise transcricional do gene <i>queratinase</i> em células de inseto infectadas (72 h.p.i.) com o recombinante vSynQUIT.	88
Figura 19: Bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinantes (vSynCAT e vSynQUERAT) em larvas de <i>S. frugiperda</i>	90
Figura 20: Análise estrutural da cutícula de larvas de <i>S. frugiperda</i> observadas em um estereomicroscópio.	92
Figura 21: Bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinante (vSynQUIT) em larvas de <i>S. frugiperda</i>	93
Figura 22: Análise estrutural dos tecidos internos de larvas de <i>S. frugiperda</i> não infectadas (132 h.p.i.)	95
Figura 23: Atividade gelatinolítica do extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectado e infectado	98

TABELAS

Tabela 1: Alguns genes de baculovírus contendo motivos das diferentes fases de expressão gênica durante a infecção de células de inseto em cultura.	33
Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho.	66
Tabela 3: Dados dos três bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinantes (vSynCAT e vSynQUERAT).....	91
Tabela 4: Dados dos três bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinante (vSynQUIT) em larvas de <i>S. frugiperda</i>	94
Tabela 5: Atividade proteolítica de extrato celular não infectado e infectado com AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT	97

"É preciso pensar para acertar, calar para resistir e agir para vencer!"

(Renato Kehl)

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

(Luiz Fernando Veríssimo)

Agradeço a Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida.

"O Senhor é a minha luz e a minha salvação; de quem terei medo? O
Senhor é a fortaleza da minha vida; a quem temerei?"

Salmo 27:1

Aos meus queridos pais, Almiro e Silvia e minha querida irmã Alessandra,

*À vocês por toda a ternura e incentivo,
pela perseverança transmitida, pelos
esforços que jamais serão medidos, sempre
dando amparo e carinho, conduzindo ao
caminho para prosseguir. Quantas vezes
não tinha mais forças para continuar, mas
souberam como me ajudar jamais
permitindo que o desânimo dominasse.*

DEDICO

Ao meu amigo, conselheiro, companheiro, noivo Daniel,

Pela sua ajuda naqueles momentos tão difíceis pelo qual passei, quando precisei tanto de um apoio, de muito consolo e bastante conforto e foi justamente isto que recebi de você.

Agradeço suas palavras amigas, agradeço sua compreensão, agradeço sua ajuda incondicional, agradeço seu apoio moral, agradeço sua presença amiga, agradeço os mimos recebidos, agradeço por estar comigo em todos esses momentos tão importantes e por todo amor que recebi e continuo recebendo.

DEDICO

Aos meus orientadores Bergmann e Tatsuya

A vocês por todo o apoio recebido e aprendizado vivenciado em cada momento da minha formação profissional.

OFEREÇO

Agradecimentos gerais

A Deus que me proporcionou a vida e a realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela sua orientação, seus ensinamentos, sua paciência, crédito e por toda a contribuição para a minha formação acadêmica e profissional, meu muito obrigado!

Ao meu co-orientador Dr. Tatsuya Nagata, por toda a ajuda, receptividade e ensinamento prestado durante meu desenvolvimento profissional.

Aos meus pais, Almiro e Silvia, pela paciência, ajuda, ânimo, amor, experiência recebida, durante todos os momentos do meu desenvolvimento pessoal e profissional, meu obrigada com muito amor.

A minha irmã Alessandra, que muitas vezes de longe me deu palavras de incentivo e quando aqui de igual modo, me ajudando em tudo, meu obrigada de coração.

Ao meu querido e inseparável noivo Daniel, não tenho palavras para agradecer por Tudo! Agradeço por toda paciência, por passar fins de semana e noites me ajudando, mesmo nas horas mais difíceis, pelo amor sincero e verdadeiro. Amo você!

Ao meu futuro e futura sogra Heinz e Márcia por todo o apoio, correções, preocupação e pela casa oferecida quando foi necessário e aos meus futuros cunhados e cunhadas de igual modo sempre prontos a me ajudar.

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

Aos meus amigos de coração, Bianca, Carla, Eduardo por toda compreensão nos momentos que não pude sair, e pela confiança depositada. Aos meus tios, primos daqui de Brasília, meus amigos Hilda e Gildo, Camilo e Vitória, Cláudio e Sandra, Iara

e Hilário, ao pastor Renato e todas as pessoas do Estudo Bíblico da Igreja Evangélica Luterana.

Aos meus amigos da Universidade, Ana Paula, Andréa, Fabiana, Susan, Raquel, Bianca, Tâmia, Vanessa, Joaquim que sempre me incentivaram.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Ana Paula, Anabele, Susane, Maria, Tati, Thati, Nayara, Mari, Davi, Bruno, Dani, Cris pelo companheirismo nos Congressos. Por todos os almoços juntos, conversas, desabafos, aprendizado e ajuda prestada, meu muito obrigada, Susane (além dos cds, scanner e etc.), Maria (conversas confortadoras), Mari (nossa troca de experiência e amizade), Bruno (com as lagartas e dietas). Por toda a ajuda, agradeço ao Marcelo P., Marcelo D., Raimundo, Greice, Juliana, Cláudia, Victor, Simone, Myrce, Roberto, Hugo, Shélida, Carol, Leonora, Ramon, Mariana G., enfim a todos que me ajudaram nesse período.

À querida Érica, por toda a ajuda, pelas lagartas, pela amizade e receptividade quando precisei e pelos desabafos quando eram necessários.

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

Aos professores Silene e Jaime pela ajuda nos experimentos com proteases.

Ao Pinedo, por todas as sugestões e ajuda quando precisei.

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

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Alessandro, Hérika, Carol pela disposição de todos os esclarecimentos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

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

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMC	7-amino-4-metilcomarina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
dNTP	Deoxinucleotídeos
DTT	ditiotreitól
g	grama
h	hora
h.p.i.	horas pós-infecção
HCl	ácido clorídrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
KDEL	Possível sinal de localização no retículo endoplasmático (K -Lisina, D - ácido aspártico, E - ácido glutâmico e L - leucina).
L	litro
M	molar: mol/l
mg	miligrama
μ g	micrograma = 10^{-6} grama
mL	mililitro
μ L	microlitro = 10^{-6} litro
μ M	micromolar (micromol por litro)
min	minuto

mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosídeo
°C	grau Celsius

RESUMO

Os baculovírus são vírus de DNA, específicos de artrópodes, possuindo uma ampla utilização, principalmente, como bioinseticida em lepidópteros e como vetores de expressão de genes heterólogos. A habilidade do vírus *Autographa californica* multiple *nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) de infectar um grande número de hospedeiros tem facilitado estudos moleculares desse vírus com o objetivo de melhorar sua propriedade bioinseticida. Este trabalho teve por objetivo a construção de AcMNPV recombinantes com a introdução de um gene de uma protease (catepsina-L) e de uma quitinase no genoma viral, para a observação dos efeitos da infecção viral em larvas de *Spodoptera frugiperda*, comparativamente aos vírus AcMNPV selvagem e outro AcMNPV recombinante, contendo o gene de uma serino-protease (queratinase) de *Aspergillus fumigatus*. Outro objetivo do trabalho foi a construção de *Anticarsia gemmatalis* multiple *nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) recombinantes com a introdução dos genes das proteases catepsina-L e queratinase no genoma viral. Foram utilizados os vetores de transferência pSynXIVVI+X3 e p2100, respectivamente, para cada vírus. O DNA plasmidial dos vetores de transferência recombinantes foi co-transfectado com o DNA do vírus vSyngalVI- e do vAgGalA2, em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) e *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), respectivamente. Os isolamentos dos vírus recombinantes foram feitos com a técnica de diluição seriada em placa de 96 poços e a detecção dos vírus recombinantes se deu pela observação de poliedros nas células infectadas por meio da microscopia de luz. O vírus AcMNPV recombinante contendo o gene da catepsina-L (vSynCAT) assim como o AcMNPV recombinante contendo o gene da queratinase (vSynQUERAT) foram mais virulentos contra larvas de 3º e 4º instar de *S. frugiperda* quando comparados aos vírus selvagem e o vírus AcMNPV

recombinante contendo o gene da quitinase (vSynQUIT). Além disso, os vírus vSynCAT e vSynQUERAT induziram a melanização da cutícula dos insetos nos estágios mais tardios da infecção. Os AgMNPV recombinantes ainda não foram isolados e, desta forma, não foi possível analisar o efeito desses genes no genoma do baculovírus mais utilizado como bioinseticida no mundo.

ABSTRACT

Baculoviruses are DNA viruses specific to arthropods. They have been widely used as bioinsecticides against lepidopterous insect pests and as heterologous gene expression vectors. The ability of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) to infect a great variety of hosts, have facilitated molecular biology studies aiming the improvement of this virus as a biopesticide. The aim of this work is the construction of recombinant AcMNPV viruses with the introduction of a protease gene (cathepsin-L) from *Sarcophaga peregrina* and a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*, into the viral genome and observation of the effects of these recombinant viruses during the infection of *Spodoptera frugiperda* larvae, comparatively with the wild-type AcMNPV and another AcMNPV recombinant, containing a serino-protease (keratinase) gene from *Aspergillus fumigatus*. Another aim of this work was the construction of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses containing the cathepsin-L and keratinase genes into the viral genome. The pSynXIVVI+X3 e p2100 transfer vectors were used, respectively for each virus. Recombinant transfer vectors DNAs were co-transfected with DNA from polyhedrin minus vSynGalVI- and vAgGalA2 viruses, in *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) and *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) cells, respectively. Isolation of the recombinant viruses was carried out using the serial dilution method in 96 well-plates and was achieved by the observation of polyhedra inside infected cells under a light microscope. The AcMNPV recombinant containing the cathepsin-L gene (vSynCAT), as well as the AcMNPV recombinant containing the keratinase gene (vSynQUERAT), were more virulent towards 3^o and 4^o instar *S. frugiperda* larvae, when compared to the wild-type AcMNPV and a AcMNPV

recombinant containing the kitinase gene (vSynQUIT). Furthermore, the vSynCAT and vSynQUERAT viruses induced melanization of insect cuticle late in infection. The AgMNPV recombinants have not been isolated yet, and therefore, it was not possible to analyse the effect of the introduction of these genes on the virulence of the world most used baculovirus biopesticide.

1. INTRODUÇÃO

Existem, em todo o mundo, perdas significativas na agricultura por ataque de insetos. Eles representam importante fator que afeta a planta e a semente, podendo reduzir a produção da cultura, caso não seja efetuado algum tipo de controle da população do inseto-praga (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 desequilíbrio ecológico, sendo danosos ao meio ambiente e à saúde humana, demandando alto investimento financeiro. Ao longo do tempo, o solo torna-se empobrecido e mais susceptível ao ataque de pragas e doenças.

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. 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). Eles 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 alli.*, 1998; Szewczyk *et alli.*, 2006).

Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (Souza *et alli.*, 2002). Eles têm sido estudados como agentes de controle biológico desde a década de 60 (Payne, 1986). Eles 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).

Os baculovírus possuem muitas vantagens na sua utilização, pois são 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*), tratando-se por volta de dois milhões de hectares de plantação de soja no País (Moscardi, comunicação pessoal, desenvolvido pela Embrapa Soja, Londrina, PR. Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatalis*, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja e causam prejuízos consideráveis à medida que crescem. 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 alli.*, 2002).

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

produção em até 34%. Muitos hectares já foram tratados com *S. frugiperda* MNPV (*SfMNPV*), produzido na forma de pó molhável (Valicente & Cruz, 1991) (Figura 1).



Figura 1: Foto mostrando uma larva de *Spodoptera frugiperda*. Adaptado de <http://insects.tamu.edu/images/insects/color/ind3.html>.

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

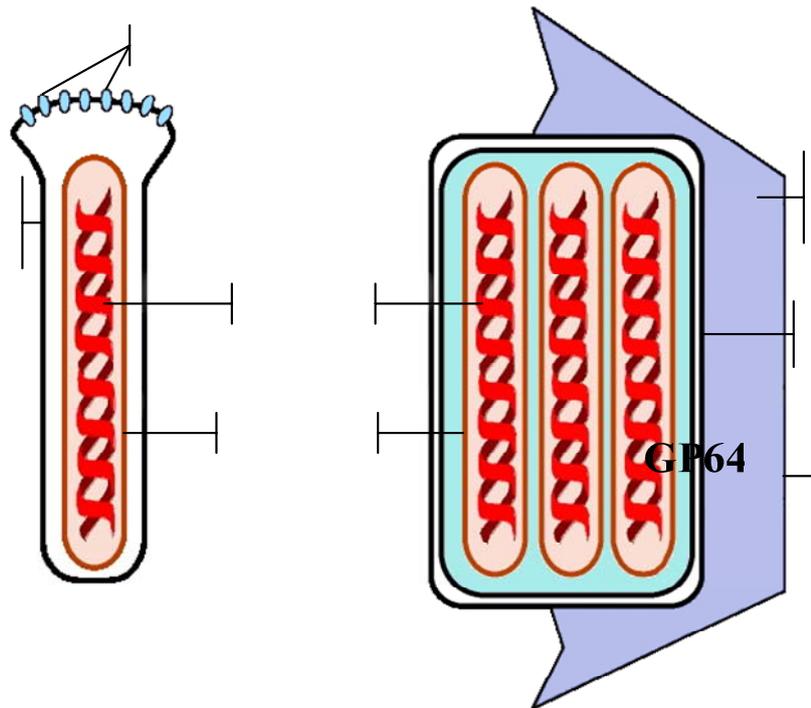
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. 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 alli*, 1999), vetores de expressão (Luckow & Summers, 1988; O'Reilly *et alli*, 1992; Richardson, 1995; Bonning & Hammock, 1996; Jarvis *et alli*, 1997) e possíveis vetores de terapia gênica (Tani *et alli*, 2003). 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 biossegurança em relação aos inseticidas químicos (Castro *et alli*, 1999).

São vírus com DNA de dupla fita, circular, *supercoiled*, pertencentes à família *Baculoviridae*, possuindo um vírion com envelope em formato de bastão (báculo), contendo no seu genoma entre 80 e 200 kilobases (kb) (Arif, 1986). O nome *Baculoviridae* tem origem a partir da palavra latina *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma das partículas virais desta família (Fields, 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 OB, vírus

ocluso ou corpos de oclusão (OB do inglês *occlusion bodies*) (Smith *et alli.*, 1983), sendo responsável pela transmissão horizontal do vírus de inseto a inseto (Figura 2).



Envelope da célula hospedeira

Figura 2: Esquema mostrando os fenótipos virais característicos dos baculovírus. A: Vírus extracelular ou BV (*budded virus*). B: Vírus ocluso ou OB (*occlusion bodies*). Adaptado de <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html>.

DNA do vírus

Até 1995, essa família era taxonomicamente dividida em duas subfamílias: *Eubaculovirinae*, que incluía os vírus oclusivos (NPV - vírus de poliedrose nuclear, e GV - vírus de granulose) e *Nudibaculovirinae*, os vírus não-oclusivos (NOV) (Frazer *et al.*, 1991). A classificação atual do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus divide a família *Baculoviridae* em apenas dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, composto pelos NPV, e *Granulovirus*, compreendendo os GV (Murphy *et alli.*, 1995; Van Regenmortel *et alli.*, 2000).

Vírus extracelular - BV

Os baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* são também denominados de *nuclear polyhedrosis viruses* (vírus da poliedrose nuclear-NPV) e os *Granulovirus*, *granulosis viruses* (vírus da granulose-GV) (Ribeiro *et alli.*, 1998). Os NPV possuem corpos de oclusão poliédrica (PIB), também chamados de poliedros variando de 0,15 a 15 µm em diâmetro (Bilimoria, 1991) e contendo vários vírions. Sua principal proteína é denominada poliedrina, com peso molecular em torno de 30.000 daltons (Summers *et alli.*, 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; Van Regenmortel *et alli.*, 2000), 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, pois apenas uma linhagem de células de inseto foi descrita (CpDW), até o momento, como capaz de suportar a replicação de um GV (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 500 espécies hospedeiras documentadas para esse tipo de vírus (Miller, 1997) 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 tipo II (Zanotto *et alli.*, 1993).

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 (Van Regenmortel *et alli.*, 2000).

2.2. Modo de infecção *in vivo*

A principal rota natural de infecção pelos baculovírus é pela ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída, o OB (poliedro ou grânulo, dependendo do gênero). Os OB estão presentes em uma matriz cristalina, protegidos da degradação ambiental, são dissolvidos em ambiente altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) do intestino médio da larva do inseto, liberando as partículas virais, 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 dessa progênie viral da infecção primária é estabelecida a infecção secundária, ou seja, outros tecidos são infectados (Volkman *et alli.*, 2000). O DNA 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 (Volkman *et alli.*, 2000). 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, o

nucleocapsídeo brota da membrana nuclear para o citoplasma, perde o envelope e adquire um novo envelope ao sair da célula por brotamento (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 para as células-alvo, promovendo a fusão do envelope com as membranas vesiculares endocíticas (Engelhard *et alli.*, 1994) (Figura 3). A infecção em insetos da ordem Lepidoptera geralmente se espalha rapidamente para outros tecidos e o inseto morre em poucos dias. Quando a larva do inseto infectada pelo vírus morre, 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).

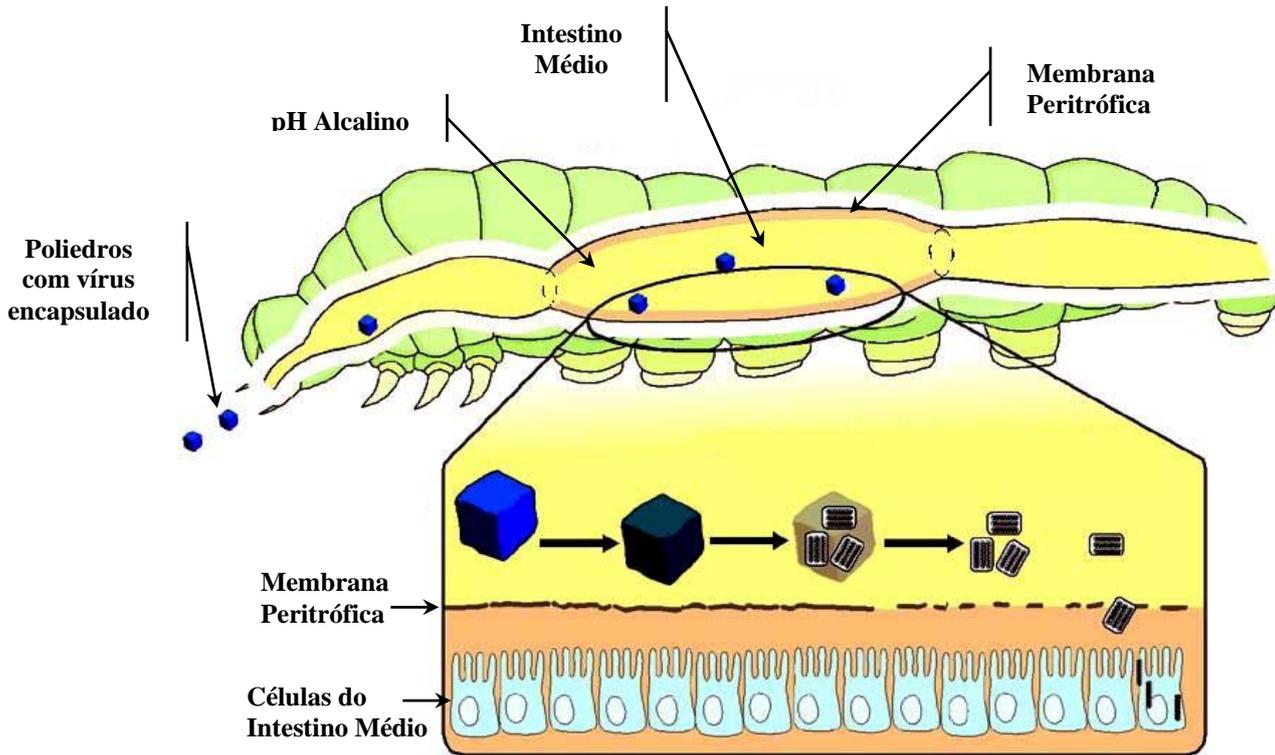


Figura 3: Esquema da infecção de uma larva de um inseto da ordem Lepidoptera por baculovírus, *in vivo*: O inseto ingere o poliedro (OB), que eventualmente havia sido liberado no meio ambiente, por um outro inseto morto por infecção causada por baculovírus. O poliedro é, então, dissolvido no intestino médio, pela ação do pH alcalino, liberando as partículas virais. Com a ruptura da membrana peritrófica, o vírus pode então infectar células colunares inicialmente e, em seguida, partindo para a infecção de outros tipos celulares, como traqueócitos e hemócitos. Adaptado de www.micr.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html.

2.3. Regulação da expressão gênica

A expressão gênica dos baculovírus pode ser dividida em duas fases distintas: fase precoce (“early”) e fase tardia (“late”) (Tabela 1). Podem existir ainda subdivisões representadas pelas fases imediata precoce (“immediately early”), correspondendo a genes expressos logo nas primeiras horas de infecção, e muito tardia (“very late”), representando os genes expressos após 24 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 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 alli.*, 1998). Os genes tardios estão envolvidos na montagem do vírus e os genes muito tardios no processo de oclusão (Jarvis *et alli.*, 1996; Thiem *et alli.*, 1996; Lu & Miller, 1997).

Os genes expressos durante a fase precoce, a partir de 30 min após a infecção (p.i.) e até aproximadamente 8 h 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, expressos rapidamente (Pasarelli & Miller, 1993; Xu *et alli.*, 1995; Todd *et alli.*, 1996; Guarino *et alli.*, 1998; Gross & Shuman, 1998). Os genes expressos 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).

Tabela 1: Alguns genes de baculovírus contendo motivos de promotores das diferentes fases de expressão gênica durante a infecção de células de inseto em cultura (Pang *et alli.*, 2001; Herniou *et alli.*, 2001, 2003; Cheng *et alli.*, 2002; Willis *et alli.*, 2005).

Genes precoces	<i>ie-0, ie-1, ie-2, dnapol, helicase, egt, lef 1, lef-2, lef-3, lef-4, lef-5, lef-8, lef-9, lef-11, p47, pe38, 35k, 38k,3 gp41, gp64, iap, vlf-1</i>
Genes tardios	<i>25k, gp16, p6.9, p26, p34, p35, p48, p51, vp39, vp80, vp91</i>
Genes muito tardios	<i>p10, polh</i>

2.4. *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV)

O baculovírus mais estudado até hoje é o *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), sendo considerado espécie-tipo do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (Van Regenmortel *et alli.*, 2000). Também foi o primeiro baculovírus a ser seqüenciado (Ayes *et alli.*, 1994). No Brasil, o baculovírus mais utilizado como bioinseticida é o AgMNPV. É o maior programa 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) (Lepidóptera: Noctuidae), foi desenvolvido a partir do final da década de 70 e início da década de 80 pela Embrapa Soja, Londrina, PR (Figura 4). 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. Como citado anteriormente, a área total tratada no País é superior a 2 milhões de ha de soja (Moscardi, comunicação pessoal). 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 alli.*, 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 4: Foto de uma larva de *Anticarsia gemmatalis* morta pela infecção de um baculovírus. Adaptado de www.embrapa.gov.br/.

O genoma do AgMNPV foi recentemente seqüenciado e apresentado no Encontro Nacional de Virologia de 2004 (Wolff *et alli.*, 2004). Esse genoma possui 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 seqüência e organização genômica com os vírus *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus (CfDEFMNPV)

(Wolff *et alli.*, 2004), *Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) e *Choristoneura fumiferana* multiple nucleopolyhedrovirus (CfMNPV). Depois da publicação da seqüência do genoma do AgMNPV será possível analisar com detalhes a origem desse vírus e o seu grau de parentesco com outros baculovírus. O mapa físico do genoma já havia sido determinado anteriormente por Johnson e Maruniak (1989) e, antes do seqüenciamento completo do genoma, apenas alguns genes tinham sido seqüenciados e caracterizados, como o gene *ecdisteróide udp-glicosil transferase (egt)*, responsável pela inibição do hormônio ecdisona, ativador da muda do inseto, fazendo com que o inseto infectado permaneça no estágio larval (Rodrigues *et alli.*, 2001; Pinedo *et alli.*, 2003). Outros genes caracterizados incluem: *polh*, *p10*, *gp41*, *ie-1*, *gp64*; *helicase*, *v-trex*, *dnapol* e *iap-3* (Zanotto *et alli.*, 1992; Razuck *et alli.*, 2002; Liu & Maruniak, 1999; Pilloff *et alli.*, 2003; Slack *et alli.*, 2004; Lima *et alli.*, 2004; Slack & Shapiro, 2004; Carpes *et alli.*, 2005; Dalmolin *et alli.*, 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 alli.*, 1977; Sieburth & Maruniak, 1988; Castro *et alli.*, 2006) e BTI-Tn5B1-4 (Granados *et alli.*, 1994).

2.5. Baculovírus como vetor de expressão

O conhecimento sobre o genoma dos baculovírus permitiu um estudo mais detalhado de seus genes e promotores e sua utilização. Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetor de expressão foram publicados por Smith *et alli.*, (1983 b) e Pennock *et alli.*, (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 alli.*, 1992; Jarvis, 1997; e Ribeiro *et alli.*, 1998, 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; e
9. alta especificidade dos baculovírus, que os torna um sistema seguro de ser utilizado.

O sistema de expressão de proteínas heterólogas usando baculovírus baseia-se na introdução de genes do genoma de um baculovírus 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 conseqüência, 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 da poliedrina é conduzida a partir de um promotor forte, pois, por volta de 70 h após a infecção, 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 da poliedrina (*polh*) (Miller *et alli.*, 1983; Smith *et alli.*, 1983 a, b).

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 alli.*, 1992).

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 alli.*, 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 alli.*, 1999).

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 tipo selvagem do DNA circular para este processo tem sido 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 alli.*, 1990; Airene *et alli.*, 2003). Outro método é a recombinação em *Escherichia coli*, a qual utiliza sítios de transposição com Tn7 para inserir genes no locus do gene da poliedrina e no meio do gene *lac-Z*, que codifica a enzima β -galactosidase (Lac-Z) no DNA de um bacmídeo (genoma viral) 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 alli.*, 1993). Outra estratégia é a recombinação homóloga em levedura entre o genoma do baculovírus e um vetor de transferência que contém um segmento de DNA de levedura. Células de inseto transfectadas com DNA isolado das colônias selecionadas de levedura produzem vírus e expressem o gene sob o comando do promotor da poliedrina, mostrando ser um sistema eficiente para se isolar recombinantes virais (Luckow *et alli.*, 1993) e recombinação *in vitro* (Ernst *et alli.*, 1994).

2.6. Baculovírus recombinante para controle biológico

A utilização de baculovírus como agente de controle biológico nas lavouras, atualmente, possui dificuldades em alguns fatores que interferem no seu uso em campo, como a inativação do vírus pela radiação solar, o substrato onde o mesmo é depositado, o momento da aplicação, a temperatura, a qualidade e quantidade de inóculo e a baixa velocidade 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 patogenicidade viral 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 de agentes de controle de pragas (Bonning *et alli.*, 2002; Van Beek & Hughes, 1998).

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 pelas pragas de insetos. Alguns dos mais efetivos baculovírus recombinantes expressam neurotoxinas específicas para inseto (Smith *et alli.*, 2000; Treacy *et alli.*, 2000; Van Beek & Hughes, 1998). Em hospedeiros susceptíveis, estas neurotoxinas, expressas pelos vírus, reduzem os danos à lavoura e a LT_{50} estimada para 25-50% quando comparado às larvas infectadas com o vírus selvagem (Cory *et alli.*, 1994; McCutchen *et alli.*, 1991; Stewart *et alli.*, 1991; Tomalski & Miller, 1992; Treacy *et alli.*, 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), tendo sua função na

paralisação do inseto. No entanto, essa toxina não aumentou a eficiência do baculovírus recombinante (Carbonell *et alli.*, 1988).

Genes da toxina Cry da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) foram inseridos em baculovírus (Merryweather *et alli.*, 1990, Pang *et alli.*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993; Ribeiro *et alli.*, 1998; Martens *et alli.*, 1995; Chang *et alli.*, 2003), demonstrou que tanto a infectividade quanto o modo de ação de seu vírus recombinante, expressando Cry1Ac, foram aumentados significativamente quando comparado ao vírus selvagem no controle de *Plutella xylostella*.

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 alli.* (1990) inseriram o gene da esterase do hormônio juvenil (JHE) de *Heliothis virescens* no genoma do AcMNPV sobre o comando do promotor da poliedrina (*polh*), resultando em uma diferença significativa comparado com o vírus selvagem. O mesmo aconteceu com o promotor do gene *p10* (Bonning, *et alli.*, 1992; Roelvink *et alli.*, 1992), promotor do gene *p6.9* (Bonning, *et alli.*, 1994), e com um promotor híbrido baseado no gene *polh* (Eldridge *et alli.*, 1992).

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, 1996). 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 alli.*, 2000; Imai *et alli.*, 2000), aranhas (Prikhod'ko *et alli.*, 1998), anêmonas do mar (Prikhod'ko *et alli.*, 1998) e ácaros (Tomalski & Miller, 1991; Hughes *et alli.*, 1997; Burden *et alli.*, 2000) foram também expressas usando baculovírus, mostrando, também, redução no tempo letal dos vírus recombinantes.

Os baculovírus produzem uma proteína, Ecdisteroide UDP-Glicosil Transferase (EGT), que inativa o hormônio da muda do inseto (O'Reilly & Miller, 1989; Rodrigues *et alli.*, 2001). A deleção ou inativação desse gene resulta em redução do tempo letal e do dano econômico à lavoura (O'Reilly & Miller, 1989; Pinedo *et alli.*, 2003). Esse exemplo demonstra a utilidade de deleção de um gene para melhorar o tempo de morte do 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).

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 da poliedrina (*polh*), foi construído. Esse recombinante mostrou uma velocidade maior de morte contra a larva de *S. frugiperda*, quando comparado ao vírus selvagem (Gopalakrishnan *et alli.*, 1995).

Mais recentemente, o gene de uma serino-protease (queratinase) do fungo *Aspergillus fumigatus* foi introduzido no genoma do AcMNPV sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*) modificado. Bioensaios com o vírus recombinante

mostraram que o tempo médio de morte foi reduzido, quando comparado com o vírus selvagem (Perecmanis, 2004).

2.7. 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, microorganismos e vírus (Rao *et alli.*, 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 de retrovírus e regulação da expressão gênica (Santos, 1996; Rao *et alli.*, 1998; Bressolier *et alli.*, 1999; Rawlings *et alli.*, 2002).

2.7.1. 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 alli.*, 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 alli.*, 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 seqüência 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 alli.*, 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 alli.*, 1998).

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

2.7.2. 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 alli.*, 2002; Rao *et alli.*, 1998).

Essas 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 alli.*, 2003).

As serino-proteases também desempenham papel importante em muitos processos biológicos como desenvolvimento (Nakajima *et alli.*, 1997) e imunidade (Gorman *et alli.*, 2000a, b, Munier *et alli.*, 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 alli.*, 1998; Gorman & Paskewitz 1999, Gorman *et alli.*, 2000 a, Yan *et alli.*, 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 alli.*, 1998, Yan *et alli.*,

2001, Nakazawa *et alli.*, 2004). Uma serino-protease de *B. mori* mostrou atividade antiviral contra BmNPV no início da infecção viral (Nakazawa *et alli.*, 2004).

A queratinase do fungo *A. 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 alli.*, 1992; Markaryan *et alli.*, 1994; Moser *et alli.*, 1994), serino-proteases fibrinogenolíticas (Larcher *et alli.*, 1992) e colagenases (Monod *et alli.*, 1993), que estão envolvidas em muitos eventos-chaves na fisiopatologia de *A. fumigatus* (Santos *et alli.*, 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 alli.*, 2002; Kolattukudy *et alli.*, 1993; Kothary *et alli.*, 1984).

2.7.3. 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 alli.*, 1986; Kornfeld, 1987; Kornfeld *et alli.*, 1989; Brown *et alli.*, 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 alli.*, 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 alli.*, 1993). Mais tarde, essa protease foi identificada como a enzima catepsina-L (Yarygin *et alli.*, 2003). Essa protease foi também identificada na cultura de células da mosca *S. peregrina* (Homma *et alli.*, 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 (Basement Membranes- BM) (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 subseqüentemente 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 alli.*, 1994; Ishido & Kominami, 1998).

2.7.4. 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 o derretimento 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).

Quitinases de alguns patógenos de insetos têm sido utilizadas para aumentar sua patogenicidade (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003). Alguns micróbios entomopatogênicos produzem quitinases para penetração no corpo hospedeiro (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Gooday, 1999) e baculovírus, que produzem quitinases para liquefazer o corpo do hospedeiro depois da morte devido à infecção (Hawtin *et alli.*, 1995, 1997).

Quitinases de lepidópteros têm sido purificadas, como da *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 alli.*, 1993; Kim *et alli.*, 1998; Mikitani *et alli.*, 2000; Shinoda *et alli.*, 2001; Zheng *et alli.*, 2002).

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um patógeno de inseto bem conhecido e estudado, usado em escala moderada como controle biológico de muitas pragas na China, Rússia e Brasil (Gillespie *et alli.*, 1988). *M. anisopliae* produz distintas serino-proteases extracelulares, como as proteases subtilisinas, tripsinas, metaloproteases, bem como muitas exo-peptidases, que acreditam ser importantes na degradação da cutícula do hospedeiro (St. Leger *et alli.*, 1995, 1996 a). A quitinase do fungo *M. anisopliae*, utilizada neste trabalho, 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 fator principal na penetração da cutícula comparado com proteases (St. Leger *et alli.* 1991). Como as proteases, as quitinases parecem ser determinantes patogênicos (Charnley *et alli.*, 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 alli.*, 1996 b).

Um estudo imunohistoquímico da quitinase de *C. fumiferana* (Zheng *et alli.*, 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).

Através do 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 alli.*, 1995). O AcMNPV causa liquefação nas larvas infectadas pela expressão do gene de uma quitinase (Ayres *et alli.*, 1994; Hawtin *et alli.*, 1995) e do gene de uma catepsina- *cath* (Rawlings *et alli.*, 1992; Slack *et alli.*, 1995). 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 alli.*, 1997; Thomas *et alli.*, 1998, 2000). A desintegração do inseto infectado pelo AcMNPV é vantajosa, pois permite uma disseminação máxima de poliedros no ambiente (Saville *et alli.*, 2004). No genoma do AcMNPV, a quitinase está localizada entre os genes *lef-7* e *cath* (Rawlings *et alli.*, 1992; Ayres *et alli.*, 1994; Hawtin *et alli.*, 1995). A enzima tem seu nível de expressão máxima com atividade de endoquitinase e exoquitinase a 12 h.p.i (Hawtin *et alli.*, 1995; Thomas *et alli.*, 1998).

Saville *et alli.* (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 *Trichoplusia ni* infectadas com o

vírus modificado possuem um tempo de liquefação menor comparado com o vírus controle, sem a deleção de KDEL.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho visou a construção de baculovírus AcMNPV e AgMNPV recombinantes com a introdução de genes de proteases (catepsina-L e queratinase) e de uma quitinase no genoma viral, visando testar a patogenicidade dos recombinantes contra insetos-praga.

3.2. Específicos

1. Clonagem do gene *catepsina-L* de *S. peregrina*, no vetor de transferência pSynXIVVI+X3;
2. Clonagem do gene *quitinase* de *M. anisopliae* no vetor de transferência pSynXIVVI+X3;
3. Clonagem dos genes *catepsina-L* de *S. peregrina* e *queratinase* de *A. fumigatus* no vetor de transferência p2100;
4. Construção dos baculovírus recombinantes AcMNPV, contendo os genes *catepsina-L* e *quitinase*;
5. Construção dos baculovírus recombinantes AgMNPV, contendo os genes *catepsina-L* e *queratinase*;
6. Análise da expressão dos genes *catepsina-L*, *queratinase*, *quitinase* em células de inseto infectadas com os vírus recombinantes;
7. Avaliação da patogenicidade dos baculovírus recombinantes vSynCAT, vSynQUIT para larvas de *S. frugiperda*;

8. Análise estrutural dos tecidos de larvas de *S. frugiperda* infectadas pelos vírus AcMNPV selvagem e recombinantes;
9. Observação dos efeitos da infecção viral em larvas de *S. frugiperda*; e
10. Avaliação da atividade proteolítica e da atividade gelatinolítica sobre substratos fluorogênicos dos diferentes baculovírus recombinantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vírus e células

O baculovírus selvagem *A. californica* L-1(AcMNPV), o vírus recombinante vSynGalVI-, derivado do AcMNPV com o gene do *lac-Z* no lugar da poliedrina (Lee & Miller, 1978), o baculovírus selvagem *A. gemmatalis* (AgMNPV, isolado 2D) (Johnson & Maruniak, 1989), o vírus recombinante vAgGalA2, derivado do AgMNPV que possui o gene repórter *lacZ* sobre o comando do promotor da poliedrina (*polh*) (Ribeiro *et alli.*, 2001), o vírus recombinante vSynQUERAT, derivado do AcMNPV que possui o gene *queratinase* de *A. fumigatus* sob o comando dos promotores *pSyn* e *pXIV* (Perecmanis, 2004) e os recombinantes construídos neste trabalho foram propagados em células *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth & Maruniak, 1988) e/ou de *T. ni* (BTI-Tn5B1-4), em cultura (Granados *et alli.*, 1994). As células foram mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

4.2. Insetos

Larvas de *S. frugiperda* foram utilizadas para a realização dos bioensaios com inoculação de BV ou para produção de poliedros. As larvas criadas em dieta artificial foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Elita Batista de Castro, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4.3. Construção dos vetores de transferência pSynCAT e p2100CAT contendo o gene da catepsina-L

O gene da catepsina-L de *S. peregrina* foi amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para a protease (Prot F e R, Tabela 2) e o DNA do plasmídeo pKYH5 (gentilmente cedido pelo Dr. Robert Harrison, da Iowa State University, USA). O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1min, 53°C/1min 30 s, 72°C/1min 30 s uma extensão final de 72°C/7 min.

O fragmento amplificado foi, então, clonado no vetor pGEM-T (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O plasmídeo pGEMCAT contendo o gene foi digerido com *Nco* I (Invitrogen) e *Not* I (Promega). O fragmento de DNA da digestão foi separado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e o fragmento de 1.100 pb, correspondente ao gene da catepsina-L, foi visualizado com a coloração do gel em brometo de etídio (0,1µg/ml). A banda correspondente foi purificada 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 5847 pb, que possibilita a inserção do gene heterólogo sob o comando de dois promotores em tandem (*pSyn* e *pXIV*) (Wang *et alli*, 1991), digerido com *Sma* I (Amersham) e defosforilado, segundo o protocolo do fabricante (Promega). A ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5α para obtenção do plasmídeo pSynCAT, que foi utilizado para a construção do baculovírus recombinante, seguindo o protocolo de eletroporação (Sambook & Roussel, 2001) e conforme

instruções do fabricante (Gene Pulser II, Biorad), descrito no subitem 4.6. A clonagem também pôde ser confirmada com a realização de reação de PCR com os oligonucleotídeos Prot F e ORF 603 (Tabela 2). O programa da PCR utilizado para a amplificação foi o mesmo descrito acima para os oligonucleotídeos Prot F e Prot R.

O plasmídeo pSynCAT foi também digerido com *Sac* I e *Eco* RV (Pharmacia) para liberação do fragmento de 1.100 pb da catepsina-L, juntamente com o promotor *pXIV* (cassete gênico – *pXIV-CATL*); em seguida foi realizada a reação de Klenow (Pharmacia) e ligado ao vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005), que foi utilizado para a construção do baculovírus AgMNPV recombinante, previamente digerido com a enzima de restrição *Eco* RV (Invitrogen) e defosforilado segundo o protocolo do fabricante (Promega), através do kit de ligação rápida (Promega). A ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5 α para obtenção do plasmídeo p2100CAT, seguindo o protocolo de eletroporação (Sambook & Roussel, 2001) e conforme instruções do fabricante (Gene Pulser II, Biorad), descrito no subitem. A clonagem pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR com os oligonucleotídeos Prot F e p pol AcAg R (Tabela 2). O programa da PCR utilizado para a amplificação já foi mencionado anteriormente nesse mesmo subitem.

4.4. Construção do vetor de transferência p2100QUERAT contendo o gene da queratinase

O gene da queratinase de *A. fumigatus*, juntamente com o promotor *pXIV* foi retirado do plasmídeo pSynquerat (Perecmanis, 2004) através da digestão com as enzimas de restrição *Sac* I e *Eco* RV (Pharmacia). O fragmento de DNA da digestão foi separado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e o fragmento de 1.200 pb,

correspondente ao cassete gênico (*pXIV-querat*), foi visualizado sob luz UV com a coloração do gel em brometo de etídio (0,1µg/ml). A banda correspondente foi purificada 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, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e o fragmento ligado ao plasmídeo p2100 (Hallwass, 2005) previamente digerido com a enzima de restrição *Eco* RV (Invitrogen) e defosforilado segundo o protocolo do fabricante (Promega), através do kit de ligação rápida (Promega), conforme descrito no subitem 4.3. A ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5α para obtenção do plasmídeo p2100QUERAT, que foi utilizado para a construção do baculovírus AgMNPV recombinante, seguindo o protocolo de eletroporação (Sambook & Roussel, 2001) e conforme instruções do fabricante (Gene Pulser II, Biorad), descrito no subitem 4.6. A clonagem também pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR com os oligonucleotídeos *Sph* I F pol Ag e *Pst* I R pol Ag (Tabela 2). O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1min 30 s, 50°C/1min 30 s, 72°C/1min 30 s uma extensão final de 72°C/7 min.

4.5. Confirmação da construção do vetor de transferência pSynQUIT

O plasmídeo pSynQUIT, contendo o gene da quitinase de *M. anisopliae*, foi gentilmente cedido pelo Dr. José Luiz Caldas Wolff, da Universidade de Mogi das Cruzes, e utilizado para a construção do baculovírus recombinante vSynQUIT. Uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos ORF 603 e pol R Ac (Tabela 2), foi conduzido para confirmação da inserção do gene no plasmídeo. O programa da PCR

utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1min, 53°C/1min 30 s, 72°C/1min 30 s uma extensão final de 72°C/7 min.

4.6. Transformação de células competentes por eletroporação e extração de DNA

Para a realização deste procedimento, fez-se o uso de células de *E. coli* cepa DH5 α competentes para eletroporação. Estas células foram previamente preparadas, seguindo o protocolo de Sambrook & Russell (2001) e estocadas a -80°C. A ligação foi dialisada em membrana de nitrocelulose 0,025 μ m, 13 mm (Millipore) por 15 min.

As condições de eletroporação foram: capacitância de 25 μ F; resistência de 200 Ω ; voltagem de 1.80 KV. O eletroporador utilizado foi Bio-Rad Gene Pulser II. Foi aliqotado 1,5 μ l do DNA ligado no vetor em um tubo de 1,5 mL que continha 50 μ l de células DH5 α eletro-competentes, foi incubado no gelo por 5 min e então transferido para uma curveta específica para eletroporação, Gene Pulser Curvette (Bio-Rad). A mensuração da corrente elétrica foi anotada. Em seguida, foi adicionado à curveta 1 mL de meio de cultura SOC (NaCl 0,5g/L; Triptona 2g/L; Extrato de Levedura 5g/L; KCl 250 mM 10 mL; MgCl₂ 2M 5 mL; Glicose 1M 20 mL), misturado delicadamente e transferido para um tubo estéril. O tubo contendo o meio SOC e células foi incubado com agitação de 240 r.p.m. por 1 h a 37°C.

Enquanto transcorria o intervalo de incubação, placas de Petri contendo meio LB-ágar com ampicilina (100 μ g/mL) foram preparadas. Quando utilizado o vetor de clonagem pGEM-T (Promega), foi aplicado 40 μ l de X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside) a 20 mg/mL e 10 μ l de IPTG (Isopropylthio-B-D-

Galactoside) a 200 mg/mL, sendo estes distribuídos no meio sólido com auxílio de uma laça de Drigalski e secos à temperatura ambiente.

Depois da incubação, o tubo foi centrifugado a 3000 r.p.m. por 5 min em uma microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C). Descartaram-se 800µL do sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado no meio restante. Cem µL de células foram plaqueadas em meio L-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina. Incubou-se a 37°C, durante a noite. As colônias de *E. coli* crescidas em meio L-ágar, contendo ampicilina, foram inoculadas em tubo de ensaio, contendo 5 mL de meio LB mais ampicilina (100µg/mL), e incubados por 16 h a 37°C sob agitação (200 r.p.m.). Uma alíquota de 1 mL das colônias foi transferida para um tubo de microcentrífuga, a amostra foi centrifugada a 13.000 r.p.m. em uma microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C) por 2 min, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 20 µL de água deionizada milli-Q autoclavada, o mesmo volume de fenol-clorofórmio foi adicionado ao tubo e misturado vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 14.000 r.p.m. em uma microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C) por 5 min e 10µL da fase superior, contendo o DNA plasmidial, foi coletada e usada para análise em gel de agarose 0,8%. As colônias que apresentavam DNA plasmidial com tamanho superior ao fragmento derivado do plasmídeo vetor de clonagem foram selecionadas e o DNA plasmidial foi purificado, utilizando o protocolo de lise alcalina em pequena escala, descrito por Sambrook *et alli.*, 1989.

4.7. Construção e purificação de baculovírus AcMNPV recombinantes (vSynCAT e vSynQUIT)

Células BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 células) foram transferidas para uma placa de 35 mm de diâmetro por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. O DNA do plasmídeo pSynCAT (1 μ g) ou pSynQUIT (1 μ g) e do vírus vSyngalVI- (0,5 μ g) (previamente linearizado com a enzima *Bsu* 36I, conforme instruções do fabricante, New England BioLabs) foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, em uma placa de 35 mm de diâmetro. Dez microlitros de LipoFectin (Invitrogen) foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura de células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos e a placa incubada à temperatura ambiente por 3 h. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C, por sete dias. Dentro das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre regiões flanqueadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vSyngalVI-, que flanqueiam o gene da β -galactosidase e o genoma circular. O DNA viral vSyngalVI- possui um único sítio de restrição para a enzima *Bsu* 36I dentro da fase aberta de leitura (orf) do gene da β -galactosidase e, como esse vírus não tem o gene *polh*, não ocorre formação de poliedros durante a infecção de células de inseto. Além disso, o vírus vSyngalVI-, digerido com a enzima *Bsu* 36I, não é infectivo, pois seu genoma está na forma linear, que não é infectiva para células de inseto (Kitts *et alli.*, 1990; O'Reilly *et alli.*, 1992). Desta forma, após a recombinação homóloga, somente o vírus recombinante estará na forma circular e infectiva, facilitando o isolamento do recombinante. Os vetores pSynCAT e pSynQUIT possuem, além dos gene *cathepsina-L*

e quitinase, o gene *polh* que, na recombinação homóloga entre o DNA plasmidial e o DNA viral, é re-introduzido no genoma do vírus vSynGalVI-, produzindo um vírus com poliedros. O sobrenadante das células transfectadas (sete dias após a co-transfecção) foi usado para isolar os vírus recombinantes vSynCAT e vSynQUIT pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly *et alli* (1992). Quatro e três, respectivamente, ciclos de isolamento em placa de 96 poços foram necessários para o isolamento dos vírus recombinantes vSynCAT e vSynQUIT e a sua identificação se deu pela presença de poliedros no núcleo das células infectadas.

4.8. Construção e purificação de baculovírus AgMNPV recombinantes (v2100CAT e v2100QUERAT)

Células de UFL-AG-286 (1×10^6 células) foram transferidas para uma placa de 35 mm de diâmetro por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. O DNA do plasmídeo p2100CAT e p2100QUERAT (1 μ g) e do vírus vAgGalA2 (0,5 μ g) foram diluídos em 100 μ l de meio TC-100 sem soro, em uma placa de 35 mm de diâmetro. Nove microlitros de Cellfectin (Invitrogen) foram diluídos em 100 μ l de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 30 min à temperatura ambiente. O meio de cultura de células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos e a placa incubada à temperatura ambiente por 3 h. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C, por sete dias. Dentro das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre regiões flanqueadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vAgGalA2 (possui o gene *lac-Z* no lugar do gene *polh*). O sobrenadante das células transfectadas (sete dias

após a co-transfecção) foi usado para isolar os vírus recombinantes do baculovírus AgMNPV pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly *et alli* (1992). Os isolamentos dos vírus recombinantes v2100CAT e v2100QUERAT ainda estão em andamento.

4.9. Purificação e análise do DNA viral

Para purificação do DNA viral foi seguido o protocolo descrito em O'Reilly *et alli* (1992). Células de UFL-AG-286 e/ou BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 / placa de 35 mm) foram infectadas com os vírus vSyngalVI-, vAgGalA2 e recombinantes. Cento e sessenta e oito h.p.i., o sobrenadante foi coletado procedendo-se com a purificação de BV em pequena ou larga escala. Em pequena escala, o sobrenadante foi centrifugado a 3.000 r.p.m por 2 min, para baixar as células. Fez-se o descarte do *pellet* (células) e o sobrenadante foi centrifugado a 14.000 r.p.m. por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado no tampão “vírus disruption buffer” (10mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 0,25 % SDS), acrescido de proteinase K na concentração de 500 µg/mL e incubado a 37°C por pelo menos 16 h. O DNA viral foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e 2,5 x o volume inicial de etanol absoluto e incubado a -20°C por 24 h. Na seqüência, a mistura foi centrifugada a 14.000 r.p.m. por 10 min e o *pellet* lavado com 100 µL de etanol 70%. O DNA foi ressuscitado em 20 µL de água milli-Q e utilizado nas reações de PCR para confirmação da identidade e pureza do vírus recombinante. Em larga escala, o sobrenadante viral (33ml) foi adicionado a tubos de ultracentrifuga de 38 mL (Pollyalomer, Beckman) e injetado 3 ml de colchão de sacarose (25% sacarose p/p em 5 mM NaCl e 10mM EDTA) no fundo do tubo. O

restante do volume foi completado com PBS. Os tubos foram centrifugados a 24.000 r.p.m. (rotor SW 28, Beckman L8-70M) por 75 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado completamente e o sedimento, contendo os vírus, foi ressuscitado em 1,0 mL no tampão “vírus disruption buffer” e o procedimento foi concluído conforme já descrito anteriormente para o método em pequena escala.

4.10. Purificação de poliedros a partir de larvas infectadas

Larvas de *S. frugiperda*, no terceiro ou quarto instar, foram inoculadas com \pm 10-15 μ L do estoque de BV do vírus selvagem AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT com ajuda de uma seringa de 1 mL e alimentadas com uma dieta artificial preparada segundo Hoffmann Campo *et alli* (1985), modificado a partir de Greene *et alli* (1976). Ao morrerem, as larvas foram congeladas até seu uso para purificação de poliedros. O procedimento ocorreu segundo Maruniak (1986), com pequenas modificações. Extratos de larvas de *S. frugiperda*, mortas pelos vírus, foram macerados com tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%, SDS 2%, Tris 0,01 M pH 8,0, EDTA 0,001 M). O macerado foi filtrado com três camadas de gaze e posteriormente centrifugado a 12.000 r.p.m. a 4°C por 12 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 20 mL de TE. Em seguida, 5 mL do material, com concentração final de 30mg/ml, foi aplicado sobre gradientes de sacarose variando de 1,17 g/mL a 1,30 g/mL e centrifugados a 24.000 r.p.m. em uma ultracentrífuga Sorvall OTD-75B (rotor AH627) (4°C) por 40 min e uma banda contendo poliedros foi coletada com ajuda de uma pipeta Pasteur, diluída quatro vezes em TE, centrifugada a 12.000 r.p.m. em uma ultracentrífuga Sorvall OTD-75B (rotor AH627) (4°C) por 15 min, o *pellet* ressuscitado em água milli-Q e armazenado a -20°C.

4.11. Análise transcricional (RT-PCR)

Células BTI -Tn5B1-4 (1×10^6 / placa de 60 mm) foram infectadas com 10 unidades formadoras de placa (pfu) /célula do vírus recombinantes vSynCAT, vSynQUERAT e vSynQUIT. Setenta e duas horas pós-infecção (h.p.i.), o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 8.000 r.p.m. por 2 min em uma microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C). Fez-se o descarte do sobrenadante e o sedimento foi usado para a extração do RNA total com 375 μ L de Trizol® LS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado usando o oligonucleotídeo T1 (Tabela 2) (Rodrigues *et alli*, 2001), e o Kit M-MLV-RT, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). A partir do cDNA obtido, foi feita uma reação de PCR para amplificar o cDNA correspondente ao RNA mensageiro dos genes da catepsina, queratinase e quitinase. Para isto, foi utilizado um oligonucleotídeo específico para cada gene (RTCat, RTQuerat e o RTQuit, respectivamente, Tabela 2) e um outro oligonucleotídeo que substitui o T1 (de baixa temperatura de anelamento) chamado de T2 (Rodrigues *et alli*, 2001), e que possui a seqüência dos primeiros 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1 (Tabela 2) (Rodrigues *et alli*, 2001). Para a reação de PCR foram utilizados 2,5 μ L do tampão 10 X da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 μ L da mistura dos quatro dNTPs (10 mM cada), 1,0 μ L de $MgCl_2$, 1,0 μ L do oligonucleotídeo T2 e 1,0 μ L do RTCat, RTQuerat e 0,5 μ L do oligonucleotídeo RTQuit (T2, RTCat, RTQuerat = 10 μ M, RTQuit = 20 μ M), 1 μ L do cDNA respectivo, três unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água milli-Q para um volume final de 25 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação da *catepsina* foi: 80°C/1 min, 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min 30 s, 72°C/1min 30 s uma extensão final de 72°C/7 min; e para os genes *queratinase* e *quitinase* foi : 80°C/1 min, 94°C/5 min, 30 ciclos de

94°C/1min 30 s, 50°C/1min 30 s, 72°C/1min 30 s uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose a 0,8% e 1,2%.

Para confirmação do resultado, os fragmentos obtidos foram precipitados, utilizando-se 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e 2,5 x o volume inicial de etanol absoluto e digerido com enzima de restrição *Eco RI* (Promega) para os genes *queratinase*, *quitinase* e *catepsina*. O resultado da digestão foi resolvido por eletroforese em gel de agarose a 0,8% para *quitinase* e *catepsina* e 1,2 % para *queratinase*.

4.12. Bioensaios

Trinta larvas de *S. frugiperda* entre o 3º e 4º instar (para cada vírus) foram utilizadas para a inoculação via hemolinfa, com o auxílio de uma seringa de 1 ml, em um volume de 10-15 µl do estoque (aproximadamente 1×10^6 pfu) de BV dos vírus AcMNPV, vSynQUERAT, vSynCAT, 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 (Figura 5) e observadas duas vezes por dia até a sua morte.

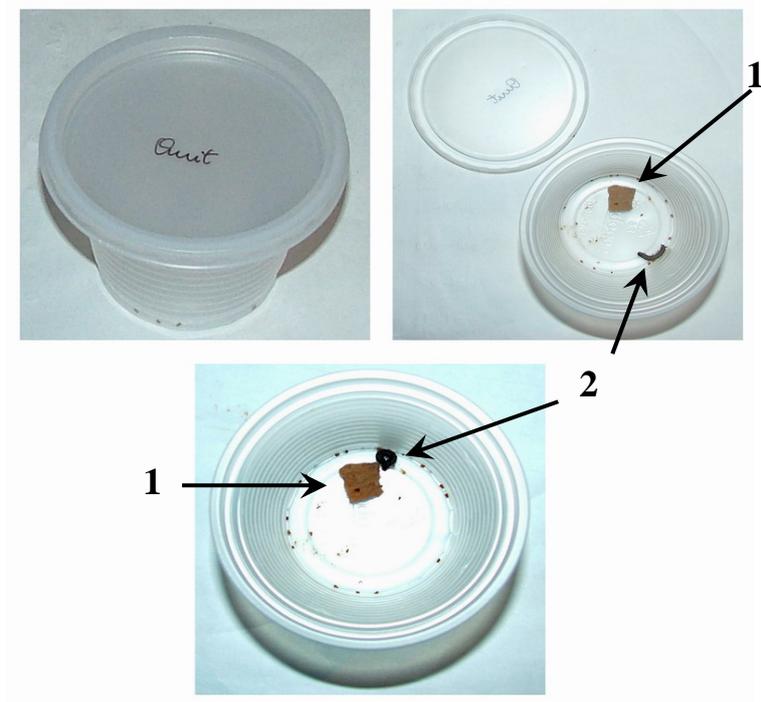


Figura 5: Recipientes com dieta artificial utilizados nos bioensaios com *S. frugiperda*.

1- Dieta; 2- *S. frugiperda*.

4.13. Microscopia óptica

Larvas de *S. frugiperda* foram inoculadas conforme descrito no subitem 4.13 e foram utilizadas para dissecação, sendo abertas no dorso, da cabeça ao fim do abdômen, para a exposição do tubo intestinal e outros órgãos, sendo analisadas e fotografadas em um estereomicroscópio (Stemi SV 11, Zeiss). A larva não infectada foi utilizada como controle, mock.

4.14. Ensaios de atividade proteolítica sobre substratos fluorogênicos

Células BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 células/ placa de 35 mm) foram infectadas com AcMNPV, vSynQUERAT, vSynCAT, vSynQUIT e células não infectadas, mock,

utilizadas como controle. Setenta e duas horas pós-infecção (h.p.i.), as células foram ressuspensas e centrifugadas a 8.000 r.p.m. por 5 min em uma microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C), repetindo-se até não ter mais células. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl de tampão Na₂PO₄ 100 mM pH 7.0 (1,30 g de Na₂H PO₄, 0,80 g de NaH₂PO₄ em 150 ml de água destilada). Em seguida, as células foram submetidas a 37°C/5 min e ao nitrogênio líquido/5 min por três vezes e estocadas a -80°C.

Testou-se a atividade do extrato celular não infectado e infectado com AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT sobre os peptídeos fluorogênicos Leucina-7-amido-4-AMC (L-AMC) para AcMNPV, vSynCAT e mock, N-Succinil-Gly-Pro-7-amido-4-AMC (N-GP-AMC) para AcMNPV, vSynQUERAT e mock, Z-Phe-Arg-AMC para AcMNPV, vSynCAT e mock, R-AMC para AcMNPV, vSynQUERAT e mock, também foi utilizado um controle (branco, apenas com substrato e tampão). Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados, adicionando-se 10 µl do extrato celular, 20 µl de cada um dos substratos na concentração de 20 µM e 70 µl, do tampão Na₂PO₄ 100 mM pH 7.0 e o branco, sem extrato celular. Em seguida, houve a incubação dos tubos a 37°C/30 min, e a reação enzimática foi interrompida pela adição de 400 µl de etanol absoluto. A leitura da fluorescência emitida foi feita em espectrofluorômetro HITACHI F-2000 através da excitação a 380 nm e absorbância de 440 nm dos substratos que possuíam 7-amido-4-metilcoumarina. Todos os substratos fluorogênicos foram obtidos da Sigma®. O experimento foi feito em duplicata e os resultados expressam a média obtida em unidade arbitrária de fluorescência - U (Tabela 5).

4.15. Detecção de atividade proteolítica em gel de poliacrilamida

Para detecção e análise da atividade proteolítica da catepsina-L, queratinase e quitinase sobre gelatina, a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, polimerizado em presença de gelatina (1,5%) e sob condição desnaturante na ausência de fervura da amostra como descrito por Santana (1993). Após a eletroforese, cada gel foi lavado três vezes com Triton X-100 2,5% (Sigma) e incubado com tampão acetato pH 4.5, DTT 1mM e EDTA 0,1 mM sob agitação lenta a temperatura ambiente por 12 h. A degradação proteolítica da gelatina foi constatada mediante coloração do gel por azul de Coomassie.

Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Utilidade/ Posição
Prot R	5'-GAATTCAATTGAAAAAGGCAG-3'	PCR/ Posição a 1300 nucleotídeos do início do gene (ATG) da catepsina-L.
Prot F	5'-CCACCAGCAACCATCACCTTAAGCTTTAACAC-3'	PCR/ Posição a 155 nucleotídeos do início do gene (ATG) da catepsina-L. Em itálico sítio de <i>Hind</i> III.
pol Ac R	5'-CAACAACGCACAGAATCTAG-3'	PCR/Nucleotídeos 4867 a 4887 no genoma do AcMNPV, após o gene de poliedrina.
ORF 603	5'-CAGCCATTGTAATGAGACG-3'	PCR/Nucleotídeos 3930 a 3950 do genoma do baculovírus AcMNPV, no início da ORF603.
<i>Sph</i> I F pol Ag	5'-GCATGCCGCTGTGCATGGTTAAAA-3'	PCR/Posição a -829 nucleotídeos do início do gene (ATG) da poliedrina no genoma do AgMNPV.
<i>Pst</i> I R pol Ag	5'-CTGCAGGGATTTTGGGTGTGTT-3'	PCR/ Posição a + 1265 nucleotídeos do início do gene (ATG) da poliedrina no genoma do AgMNPV.

p pol AcAg R	5'-CATCACTTCTTGTTTACAATGGGGAAGCTGTCTTG-3'	PCR/ Posição 348 a 310 nucleotídeos do início do gene (ATG) da poliedrina no genoma do AcMNPV ou AgMNPV.
RTCat	5'-GGTGGTTTAATGGACAATGC-3'	RT-PCR/ Posição a +751 nucleotídeos do início do gene (ATG) da catepsina.
RTQuerat	5' -CACTGCCACCAACACCATCT-3'	RT-PCR/Posição a +1019 nucleotídeos do início do gene (ATG) da queratinase.
RTQuit	5'-CTCCTCAAGAAAGCGAACCG-3'	RT-PCR/ 950 nucleotídeos antes do códon de terminação do gene da quitinase.
T1	5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	RT-PCR/Cauda de Poli-A.
T2	5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTT-3'	RT-PCR/idêntico aos primeiros 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1 .

5. RESULTADOS

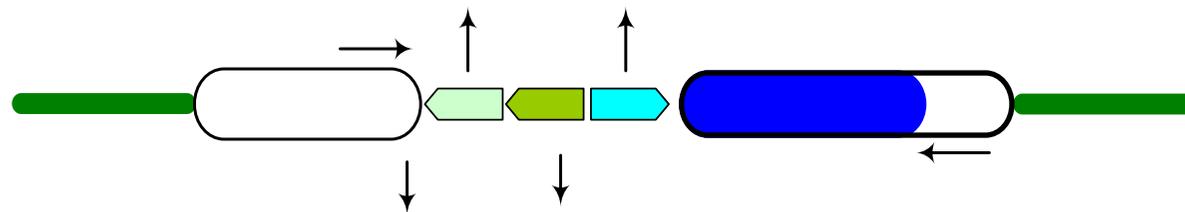
5.1. Construção do vetor de transferência contendo o gene da catepsina-L

O gene da catepsina-L de *S. peregrina* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pKYH5 e clonado no vetor pGEM-T, formando o plasmídeo pGEMCAT. Para a clonagem do gene *catepsina-L*, no vetor de transferência pSynXIVVI+X3, o plasmídeo pGEMCAT foi digerido com *Nco* I e *Not* I (dados não mostrados), e o fragmento de 1.100 pb foi tratado com T₄ DNA polimerase para completar os finais coesivos e ligado ao vetor pSynXIVVI+X3, formando um novo plasmídeo, denominado pSynCAT, ilustrado na figura 6.

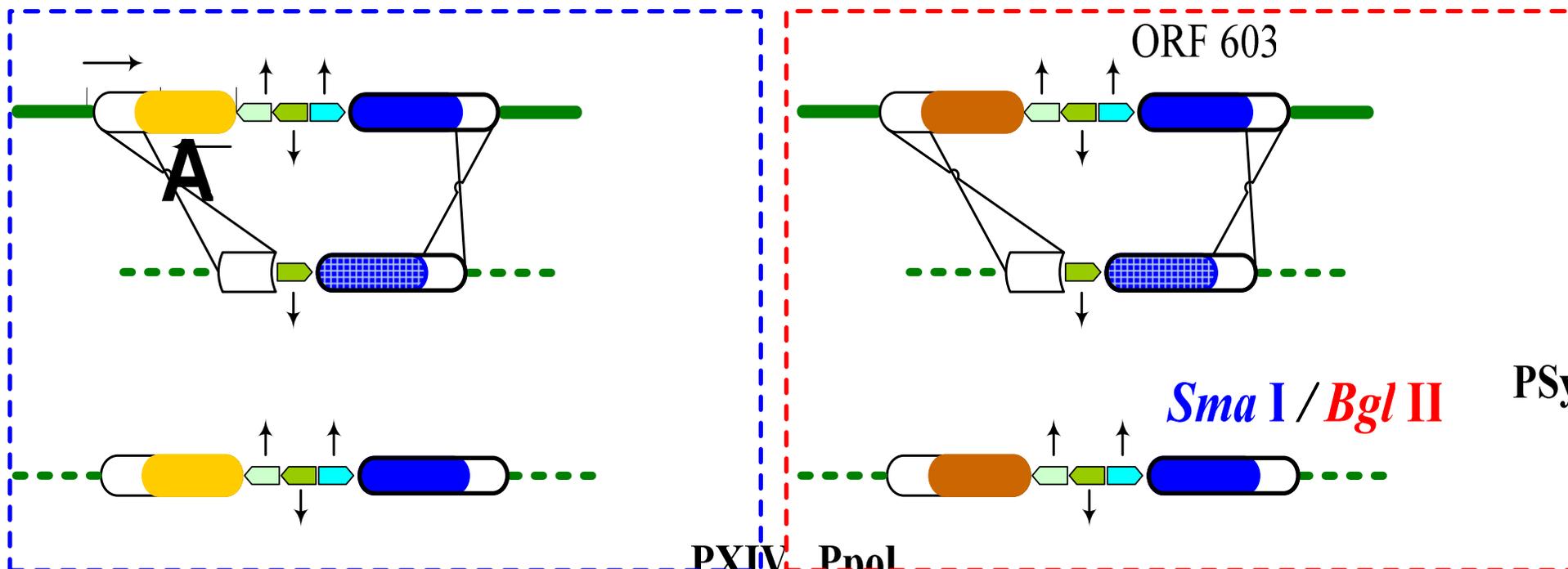
A construção do plasmídeo pSynCAT pôde ser confirmada em gel de agarose 1% pela digestão do plasmídeo com a enzima de restrição *Eco* RI, ocorrendo a liberação dos fragmentos de 852 pb e 293 pb e pela amplificação por PCR com os oligonucleotídeos Prot F e ORF 603 (Figura 7, 10 e Tabela 2).

O gene *catepsina-L* foi também ligado a outro vetor de transferência, o p2100 (Hallwass, 2005). Desse modo, o plasmídeo pSynCAT foi digerido com *Sac* I e *Eco* RV, o fragmento de 1.100 pb foi também tratado com T₄ DNA polimerase para completar os finais coesivos e ligado ao vetor p2100, previamente digerido com a enzima *Eco* RV, formando um novo plasmídeo, denominado p2100CAT, conforme ilustrado na figura 8.

A construção do plasmídeo p2100CAT pôde ser confirmada em gel de agarose 0,8% através do produto de amplificação de PCR do gene *catepsina-L* com os oligonucleotídeos Prot F e p pol AcAg R (Figura 9, 10 e Tabela 2).



PXIV



pSynC

Prot R

PXIV

Pol

Eco RI

Eco RI

Eco RI

B

CAT

Pol

pSynC

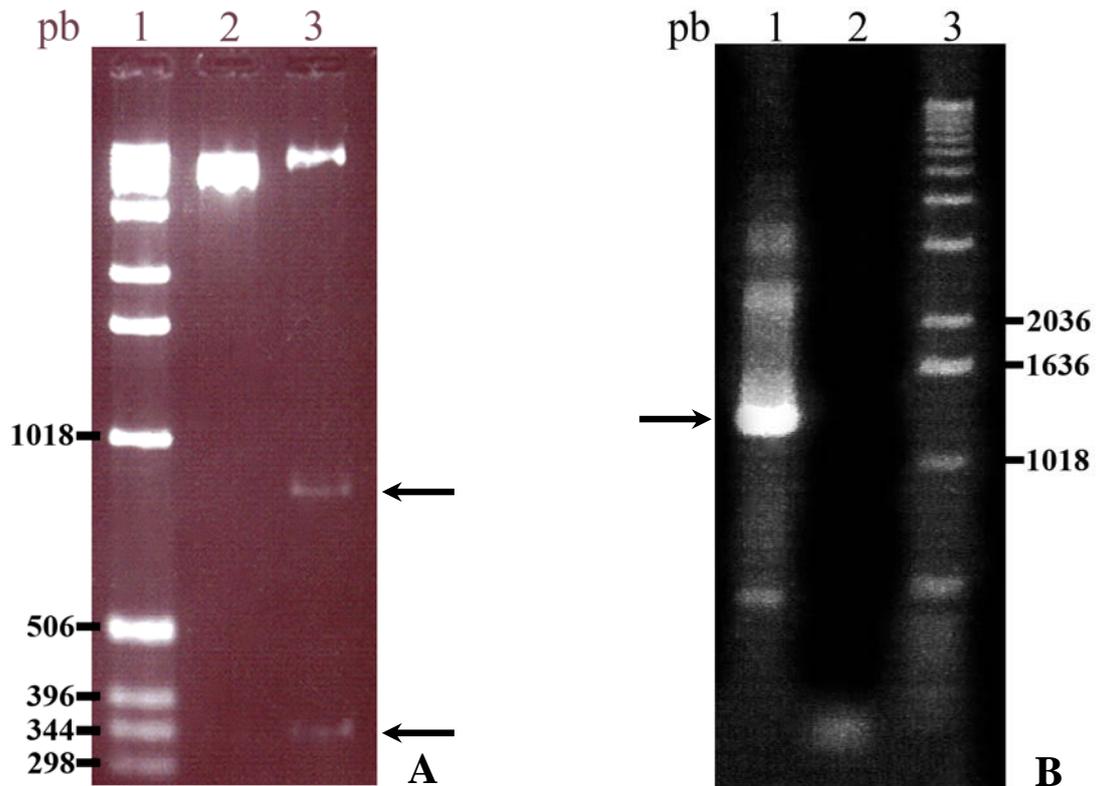
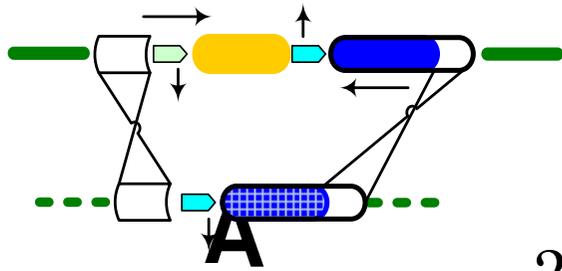
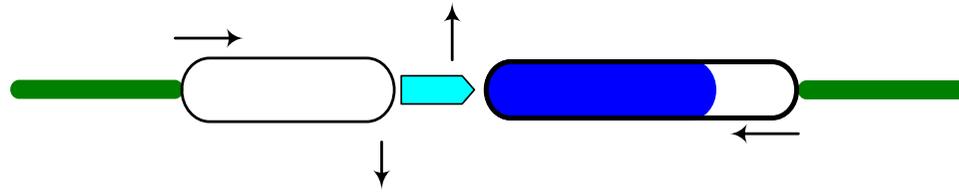
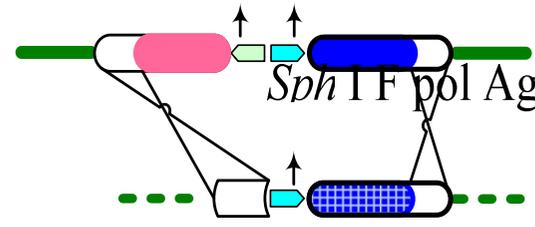


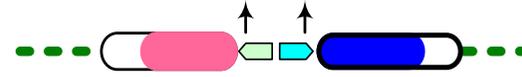
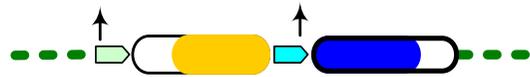
Figura 7: (A) Confirmação da clonagem do gene *catepsina-L* no plasmídeo pSynXIVX3+. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando o plasmídeo pSynCAT digerido com a enzima de restrição *Eco* RI (poço 3). As setas indicam os fragmentos de 852 pb e 293 pb derivados do gene da *catepsina-L*, poço 2, pSynXIVX3+ linearizado pela digestão com a enzima *Sma* I. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com produto de amplificação de PCR do gene *catepsina-L* para confirmação da orientação do gene. Poço 3, Marcador 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), poço 1, fragmento de PCR amplificado a partir do plasmídeo pSynCAT, com os oligonucleotídeos Prot F e ORF 603; mostrando o tamanho esperado de aproximadamente 1.400 pb, referente ao gene *catepsina-L*, conforme indicado pela seta, poço 2, produto da reação de PCR controle, sem DNA.



?



?



Eco RV

Prot F

Ppol

B

CAT

Pol

⁷¹
p2100CAT

Ppo

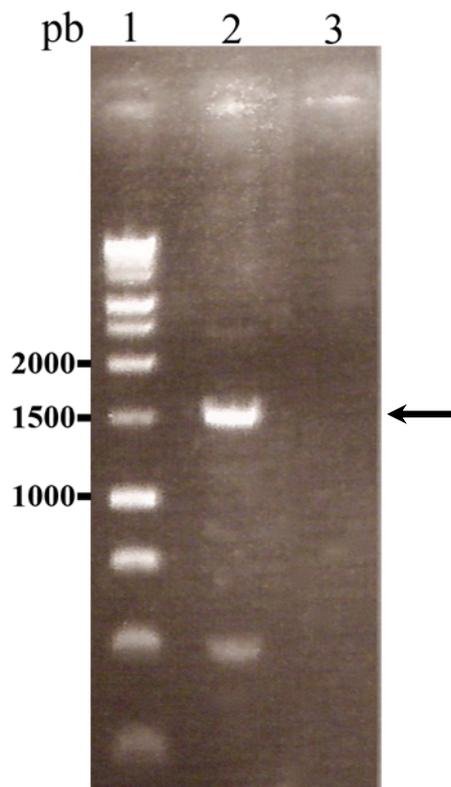


Figura 9: Confirmação da clonagem do gene *catepsina-L* no plasmídeo p2100. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com produto de amplificação de PCR do gene *catepsina-L*, poço 1, Marcador 1 Kb DNA Ladder (Promega), poço 2, p2100CAT, com oligonucleotídeos Prot F e p pol AcAg R, com fragmento de aproximadamente 1600 pb referente ao gene *catepsina-L*, promotor da *polh* e uma parte do gene da *polh*, conforme indicado pela seta, poço 3, controle, sem DNA.

Catepsina-L

-64

CATTTATTTCAACTTGAAA

Primer Prot F



-45 CCATACATCA**CCACCAGCAACCATCACCTTAAGCTT**TAACACAAA

1 **atg**cgtacagtattagtagccctattggctctggtagccctaacc

M R T V L V A L L A L V A L T

46 caagcaatatctccactagatccttatcaaagaggaatggcataca

Q A I S P L D L I K E E W H T

91 tataagttgcaacaccgtaaaaactatgccaacgaagtggaagaa

Y K L Q H R K N Y A N E V E E

136 cgtttccg**atg**aaaattttcaatgaaaatcgtcacaagattgcc

R F R **M** K I F N E N R H K I A

181 aaacataatcaattgtttgctcaaggcaaagtaagctataagctg

K H N Q L F A Q G K V S Y K L

226 ggcttgaataaatatgccgac**atg**ttacatcacgaattcaaagaa

G L N K Y A D **M** L H H E F K E

271 acc**atg**aatggttataatcacactttacgtcaattg**atg**cgtgaa

T **M** N G Y N H T L R Q L **M** R E

316 agaactggtttggttggtgccacctacattcctccagcacatggt

R T G L V G A T Y I P P A H V

361 actgtaccCAAATCGGTGGATTGGCGGAACATGGTGCTGTCACC

T V P K S V D W R E H G A V T

406 ggtgttaaagatcagggccattgCGGTTcAtgctgggccttctct

G V K D Q G H C G S C W A F S

451 tctaccGGCGCCTTAGAGGGACAACATTTCCGCAAAGCTGGTGTA

S T G A L E G Q H F R K A G V

496 ttggtatcattaagtgaacAAAacttggtcgattgttccacAAA

L V S L S E Q N L V D C S T K

Primer RTCat →

541 tacggcaataatggttgcaat**ggtggtttaatggacaatgc**tttc
 Y G N N G C N G G L **M** D N A F

586 cgttatattaaggataatggcggattgatactgaaaaatcttat
 R Y I K D N G G I D T E K S Y

631 ccttatgagggtattgatgattcgtgccattttaacaaagccacc
 P Y E G I D D S C H F N K A T

676 attggtgccaccgatactggtttcgttgatatacccgaaggtgat
 I G A T D T G F V D I P E G D

721 gaagaaaa**atg**aagaaggccgttgccact**atg**ggccctgtatcc
 E E K **M** K K A V A T **M** G P V S

766 gtagccattgatgcttcgcacgagtctttccaattgtacagcgaa
 V A I D A S H E S F Q L Y S E

811 ggtgtatacaatgaacccgaatgtgacgagcaaaacttgatcat
 G V Y N E P E C D E Q N L D H

856 ggtgttttggttggtggctatggcaccgatgagagtggc**atggac**
 G V L V V G Y G T D E S G **M** D

901 tattggttggttaagaactccttggggcaccacctggggcgaacia
 Y W L V K N S W G T T W G E Q

946 ggttacatcaag**atg**gctcgtaatcaaaataaccaatgtggcatt
 G Y I K **M** A R N Q N N Q C G I

991 gctactgcctccagttatccaactgtt**taa**AAGGAATTTATCATT
 A T A S S Y P T V *****

1036 CAATTTTTTTAATCATTTTACTACGCCACTCTTATCAAATATGTT

1081 ATGTTCTTAGTTTAT**CTGCCTTTTCAATTGAATTC** 1117
Eco RI

Primer Prot R ←

Figura 10: Sequência gênica da catepsina-L de 1021 pb e 339 aminoácidos. A partir dessa sequência foram desenhados oligonucleotídeos (Prot F, Prot R e RTCat) para a amplificação do gene da catepsina-L e a realização da reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos e a sequência em que eles correspondem estão em vermelho e os sítios de restrição em itálico e azul e o início do gene e o término em rosa.

5.2. Construção do vetor de transferência contendo o gene da queratinase

Para a clonagem do gene queratinase de *A. fumigatus*, no vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005), o plasmídeo pSynQuerat (Perecmanis, 2004) foi digerido com *Sac* I e *Eco* RV, o fragmento de 1.200 pb foi tratado com T₄ DNA polimerase e ligado ao vetor p2100, previamente digerido com *Eco* RV, formando um novo plasmídeo, denominado p2100QUERAT, conforme ilustrado na figura 8.

A construção do plasmídeo p2100QUERAT pôde ser confirmada em gel de agarose 1% (Figura 11) e pela amplificação com os oligonucleotídeos *Sph* I F pol Ag e *Pst* I R pol Ag, observados na tabela 2 e na figura 11. Na PCR observa-se um fragmento de aproximadamente 2.000 pb para o p2100 e de 3.100 pb para p2100Querat, representando a diferença da clonagem do gene queratinase (Figura 11).

5.3. Confirmação do clone pSynQUIT

O plasmídeo pSynQUIT, (Figura 6) contendo o gene da quitinase de *M. anisopliae*, pode ser visualizado em gel de agarose 0,8% através do vetor de transferência pSynXIVVI+X3, mais o gene *quitinase* e pela amplificação por PCR com os oligonucleotídeos ORF 603 e pol R Ac (Figura 12, 13 e Tabela 2). Na reação de PCR observa-se um fragmento de aproximadamente 1.200 pb para o pSynXIVVI+X3 e de 2.800 pb para pSynQUIT e vSynQUIT, que é a soma do fragmento de 1.600 pb contendo o gene mais 1.200 da região do plasmídeo pSynXIVVI+X3 (Figura 12).

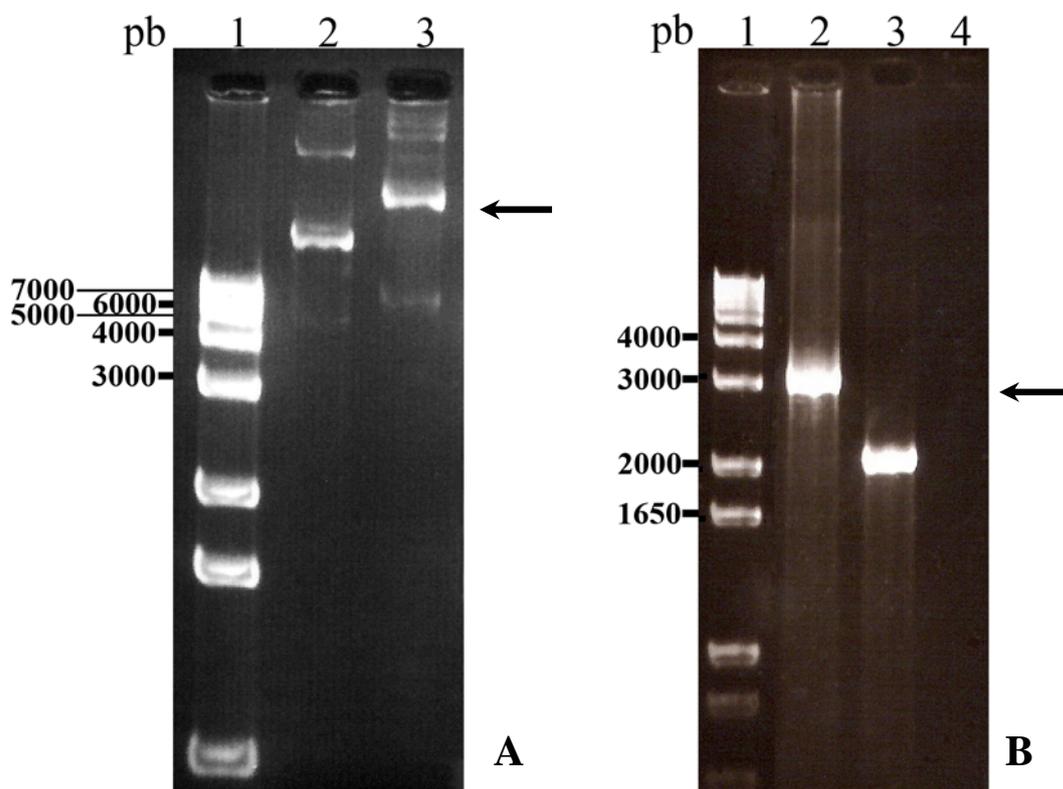


Figura 11: (A) Confirmação da clonagem do gene *queratinase* no plasmídeo p2100. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o DNA do plasmídeo p2100QUERAT intacto, conforme mostra a seta (poço 3), poço 1, Marcador 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), poço 2, DNA do p2100 intacto. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com produto de amplificação de PCR da região flaqueadora do gene da poliedrina do AgMNPV, poço 1, Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) poço 2, Fragmento esperado de amplificação de aproximadamente 3.100 pb a partir do DNA do plasmídeo p2100QUERAT, com oligonucleotídeos *Sph* I F pol Ag e *Pst* I R pol Ag, poço 3, Fragmento de amplificação esperado de aproximadamente 2.000 pb a partir do plasmídeo p2100 com oligonucleotídeos *Sph* I F pol Ag e *Pst* I R pol Ag,; poço 4, controle, sem DNA.

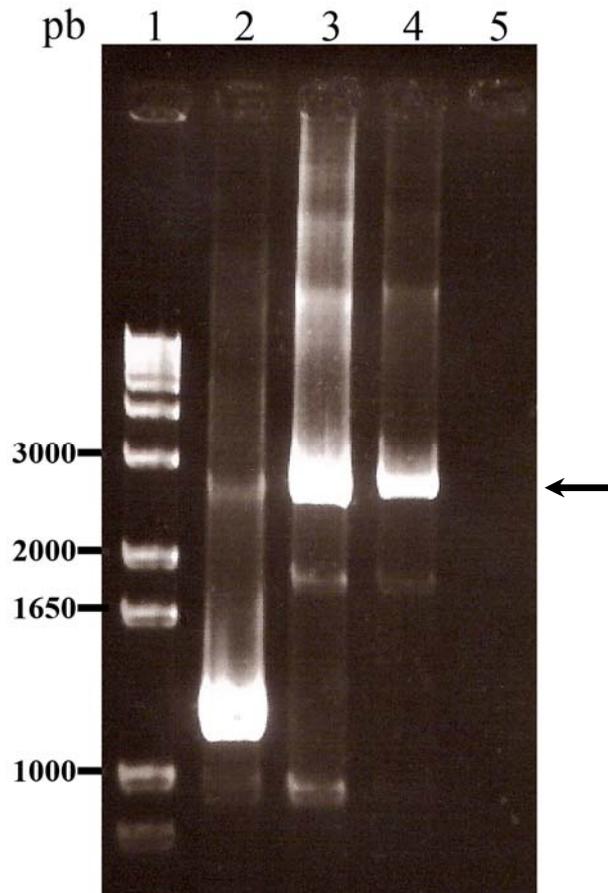


Figura 12: Confirmação da clonagem do gene *quitinase* no plasmídeo pSynXIVX3+ e construção do vírus recombinante vSynQUIT. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com produto de amplificação de PCR da região de inserção do gene da *quitinase* no locus do gene da poliedrina de AcMNPV, poço 1, Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) poço 2, Fragmento de PCR amplificado (1.200 pb) a partir do DNA do plasmídeo pSynXIVVI+X3, com os oligonucleotídeos ORF 603 e pol R Ac; poço 3, Fragmento de amplificação esperado (2.800 pb) a partir do DNA do plasmídeo pSynQUIT com oligonucleotídeos ORF 603 e pol R Ac; poço 4, Fragmento de amplificação esperado (2.800 pb) a partir do DNA do vírus recombinante vSynQUIT com oligonucleotídeos ORF 603 e pol R Ac e poço 5 controle, sem DNA.

pSynQUITINASE

1 atgccgctcgttattttgctcagtcactggcaatcatcgccactctg
M P S L F A Q S L A I I A T L
46 caggccactctcggctcttgccactcctgtatcagctcctgatact
Q A T L G L A T P V S A P D T
91 gtcacgcgaaaacatgccggtgggttacgtcaacgccgtctacttc
V I G K H A G G Y V N A V Y F
136 accaattggggaatatacggctcgaactatcagccagccgacctt
T N W G I Y G R N Y Q P A D L
181 cccgcttctcagatatcccatgttctgtactcgttcttgaacctt
P A S Q I S H V L Y S F L N L
226 tcaaataacggcaccgcttactctggagattcttgggctgacata
S N N G T V Y S G D S W A D I
271 gacaagcactacccaaatgactccttggaaatgatgtcggtaacaat
D K H Y P N D S W N D V G N N
Primer RtQuit 

316 gtctatggctgtgtcaagcaattatatctcctcaagaaagcgaac
V Y G C V K Q L Y L L K K A N
361 cgtaatatgaagacgatgttgtctattggagggtggacgtggtca
R N M K T M L S I G G W T W S
406 acgaacttcccagccgcgcctcgacggcagccactcgaagcaac
T N F P A A A S T A A T R S N
451 tttgcgaaatcggcggctcactattatgaaagactggggctttgat
F A K S A V T I M K D W G F D
496 ggtattgacgttgattgggaataccctgccgacgatgttcaagcc
G I D V D W E Y P A D D V Q A
541 aaaaacatggttcttcttcttcaagccgttcgggatgaactcgac
T N M V L L L Q A V R D E L D
586 gcatacgcggcaaagtttgctcagggataccatcttcagctatcg

A Y A A K F A Q G Y H F Q L S
 631 attgccgctccggctggccctgccaactataacaagttgcacctt
 I A A P A G P A N Y N K L H L
 676 ggcgacctcggaaaggtgttgattatatcaatttatggcctat
 G D L G K V L D Y I N L M A Y
 721 gacttttccggttcatggagcaactccagcgacacaacgcaaat
 D F S G S W S N S S A H N A N
 766 ctttacgccaatccgggcaaccttaatgccacaccattcaacacg
 L Y A N P G N L N A T P F N T
 811 gatgatgctgtcaatgattacattaaaggcgggtgttccggccagc
 D D A V N D Y I K G G V P A S
 856 aagatcgttcttggcatgccaatttatggtaaattcattccagaag
 K I V L G M P I Y G K S F Q K
 901 accaatggaattggaaagccattctctggtgttggcgacggcagc
 T N G I G K P F S G V G D G S
 946 tgggagaatggaatctgggattacaaggttcttcccaaagccggc
 W E N G I W D Y K V L P K A G
 991 gcgacggttatatatgatgacgtggcaaagggttactacagctac
 A T V I Y D D V A K G Y Y S Y
 1036 gataaccgcacccaagaacttatttcctatgataccctgatatt
 D N R T Q E L I S Y D T P D I
 1081 accaaggaaaaggttacctacctaagagcaagggttagggggc
 T K E K V T Y L K S K G L G G
 1126 agcatgttttgggaggtcatctgctgaccgtcaagggcccgactca
 S M F W E A S A D R Q G P D S
 1171 ctcattgggactagtagcaacaaacttgggtggaccggacgccact
 L I G T S S N K L G G P D A T
 1216 gagaatctactcaactaccctgactccaaatgacaatatgagg
 E N L L N Y P D S K Y D N M R
 1261 aagcagatggcttagGGGGCAGCATGTTTGGGAGGCATCTGCTG
 K Q M A *

1306 ACCGTCAAGGGCCCGACTCACTCATTGGGACTAGTAGCAACAAAC
 1351 TTGGTGGACCGGACGCCACTGAGAATCTACTCAACTACCCTGACT
 1396 CCAAATATGACAATATGAGGAAGCAGATGGCTTAGTTCTAGCCAG
 1441 CTTTCAACACACAAATCGGGTCAGCACCGCAAGCAATTTCTAGGG
 1486 TCAGTTTTATGCCGACTTGTGTGTCATAACCGACGACCCTGGGCC
 1531 ACAGGCCCTTGTTCCTCTCTTTCCATTTGCTCAGCACACTGGTGA
 1576 TATTTTCAGTGCCATATATCATCATTCGCGGTCCATCTTGCATCC
 1621 GTCTCTTTTCACCAGTAGGGTAAGGATGGTATTAAATGTTGAGCA
 1666 TGAGTCATGCCAAGTTTGGATGGGGTGGTGGTGCCTGCTGAATTC 1711
Eco RI

Figura 13: Sequência gênica do pSynQUIT de 1275 pb e 424 aa. A partir dessa sequência foi desenhado o oligonucleotídeo (RTQuit) para a realização da reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos e a sequência em que eles correspondem estão em vermelho e os sítios de restrição em itálico e azul, o início do gene e o término em rosa.

5.4. Construção e purificação dos baculovírus AcMNPV recombinantes (vSynCAT e vSynQUIT)

O vetor pSynCAT, contendo o gene *cathepsina-L*, e o vetor pSynQUIT, contendo o gene *quitinase*, foram co-transfectados com DNA do vírus vSyngalVI- 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 à troca de regiões homólogas entre o DNA plasmidial e o DNA do vírus vSyngalVI-. O gene *cathepsina-L* e *quitinase* foram colocados sob comando dos promotores da poliedrina modificado (*pXIV*) (Wang *et alli.*, 1991), desta forma, os vírus recombinantes vSynCAT e vSynQUIT podem expressar a proteína CATEPSINA e QUITINASE ao mesmo tempo em que podem expressar a poliedrina. Logo, o isolamento do vírus recombinante

se deu pela observação de OB nas células infectadas (Figura 14) com o sobrenadante da co-transfecção e das diluições em placas de 96 poços (O'Reilly *et alli.*, 1992).

5.5. Construção e purificação do baculovírus AgMNPV recombinantes

Os vetores p2100CAT e p2100QUERAT, contendo o gene *catepsina-L* e *queratinase*, respectivamente, foram co-transfectados com DNA do vírus vAgGalA2 em células UFL-AG-286. No interior das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre as regiões do plasmídeo vetor e do genoma viral, ocorrendo troca de regiões homólogas entre o DNA plasmidial e o DNA do vírus vAgGalA2. Os vetores de transferência p2100CAT e p2100QUERAT possuem, além dos genes de interesse (*catepsina-L* e *queratinase*), o gene da poliedrina. Os isolamentos dos vírus recombinantes ainda estão em andamento.

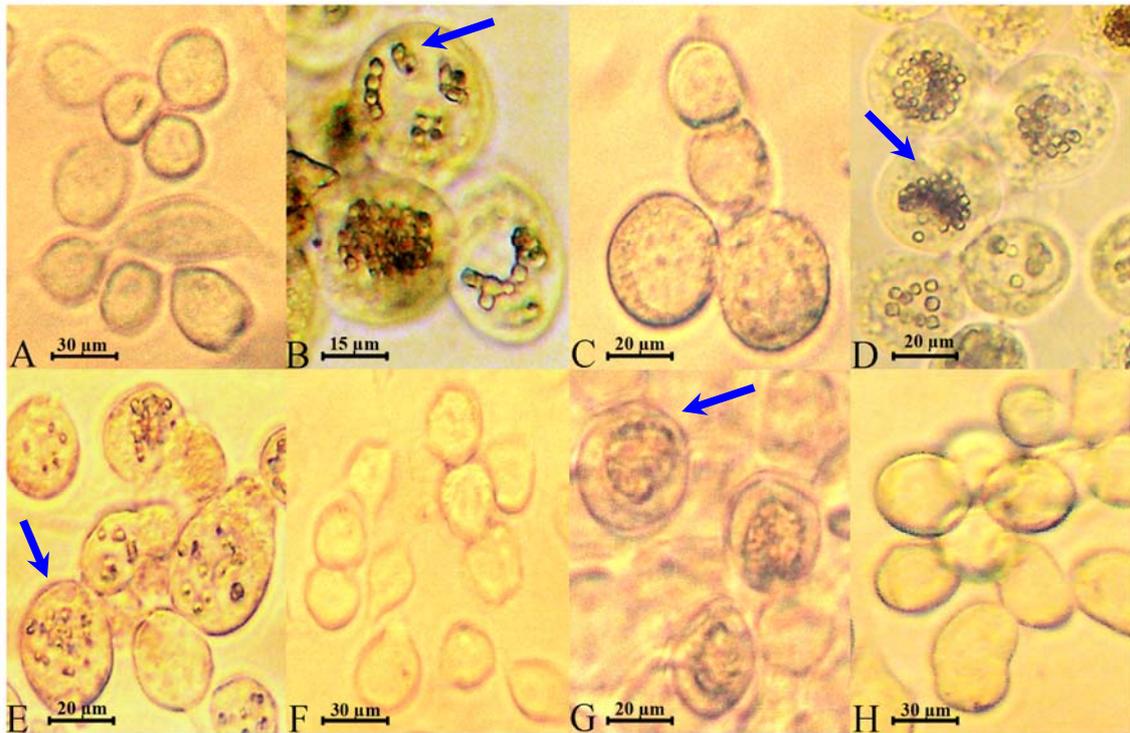


Figura 14: Células de inseto infectadas com os diferentes baculovírus usados neste trabalho. **(A)** Célula BTI-Tn5B1-4 não infectada, Mock. **(B)** Célula BTI-Tn5B1-4 infectada (96 h.p.i.) com o vírus selvagem AcMNPV. **(C)** Célula BTI-Tn5B1-4 infectada com o vírus vSyngal (96 h.p.i.) **(D)** Célula BTI-Tn5B1-4 infectada com o vírus recombinante vSynCAT (96 h.p.i.) **(E)** Célula BTI-Tn5B1-4 infectada com o vírus recombinante vSynQUIT (96 h.p.i.). As setas indicam os poliedros no núcleo das células infectadas. **(F)** Célula UFL-AG-286, não infectada, Mock **(G)** Célula UFL-AG-286 infectada com o vírus selvagem AgMNPV **(H)** Célula UFL-AG-286 infectada com o vírus recombinante vAgGalA2. Os vírus vSynGalVI- e vAgGalA2 não possuem o gene da poliedrina e, por isso, não produzem poliedros no núcleo das células infectadas.

5.6. Análise transcricional (RT-PCR)

O RNA viral purificado, a partir de 1,0 mL de cultura de células infectadas (72 h.p.i.) com os vírus vSynCAT, vSynQUERAT e vSynQUIT foram submetidos a uma reação de RT-PCR para confirmação da transcrição dos genes *catapsina*, *queratinase* e *quitinase*. Para isso, foram usados os oligonucleotídeos RTCat, RTQuerat e RTQuit, respectivamente, (Figura 10, 13 e 15, Tabela 2) para os genes *catapsina*, *queratinase* e *quitinase* e o T2 que possui a seqüência dos primeiros 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1 (Tabela 2), que se liga à cauda poli-A do transcrito.

Gene da queratinase

```
1 atgctttctatcaaacgcactttgctgctccttggagctgtcctg
M L S I K R T L L L L G A V L
46 ccagccgtctttggcgcgcctgtccaggaaactcgtcgtgctgct
P A V F G A P V Q E T R R A A
91 cagaagattcctggcaagtacatcgtgaccttcaagccgggcacc
Q K I P G K Y I V T F K P G T
136 gatacagctaccattgagtctcacactccttgggccactgatctt
D T A T I E S H T L W A T D L
181 cacaaacgcaatctggagcgtcgtgataccactagcggcgaacct
H K R N L E R R D T T S G E P
226 cccgtcggtatcgagaagagctacaagatcaaggatttcgccc
P V G I E K S Y K I K D F A A
271 tacgctggctccttcgatgacgccaccatcgaggaaatccgcaag
Y A G S F D D A T I E E I R K
316 agcgcagacgttgcccattgaggaggaccaaactcgggtacctt
S A D V A H V E E D Q I W Y L
```

361 gacgccttgaccactcaaaagggcgcccatggggcctgggcagc
 D A L T T Q K G A P W G L G S
 406 atttcccacaagggacaagcaagcaccgactacatctacgacacc
 I S H K G Q A S T D Y I Y D T
 451 agcgctggcgcaggcacctatgcctacgttgtcgacagtggcatc
 S A G A G T Y A Y V V D S G I
 496 aatgtcaaccacgtcgagttcgagagccgcgcatcgctggcatac
 N V N H V E F E S R A S L A Y
 541 aacgccgctggtggcagccatggtgacagcatcggccacggaacg
 N A A G G S H V D S I G H G T
 586 cacgttgctggtaccattggcggcaagacctacggagtggccaag
 H V A G T I G G K T Y G V A K
 631 aagaccaaccttctgtccgtcaaggtcttccagggcgagtctct
 K T N L L S V K V F Q G E S S
 676 agcacctccatcatccttgacggcttcaactgggctgtcaatgac
 S T S I I L D G F N W A V N D
 721 attgtgagcaagggctgtactaagaaggctgcgatcaacatgagc
 I V S K G R T K K A A I N M S
 766 cttggtggtggttactcttatgccttcaacaacgctggtgagaac
 L G G G Y S Y A F N N A V E N
 811 gctttcgatgaaggtgtcctttctgtcgtcgctgctggaaacgag
 A F D E G V L S V V A A G N E
 856 aacagtgatgcctcaaataaccagccctgcttccgctcctaacgct
 N S D A S N T S P A S A P N A
 901 ttgacggttgctgcgatcaacaagagcaacgcccgcgctccttc
 L T V A A I N K S N A R A S F
 946 tccaactatggttccggttgcgacatcttcgctcccggtcaggat
 S N Y G S V V D I F A P G Q D

Primer RtQuerat 

 991 atcctttcggcctggattggctccac**cactgccaccaacaccatc**
 I L S A W I G S T T A T N T I

```

1036 tccggtaacttccatgcccaccctcacattggtggcctatccgtc
      S G T S M A T P H I V G L S V
1081 tacttgatgggtcttgagaacctctctggccctgctgcagtgacc
      Y L M G L E N L S G P A A V T
1126 gctcgcacatcaaggagctggccaccaatggtggttaccacggt
      A R I K E L A T N G V V T N V
1171 aagggcagccccaacaagcttgctacaatggcaatgcttaaGAATTC 1212
      K G S P N K L A Y N G N A *
      Eco RI

```

Figura 15: Sequência gênica da queratinase de 1212 pb e 403 aa. A partir dessa sequência foi desenhado um oligonucleotídeo (RTQuerat) para a realização da reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos e a sequência em que eles correspondem estão em vermelho e os sítios de restrição em itálico e azul, o início do gene e o término em rosa.

Vários fragmentos foram amplificados (Figura 16) e não foi possível determinar qual dos fragmentos correspondia ao transcrito do gene. Uma possível explicação para os vários fragmentos obtidos seria uma possível baixa especificidade do oligonucleotídeo usado (RTCat) para a reação de RT-PCR. O produto esperado para a reação de RT-PCR do gene *cathepsina* seria um fragmento de aproximadamente 550 pb, sem a cauda poli-A. Desta forma, qualquer fragmento acima desse tamanho pode ser o mRNA do gene. A figura 16 mostra pelo menos 6 fragmentos acima de 500 pb, 3 fragmentos mais fortes entre 1.300 e 1.700 pb. Para a *queratinase* dois fragmentos foram amplificados na reação de RT-PCR um fragmento de aproximadamente 950 pb e outro de aproximadamente 700 pb (Figura 17). Como o oligonucleotídeo específico usado para a RT-PCR (RTQuerat, Figura 17 e Tabela 2) está localizado a 196 pb do códon de terminação, esses fragmentos podem representar dois mRNA que terminam em posições diferentes. A digestão dos fragmentos com a enzima *Eco RI*, apresentou 3 novos fragmentos, um do tamanho esperado de 196 pb e outros dois de

aproximadamente 800 e 600 pb, mostrando que ambos são digeridos pela enzima e provavelmente correspondem a diferentes terminações do mRNA do gene (Figura 17). Para o transcrito do gene *quitinase* foram também amplificados dois fragmentos de aproximadamente 1.650 e 1.800 pb, correspondente a 1.200 pb do gene (distância do oligonucleotídeo RTQuit até o sítio da enzima *Eco* RI no final do gene), mais 450 pb ou 650 pb correspondente a terminação do mRNA em diferentes posições, conforme obtido com a digestão com a enzima de restrição *Eco* RI (Figura 18).

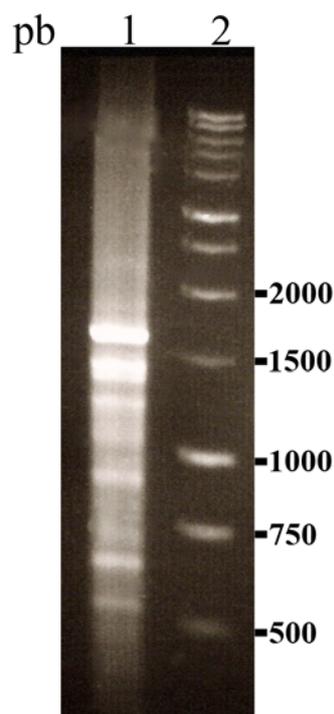


Figura 16: Análise transcricional do gene *catepsina-L* em células de inseto infectadas com o recombinante vSynCAT. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do produto de amplificação de RT-PCR do gene *catepsina-L* com os oligonucleotídeos RTCAT e T2. Poço 1, fragmentos de RT-PCR amplificados a partir do mRNA de células de inseto infectadas com o vírus vSynCAT (72 h.p.i.), poço 2, Marcador 1 Kb DNA Ladder (Promega). Vários fragmentos foram amplificados e não foi possível determinar qual dos fragmentos corresponde ao transcrito do gene. Uma possível explicação para os vários fragmentos obtidos seria uma possível baixa especificidade do oligonucleotídeo usado (RTCat) para a reação de RT-PCR.

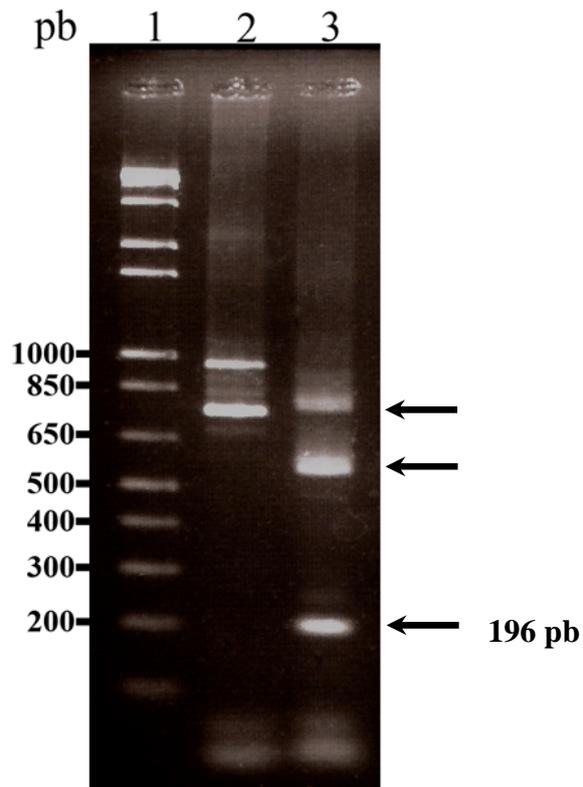


Figura 17: Análise transcricional do gene *queratinase* em células de inseto infectadas com o recombinante vSynQUERAT (72 h.p.i.). Eletroforese em gel de agarose 1,2 % do produto de amplificação de RT-PCR a partir do mRNA de células infectadas com o vírus vSynQUERAT e com os oligonucleotídeos RTQuerat e T2. Poço 1, Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), poço 2, fragmentos de RT-PCR correspondente ao mRNA do gene *queratinase*, poço 3, digestão dos fragmentos amplificados na reação de RT-PCR mostrada no poço 2 com a enzima *Eco* RI, as setas mostram o fragmento de 196 pb esperado na digestão com a enzima *Eco* RI e outros dois fragmentos de aproximadamente 800 e 600 pb, provavelmente correspondente a diferentes terminações do mRNA.

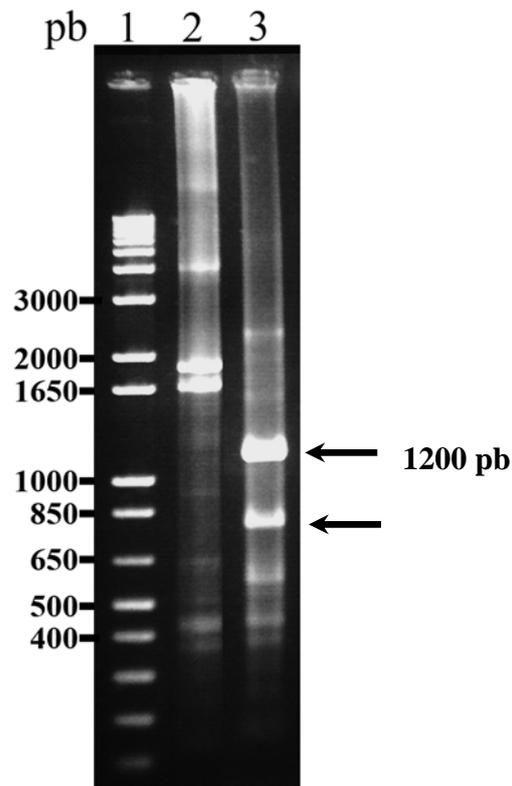


Figura 18: Análise transcricional do gene *quitinase* em células de inseto infectadas (72 h.p.i.) com o recombinante vSynQUIT. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com produto de amplificação de RT-PCR a partir do mRNA de células infectadas com o vírus vSynQUIT e com os oligonucleotídeos RTQuit e T2. Poço 1, marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), poço 2 Fragmentos amplificados de RT-PCR correspondente ao mRNA do gene *quitinase*, poço 3, digestão dos fragmentos amplificados na reação de RT-PCR mostrada no poço 2 com a enzima *Eco* RI, as setas mostram o fragmento de 1.200 pb do gene e outros fragmentos correspondente à terminação do mRNA em diferentes posições.

5.7. Bioensaios

Trinta larvas de *S. frugiperda* entre o 3º e 4º instar foram utilizadas para a inoculação via hemolinfa, com o auxílio de uma seringa de 1 ml, em um volume de 10-15 µl do estoque de BV dos vírus AcMNPV, vSynQUERAT, vSynCAT, vSynQUIT e com meio de cultura como controle negativo. O vírus recombinante vSynCAT, assim

como vSynQUERAT, (Perecmanis, 2004) foi capaz de induzir a morte nas larvas de 3° e 4° instar mais rápido comparado ao vírus selvagem (Figura 19 e Tabela 3). Com o uso do vSynCAT, a morte começa a ocorrer efetivamente mais cedo em 60 h.p.i. e termina com 84 h.p.i., enquanto o AcMNPV precisa de 168 h.p.i. para produzir a morte de todas as lagartas. Além disso, nos estágios finais da infecção, os vírus com os genes da catepsina-L e queratinase induzem a melanização da cutícula, não ocorrendo o mesmo com o vírus selvagem (Figura 20). A maioria das mortes dos insetos inoculados com vSynQUERAT, como já demonstrado por Perecmanis, 2004, ocorreu entre 96 h e 120 h.p.i., embora o período de 72 a 96 h.p.i. também tenha produzido a morte de muitos insetos. Os insetos inoculados com AcMNPV apresentaram uma baixa mortalidade entre esses períodos, com a morte da totalidade das larvas entre 120-168 h.p.i. (Figura 19 e Tabela 3).

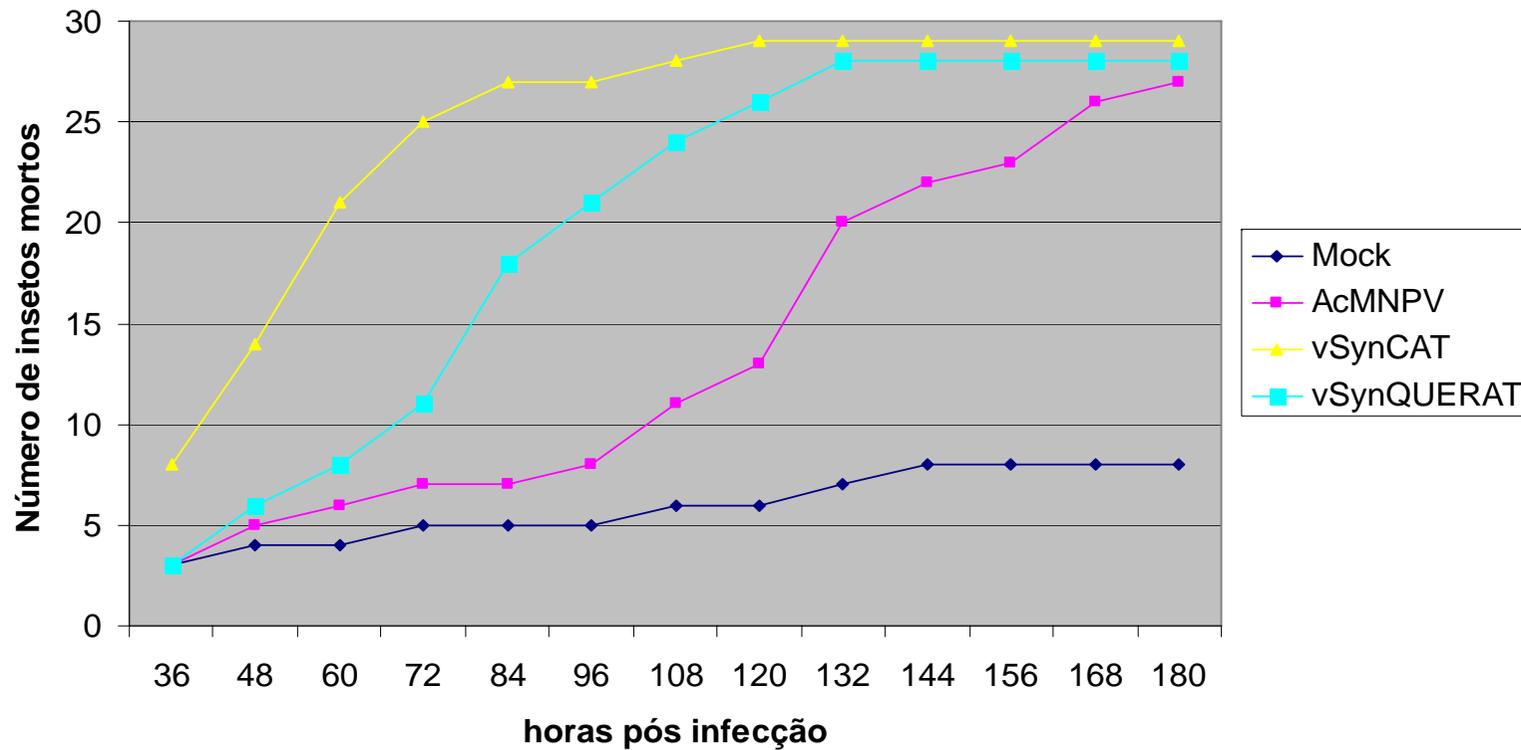


Figura 19: Bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinantes (vSynCAT e vSynQUERAT) em larvas de *S. frugiperda*. A figura mostra o número de insetos mortos em diferentes tempos pós-infecção inoculados com os vírus AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT e o controle mock. Resultados por média (representada por colunas) e desvio padrão (representado por barras de erros) de três bioensaios diferentes com a inoculação de 30 larvas de *S. frugiperda* para cada tipo de vírus testado.

Tabela 3: Dados dos três bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinantes (vSynCAT e vSynQUERAT) em larvas de *S. frugiperda*. A tabela mostra o número de insetos mortos em diferentes tempos pós-infecção inoculados (1×10^6 pfu) com os vírus AcMNPV, vSynCAT e vSynQUERAT, e o controle mock.

1° Bioensaio														
Vírus h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192
Mock	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AcMNPV	0	0	0	0	0	1	5	5	13	4	1	0	0	0
vSynCAT	8	5	9	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vSynQUERAT	0	0	0	4	13	4	5	0	0	0	0	0	0	0
2° Bioensaio														
Vírus h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192
Mock	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AcMNPV	2	2	0	0	0	0	1	1	5	1	2	4	0	0
vSynCAT	9	3	6	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vSynQUERAT	1	3	2	5	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3° Bioensaio														
Vírus h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192
Mock	6	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AcMNPV	5	3	1	2	0	1	2	0	1	0	0	5	2	6
vSynCAT	5	9	6	4	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
vSynQUERAT	6	4	4	0	1	1	3	4	5	0	0	0	0	0

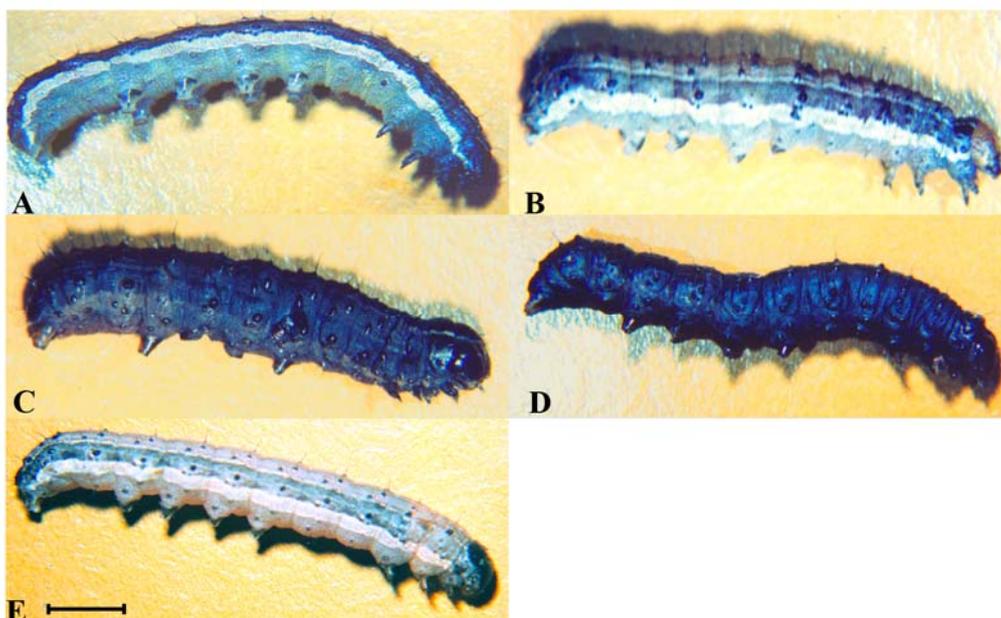


Figura 20: Análise estrutural da cutícula de larvas de *S. frugiperda* observadas em um estereomicroscópio. Larvas não infectadas (A) e infectadas com os vírus selvagem AcMNPV (120 h.p.i.) (B), recombinante vSynCAT (96 h.p.i.) (C), vSynQUERAT (96 h.p.i.) (D) e vSynQUIT (96 h.p.i.) (E). Observar melanização da cutícula nas larvas infectadas com os vírus vSynCAT e vSynQUERAT C e D. Barra = 0,38 cm.

Em relação ao vírus recombinante vSynQUIT não houve uma diferença significativa em comparação ao vírus selvagem AcMNPV no tempo de morte. A maioria das mortes dos insetos infectados com vSynQUIT ocorreu entre 108 e 144 h.p.i. e com o vírus selvagem de 108 a 216 h.p.i. (Figura 21 e Tabela 4).

A dose letal (LD_{50}) de AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT não pôde ser estimada para larvas de *S. frugiperda* entre o 3º e 4º instar, pois a mortalidade encontrada foi muito baixa (dados não mostrados).

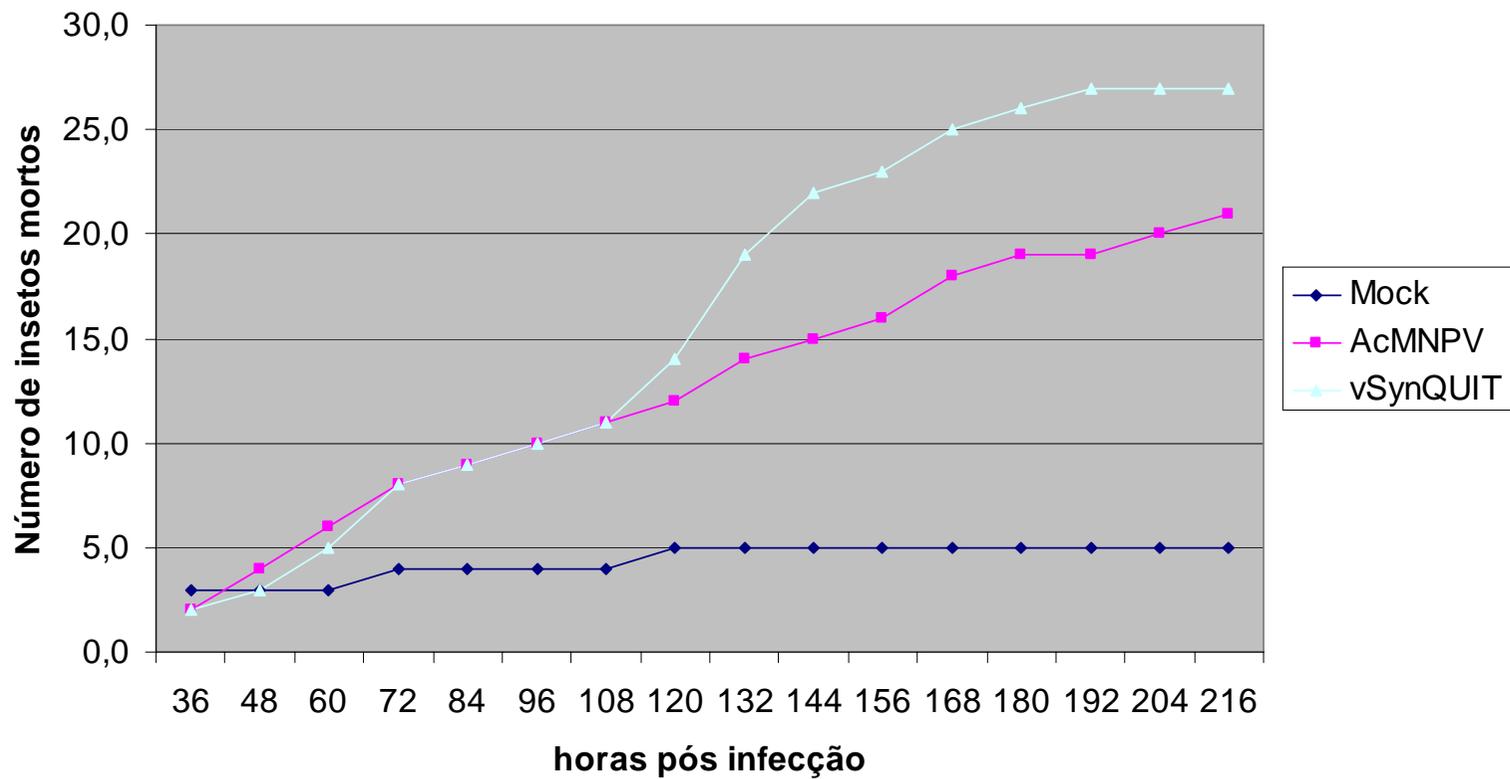


Figura 21: Bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinante (vSynQUIT) em larvas de *S. frugiperda*. A figura mostra o número de insetos mortos em diferentes tempos pós-infecção inoculados com os vírus AcMNPV, vSynQUIT, e o controle mock. Resultados por média (representada por colunas) e desvio padrão (representado por barras de erros) de três bioensaios diferentes com a inoculação de 30 larvas de *S. frugiperda*.

Tabela 4: Dados dos três bioensaios com os vírus selvagem (AcMNPV) e recombinante (vSynQUIT) em larvas de *S. frugiperda*. A tabela mostra o número de insetos mortos em diferentes tempos pós-infecção inoculados (1×10^6 pfu) com os vírus AcMNPV, vSynQUIT, e o controle mock.

1º Bioensaio																
Vírus \ h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	216
Mock	6	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AcMNPV	5	3	1	2	0	1	2	0	1	0	0	5	2	1	3	2
vSynQUIT	3	2	1	3	1	0	0	1	2	4	1	5	2	2	0	0
2º Bioensaio																
Vírus \ h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	216
Mock	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AcMNPV	1	2	4	0	0	0	1	2	2	2	1	0	1	0	0	0
vSynQUIT	2	1	5	2	1	1	0	1	6	4	1	0	2	0	1	0
3º Bioensaio																
Vírus \ h.p.i.	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	216
Mock	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AcMNPV	0	1	2	3	2	0	1	2	4	0	2	1	0	0	0	0
vSynQUIT	0	0	1	3	0	1	4	7	8	2	0	1	0	0	0	0

5.8. Análise estrutural dos tecidos das larvas de *S. frugiperda* infectadas pelos vírus AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT e vSynQUIT

Larvas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT e vSynQUIT foram analisadas em um estereomicroscópio (Figura 22). As larvas infectadas com o vírus AcMNPV apresentaram, a presença do tecido adiposo

e o sistema traqueal firmemente ligado ao intestino da lagarta (Figura 22). Já as larvas infectadas com os vírus recombinantes vSynCAT, vSynQUERAT apresentaram pouco ou ausência de tecido adiposo e o sistema traqueal estava frouxamente ligado ao intestino médio do inseto e apresentaram melanização da cutícula (Figura 22).

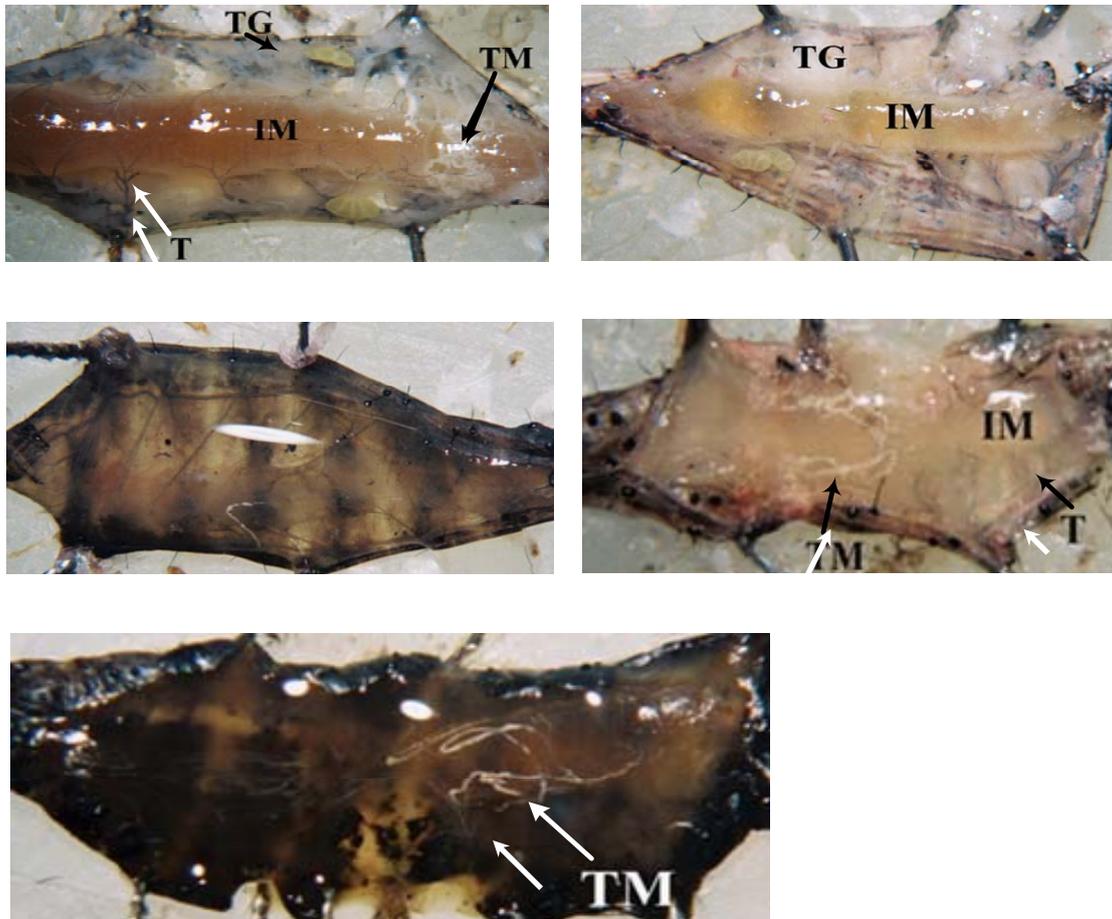


Figura 22: Análise estrutural dos tecidos internos de larvas de *S. frugiperda* não infectadas (132 h.p.i.) (A), infectadas com o baculovírus AcMNPV (B) vSynCAT (C), vSynQUIT (D) e vSynQUERAT (E). Em C e D observamos além da melanização da cutícula, diminuição de tecido gorduroso. IM – Intestino Médio, T – Traquéia, TM – Túbulos de Malpighi, TG – Tecido Gorduroso. Barra = 0,35 cm para A, B, C e D e barra = 0,25 cm para E.

5.9. Ensaios de atividade proteolítica sobre substratos fluorogênicos

A atividade proteolítica dos extratos de células não infectadas ou infectadas com AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT sobre diferentes substratos foi testada com o objetivo de detectar atividade proteolítica nos diferentes vírus utilizados, assim como verificar se havia atividade no extrato celular não infectado (Tabela 5). Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que com a utilização do substrato L-AMC (leucil-aminopeptidase), o vírus recombinante vSynCAT e mock apresentam uma atividade semelhante, o mesmo ocorrendo com o substrato N-GP-AMC (colagenase) quando testado em mock e vSynQUERAT. Em relação ao substrato Phe-Arg –AMC (serino-protease e catepsina) não foi observada diferença significativa entre a atividade detectada para o mock, vírus selvagem e recombinante testado, o mesmo ocorrendo em relação ao substrato para tripsina (R-AMC). A identificação de atividade proteolítica significativa nas células utilizadas para infecção com os vírus não permitiu a obtenção de conclusão quanto à atividade dos mesmos. Com isso, resolvemos testar a atividade proteolítica das amostras em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina numa tentativa de obtermos bandas de proteínas ativas na clivagem da gelatina com diferentes massas moleculares para as amostras de mock, vírus selvagem e recombinantes.

Tabela 5: Atividade proteolítica de extrato celular não infectado e infectado com AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT sobre substratos fluorogênicos.

Substratos	Amostra utilizada	U
L-AMC	AcMNPV	53,325
	Mock	100,31
	vSynCAT	100,155
	Branco	5,094
N-GP-AMC	AcMNPV	29,43
	Mock	52,17
	vSynQUERAT	48,235
	Branco	7,492
Phe-Arg-AMC	AcMNPV	30,2
	Mock	27,32
	vSynCAT	32,785
	Branco	22,88
R-AMC	AcMNPV	7,475
	Mock	7,866
	vSynQUERAT	8,658
	Branco	4,426

5.10. Detecção de atividade proteolítica em gel de poliacrilamida

A atividade proteolítica sobre gelatina foi encontrada em todos os vírus utilizados para infectar o extrato celular e naquele não infectado (selvagem). Como as amostras aplicadas tinham aproximadamente a mesma concentração de proteínas pode-se suspeitar de uma atividade maior no vírus vSynCAT, com bandas mais nítidas em relação às outras amostras, o que deve ser confirmado em outros experimentos. Maior

nitidez das bandas de proteínas obtidas de vírus recombinantes se deve à provável expressão da proteína (catepsina) com atividade. Quando comparada a amostra mock ou vírus selvagem com a do vírus vSynQUERAT, observamos o aparecimento de banda de menor altura em relação àquela nítida da amostra vSynCAT. Tal resultado aponta para a expressão de queratinase com atividade e de diferente massa molecular em relação às proteases das outras amostras. A amostra de vírus com quitinase recombinante deve ser novamente testada em outras condições (maior concentração, incubação em tampão com diferentes pH) para verificar o aparecimento de bandas com maior nitidez. (Figura 23).

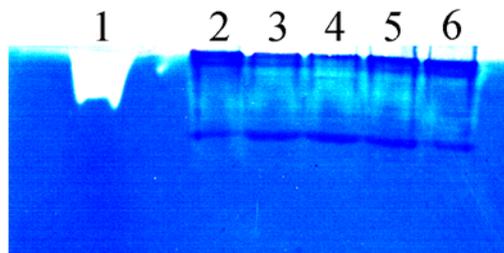


Figura 23: Atividade gelatinolítica do extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectado e infectado com AcMNPV, vSynQUERAT, vSynCAT, vSynQUIT. Gel de poliacrilamida 12% polimerizado em presença de gelatina (1,5 %) e sob condição desnaturante na ausência de fervura da amostra e o gel foi, após incubação com tampão acetato pH 4.5, DTT 1mM e EDTA 0,1 mM, corado com azul de Coomassie. Poço 1, tripsina - controle positivo, poço 2, mock, poço 3, AcMNPV, poço 4 vSynCAT, poço 5, vSynQUERAT, poço 6, vSynQUIT.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi feita a construção e purificação dos baculovírus recombinantes vSynCAT e vSynQUIT, usando o vetor de transferência pSynXIVX3+ (Wang *et alli.*, 1991). Desse modo, foram inseridos os genes *cathepsina-L* de *S. peregrina* e *quitinase* de *M. anisopliae* no genoma do protótipo dos baculovírus, o AcMNPV. Além disso, nós inserimos os genes *cathepsina-L* e *queratinase* de *A. fumigatus* no vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005) para inserção desses genes no genoma do baculovírus AgMNPV, visando sua expressão em células de inseto.

A introdução de genes no genoma dos baculovírus tem sido realizada para aumentar a virulência do vírus contra seu hospedeiro (Martignoni, 1984; Payne, 1986; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1993; Moscardi, 1998; Castro *et alli.*, 1999), e para expressão de proteínas heterólogas em cultura de células de insetos (Luckow & Summers, 1988; O'Reilly *et alli.*, 1992; Richardson, 1995; Bonning & Hammock, 1996; Jarvis *et alli.*, 1997). Hammock *et alli.* (1990) inseriram o gene da enzima esterase do hormônio juvenil (JHE) de *H. virescens* no genoma do AcMNPV sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*), resultando em uma diferença significativa comparado com o vírus selvagem. O mesmo aconteceu com o promotor do gene *p10* (Bonning *et alli.*, 1992; Roelvink *et alli.*, 1992), promotor do gene *p6.9* (Bonning *et alli.*, 1994) e com um promotor híbrido baseado no gene *polh* (Eldridge *et alli.*, 1992). Promotores fortes como os que estão no vetor de transferência pSynXIVX3+ (Wang *et alli.*, 1991, O'Reilly, *et alli.*, 1992) são muito utilizados por possuir, além do promotor do gene da poliedrina modificado, PXIV, o gene da poliedrina que facilita a detecção e isolamento dos vírus recombinantes. Esse vetor é capaz de produzir tanto OV quanto à proteína de interesse. Desse modo, neste trabalho, nós inserimos o gene da *cathepsina-L* de *S.*

peregrina, no genoma do baculovírus AcMNPV, sob o comando de dois promotores em tandem (*pSyn* e *pXIV*) que podem expressar diferentes genes. Outros estudos também mostraram que AcMNPV recombinantes expressando JHE modificados por mutações e testados em *H. virescens* e *T. ni*, eram capazes de reduzir o consumo de alimento pelas larvas (Eldridge *et alli.*, 1992; Bonning *et alli.*, 1997; Bonning *et alli.*, 1999). A toxina derivada do ácaro *P. tritici*, TxP-1, foi também expressa em AcMNPV. Sua ação é paralisante, causando contração muscular. Os baculovírus recombinantes, expressando TxP-1, tiveram um tempo para induzir a morte de 30-40% mais rápido comparado ao vírus selvagem (Tomalski & Miller, 1991, 1992; Lu *et alli.*, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados com a toxina AaIT do escorpião *A. 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. O tempo letal é reduzido em 25-40% comparado ao vírus selvagem (Maeda *et alli.*, 1991; McCutchen *et alli.*, 1991; Stewart *et alli.*, 1991; Zlotkin *et alli.*, 2000; Treacy *et alli.*, 2000). Outras toxinas como, de escorpiões (Froy *et alli.*, 2000; Imai *et alli.*, 2000), aranhas (Prikhod'ko *et alli.*, 1998), anêmonas do mar (Prikhod'ko *et alli.*, 1998) e ácaros (Tomalski & Miller, 1991; Hughes *et alli.*, 1997; Burden *et alli.*, 2000), foram também expressas usando baculovírus, mostrando, também, redução no tempo letal dos vírus recombinantes.

Além da inserção de genes codificando toxinas, a deleção de genes virais pode diminuir o tempo entre a infecção e morte do inseto hospedeiro (O'Reilly, 1995; Bonning & Hammock, 1996). Os baculovírus produzem uma proteína durante a infecção, Ecdisteroide UDP-Glicosil Transferase (EGT), que inativa o hormônio ecdisona, responsável pela muda do inseto (O'Reilly & Miller, 1989; Rodrigues *et alli.*, 2001). A deleção ou inativação desse gene resulta em redução de 10-20% do tempo

letal, 40% do dano econômico e 30% no número de progênies virais produzidas (O'Reilly & Miller, 1989; Pinedo *et alli.*, 2003). 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 da catepsina L de *S. peregrina*, sob o comando do promotor *ie-1* ou *p6.9.*, reduzindo significativamente para 51% o tempo de sobrevivência do inseto *H. virescens* e o consumo 26 vezes menor do alimento que o vírus selvagem (Harrison & Bonning, 2001). Outra enzima com potencial inseticida é a quitinase. 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 h) quando comparado ao vírus selvagem (100 h) (Gopalakrishnan *et alli.*, 1995). Mais recentemente, o gene de uma serino-protease (queratinase) do fungo *A. fumigatus* foi introduzido no genoma do baculovírus AcMNPV sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*) modificado. Bioensaios com o vírus recombinante mostraram que o tempo médio de morte foi reduzido em 24 h, quando comparado ao vírus selvagem (Perecmanis, 2004).

Neste trabalho, nós inserimos o gene da catepsina-L de *S. peregrina*, no genoma do baculovírus AcMNPV, sob o comando de dois promotores em tandem (*pSyn* e *pXIV*) para a observação dos efeitos da infecção viral em larvas de *S. frugiperda*. O vírus recombinante foi capaz de aumentar a virulência do vírus contra seu hospedeiro, a lagarta do cartucho do milho, *S. frugiperda*. Esse fato foi também demonstrado no trabalho realizado por Harrison & Bonning (2001) para *H. virescens*, já mencionado anteriormente. A morte pela expressão de uma protease que degrada proteínas da matriz extracelular pode ser acelerada, pois pode ocorrer uma dispersão da infecção secundária mais rapidamente nos tecidos da célula hospedeira, fato demonstrado em comparação ao

vírus selvagem. A catepsina-L de *S. peregrina* parece estar envolvida na digestão das proteínas da membrana basal que recobre os diferentes tecidos do inseto, reduzindo o tempo de infecção.

A análise transcricional dos genes *catepsina*, *queratinase* e *quitinase* foram analisadas por RT-PCR. Os vários fragmentos amplificados com a utilização do oligonucleotídeo RTCat pode ter ocorrido devido à baixa especificidade do mesmo para a reação de RT-PCR. Os fragmentos amplificados com a utilização do oligonucleotídeo RTQuerat podem corresponder a diferentes terminações do mRNA, confirmado com a digestão com a enzima *Eco RI*, onde foi obtido um fragmento do tamanho esperado e outros dois provavelmente correspondendo a dois mRNA que terminam em posições diferentes. Os fragmentos amplificados com a utilização do oligonucleotídeo RTQuit correspondem a um fragmento gênico esperado e outro fragmento correspondendo provavelmente a outro sítio de terminação do mRNA. Nesses casos, parte da ORF 603, presente após o gene heterólogo, no genoma do vírus recombinante, pode ter sido amplificada, justificando o tamanho maior dos fragmentos amplificados. Essa possibilidade é suportada pelo seqüenciamento do produto de amplificação por RT-PCR para o gene HBSAg do vírus da Hepatite B inserido no genoma do AcMNPV pelo mesmo vetor de transferência utilizado nesse trabalho (pSynXIVX3+) (Bergmann M. Ribeiro, comunicação pessoal). Assim, um seqüenciamento dos genes detectados pelo produto de amplificação por RT-PCR, se faz necessário para confirmar a especificidade dos fragmentos amplificados neste trabalho.

A atividade proteolítica do extrato celular não infectado e infectado com AcMNPV, vSynQUERAT e vSynCAT sobre substratos fluorogênicos demonstrou que, de modo geral, atividades proteolíticas também são detectadas em outros sistemas como por exemplo nas células utilizadas para infecção. Isso nos leva a concluir que, para a

determinação exata dos níveis de atividade proteolítica e seu grau de especificidade novos experimentos devem ser realizados, variando as concentrações de amostra ou testando diferentes tampões e pH, o que pode favorecer a atuação das enzimas testadas. Além disso, são raros os relatos da literatura onde se percebe haver substratos específicos para as diferentes enzimas, sendo que vários deles são clivados por enzimas de diferentes classes de proteases. A verificação de atividade proteolítica nas células utilizadas para a infecção com os vírus não é surpresa, uma vez que tanto eucariotos (Barrett & Rawlings, 1991; Rawlings & Barrett, 1993) como procariotos dependem em suas vias metabólicas, da atuação de proteases. Experimentos de verificação de atividade após a purificação das proteínas recombinantes expressas devem elucidar quanto a essa questão. Outros experimentos também devem ser feitos para obtenção de enzimogramas das amostras (gel de acrilamida copolimerizado com gelatina). Uma menor concentração de acrilamida e de gelatina devem favorecer a visualização e diferenciação das massas moleculares das proteases. Também outras concentrações das amostras e incubação em diferentes tampões e pH devem ser testados. De qualquer modo, o resultado obtido aponta para a existência de banda com atividade proteolítica nítida na amostra do vírus com a queratinase recombinante quando comparada com o vírus selvagem e mock. A separação das proteínas das amostras (não fervidas) em géis de poliacrilamida incubados com os diferentes substratos fluorogênicos (cada poço, um substrato fluorogênico) deve também auxiliar na identificação e caracterização das atividades proteolíticas, sendo uma das próximas etapas desse trabalho.

Em relação ao tempo de sobrevivência, as larvas de *S. frugiperda* são mais resistentes ao vírus AcMNPV, com um tempo médio de morte entre 120 e 144 h.p.i., quando injetado na hemolinfa (Clarke & Clem, 2002). Com o uso do vSynCAT, a morte começa a ocorrer efetivamente mais cedo, 60 h.p.i., terminando em 84 h.p.i., assim

como o vSynQUERAT ocorrendo entre 96 h e 120 h.p.i. (Perecmanis, 2004). Os insetos inoculados com AcMNPV apresentaram uma baixa mortalidade nesses tempos p.i., com a morte da totalidade das larvas entre 120-168 h.p.i., mostrando uma maior resistência ao AcMNPV. Foi observado com a realização dos bioensaios os principais sintomas da infecção por NPV que incluem perda de apetite, parada no desenvolvimento larval e diminuição dos movimentos (Federici, 1997).

A dose letal (LD_{50}) de poliedros derivados dos vírus AcMNPV, vSynCAT, vSynQUERAT não pôde ser estimada para larvas de *S. frugiperda* entre o 3º e 4º instar, pois a mortalidade encontrada foi muito baixa para vírus inoculados em discos foliares e administrados aos insetos via oral. Esse fato pode ser atribuído a um mecanismo de resistência da própria espécie, também demonstrado no experimento de Clarke & Clem (2002) em comparação com outro inseto mais susceptível ao AcMNPV (*T. ni*). Essa espécie é extremamente susceptível à infecção oral com poliedros do AcMNPV na alimentação (Keddie *et alli.*, 1989; Barrett *et alli.*, 1998) e também na infecção via injeção intrahemocélica (Clem & Miller, 1993; Danyluk & Maruniak, 1987). A larva *S. frugiperda* é menos susceptível ao AcMNPV, a dose de vírus necessária para matar 50% e 95% das larvas de *S. frugiperda* em cada caso é 1.000 vezes maior que a dose necessária para matar igual proporção de *T. ni* (Clarke & Clem, 2002), demonstrando uma baixa permissividade de *S. frugiperda* ao AcMNPV. Desse modo, é necessário testar a infecção oral com poliedros dos vírus recombinantes utilizados nesse trabalho do AcMNPV em outras espécies como *T. ni* ou *H. virescens*. Outro problema é a população de *S. frugiperda* utilizada, pois podem existir diferenças na susceptibilidade entre populações do inseto-praga utilizada para os bioensaios (Fuxa *et alli.*, 1988).

A expressão do gene da catepsina-L codificado pelo baculovírus AcMNPV, nos estágios finais da infecção, é marcada pela liquefação do cadáver do inseto, sendo

reduzido a uma massa fluida e viscosa (Volkman & Keddie, 1990; Volkman & Hom 2000). Larvas de *T. ni* infectadas com o vírus com a deleção do possível sinal de localização no retículo endoplasmático (KDEL) da quitinase do AcMNPV possuem um tempo de liquefação menor comparado com o vírus controle, sem a deleção de KDEL (Saville *et alli*, 2002), proporcionando a transmissão da infecção mais rapidamente.

A melanização da cutícula, observada nos bioensaios com os vírus recombinantes vSynCAT e vSynQUERAT, pode ter sido provocada pela presença, na hemolinfa do inseto, da enzima fenoloxidase, encontrada na forma de pro-enzima e capaz de ser ativada durante a infecção do inseto por microorganismos. 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 foi observada em larvas de *H. virescens* no experimento de Harrison & Bonning (2001), sugerindo que a catepsina L foi capaz de ativar a cascata acionada por serino-proteases que leva à conversão da pro-fenoloxidase em sua forma ativa ou ativação da fenoloxidase diretamente. O mesmo pode ter ocorrido com a queratinase, sugerido por Peregmanis, 2004, e com a catepsina-L presente no baculovírus recombinante vSynCAT.

Outro gene introduzido no genoma do baculovírus AcMNPV foi o da quitinase de *M. anisopliae*. Quitinases pertencem a uma família multi-gênica em lepidópteros (Daimon *et alli.*, 2003); e dípteros (De La Vega *et alli.*, 1998; Zhu *et alli.*, 2004). Um exemplo disso é a quitinase de *Bombyx mori* que mostra homologia com quitinases de bactérias e baculovírus (Daimon *et alli.*, 2003), desse modo, tem sido proposto que baculovírus podem ter adquirido o gene da quitinase de bactéria por transferência gênica horizontal (Hawtin *et alli.*, 1995; Hughes & Friedman, 2003). Outros trabalhos sugerem

que os baculovírus podem capturar genes e elementos transponíveis de seus hospedeiros ou com outros vírus durante uma co-infecção (Miller & Miller, 1982; Lerch & Friesen, 1992; Jehle *et alli.*, 1998; Handler, 2002; Hughes & Friedman, 2003).

O gene da quitinase em baculovírus foi identificado pela primeira vez no genoma do AcMNPV em células de *S. frugiperda* (Ayres *et alli.*, 1994), sendo expresso como uma proteína da fase tardia de 58 kDa com atividade de endoquitinase e exoquitinase (Hawtin *et alli.*, 1995). Quitinase (Hawtin *et alli.*, 1997) e catepsina (Rawlings *et alli.*, 1992; Slack *et alli.*, 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 (Volkman & Hom, 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 alli.*, 1995; Hawtin *et alli.*, 1997). A desintegração do inseto infectado pelo AcMNPV é vantajosa, pois permite uma disseminação máxima de poliedros no ambiente (Saville *et alli.*, 2004), o mesmo não acontece com o AgMNPV, pois ele não possui o gene da quitinase e da catepsina (Wolff *et alli.*, 2004), dificultando a disseminação dos poliedros no ambiente e, conseqüentemente, a infecção de outros insetos. Essa disseminação dos poliedros pode acontecer quando bactérias colonizam larvas mortas pelo AgMNPV, ocorrendo a liberação. A introdução da quitinase no genoma do baculovírus AcMNPV, nesse trabalho, não demonstrou alteração no tempo de morte em relação ao baculovírus selvagem, porém bioensaios com poliedros para estimar a LD₅₀ são necessários para verificar se ocorre algum efeito pela inoculação oral.

O gene da catepsina e da queratinase de *A. fumigatus* foi também introduzido no vetor de transferência p2100 (Hallwass, 2005), visando à introdução no genoma do AgMNPV para controle da lagarta da soja *A. gemmatalis*. Mais de dois milhões de hectares de soja têm sido tratado anualmente nos últimos anos, representando cerca de 10% da área cultivada no Brasil (Moscardi, comunicação pessoal). Bioensaios utilizando *A. gemmatalis* se fazem necessários para comparação da redução do tempo de morte em relação ao vírus selvagem.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A introdução dos genes das proteases catepsina-L 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, cuja área total tratada no País é superior a 2 milhões de ha de soja (Moscardi, comunicação pessoal) para controle da lagarta da soja *A. gemmatalis*. Além disso, a introdução do gene da quitinase de *M. anisopliae* no genoma do AcMNPV não alterou sua virulência contra *S. frugiperda*.

Visando dar continuidade ao trabalho, pretende-se:

1. Isolar baculovírus AgMNPV recombinantes contendo os genes catepsina-L e queratinase;
2. Realizar bioensaios com a lagarta da soja *A. gemmatalis* com a utilização dos baculovírus selvagem e recombinantes construídos;
3. Realizar bioensaios com a lagarta *H. virescens* com a utilização dos baculovírus AcMNPV selvagem e recombinantes construídos vSynCAT e vSynQUERAT e vSynQUIT por via oral; e
4. Realizar ensaio enzimático para o vírus selvagem e recombinante construído vSynQUIT, bem como repetir a detecção de atividade proteolítica em gel de poli-acrilamida dos baculovírus utilizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRENNE, K.J.; PELTOMAA, E.; HYTÖNEN, V.P.; LAITINEN, O.H.; YLÄ-HERTTUALA, S. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research** v. 31, N° 17, 2003.

ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology** v. 131, p. 21-29, 1986.

AYRES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* Nuclear polyhedrosis virus. **Virology** v. 202, p. 586-605, 1994.

BLANCO, J.L.; HONTECILLAS, R.; BOUZA, E.; BLANCO, I.; PELAEZ, T.; MUÑOZ, P.; MOLINA, J.P.; GARCIA, M.E. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology** v. 40(5), p. 1811–1813, 2002.

BARRETT, A.J. & RAWLINGS, N.D. Proteinases. **Biochemical Society Transactions** v. 19, p. 707-715, 1991.

BARRETT, J.W.; BROWNRIGHT, A.J.; PRIMAVERA, M.J.; PALLI, S.R. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. **Journal of Virology** v. 72, p. 3377-3382, 1998.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.

BONNING, B.C.; BOOTH, T.F.; HAMMOCK, B.D. Localization of juvenile hormone esterase during development in normal and in recombinant baculovirus-infected larvae of the moth *Trichoplusia ni*. **Tissue Cell** v. 24, p. 267–282, 1992.

_____, ROELVINK, P.W.; VLAK, J.M.; POSSEE, R.D.; HAMMOCK, B.D. Superior expression of juvenile hormone esterase and β -galactosidase from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus compared to the p10 protein and polyhedrin promoters. **Journal of General Virology** v. 75, p.1551– 1556, 1994.

_____, & HAMMOCK, B.D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. **Annual Review of Entomology** v. 41, p. 191-210, 1996.

_____, WARD, V.K.; VAN MEER, M.M.; BOOTH, T.F.; HAMMOCK, B.D. Disruption of lysosomal targeting is associated with insecticidal potency of juvenile

hormone esterase. **Proceeding of National Academic of Science** v.94, N° 12 p. 6007-6012, 1997.

_____, POSSEE, R.D.; HAMMOCK, B.D. Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 73, N° 2, p. 234-236, 1999.

_____, BOUGHTON, A.J.; JIN, H.; HARRISON, R.L. Genetic enhancement of baculovirus insecticides. In: Upadhyay, R.K. (Ed.), **Advances in Microbial Control of Insect Pests**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 109–125, 2002.

BRESSOLIER, P.; LETORNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a Keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 65(6), p. 2570-2576, 1999.

BROWN, W.J. & FARQUHAR, M.G. The mannose-6-phosphate receptor for lysosomal enzymes is concentrated in cis Golgi cisternae. **Cell** v. 36, p. 295-307, 1984.

BURDEN J.P.; HAILS R.S.; WINDASS J.D.; SUNER M.M.; CORY J.S. 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** v. 75(3), p. 226-36, 2000.

CARBONELL, L.F.; HODGE, M.R.; TOMALSKI, M.D.; MILLER, M.K. Synthesis of a gene coding for an insect specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. **Gene** v. 73, p. 409-18, 1988.

CARPES, M.P. **Apoptose e Baculovirus: gene iap-3 e análise do mutante vApAg**. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B.M. Biologia Molecular de Baculovirus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 34, N° 10, p. 1733-1761, 1999.

_____, RIBEIRO, Z.M.A; SOUZA, M.L. Infectivity of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* to different insect cell lines: Morphology, viral production, and protein synthesis. **Biological Control** v. 36, p. 299–304, 2006.

CERENIUS, L. & SODERHALL, K. The prophenoloxidase- activating system in invertebrates. **Immunological Reviews** v. 198, p. 116-126, 2004.

CHANG, J.H; CHOI J.Y; JIN, B.R; ROH, J.Y; OLSZEWSKI, J.A; SEO, S.J; O'REILLY, D.R; JE, Y.H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 84, N° 1, p. 30-37, 2003.

CHARNLEY, A.K. & St. Leger, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole ET, Hoch HC (eds) **Fungal spore disease initiation in plants and animals**. New York, London: Plenum Press, p. 267–287, 1991.

CHENG, C.H.; LIU, S.M.; CHOW, T.Y.; HSIAO, Y.Y.; WANG, D.P.; HUANG, J.J.; CHEN, H.H. Analysis of the Complete Genome Sequence of the Hz-1 Virus Suggests that It Is Related to Members of the *Baculoviridae*. **Journal of Virology** v. 76, p. 9024–9034, 2002.

CLARKE, T. & CLEM, R.J. 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. **Journal of General Virology** v.83, p.1565-1572, 2002.

CLEM, R.J. & MILLER, L.K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. **Journal of Virology** v.67, p. 3730-3738, 1993.

CORY, J.S.; HIRST, M.L.; WILLIAMS, T.; HAILS, R.S.; GOULSON, D.; GREEN, B.M.; CARTY, T.M.; POSSEE, R.D.; CAYLEY, P.J.; BISHOP, D.H.L. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature** v. 370, p.138–140, 1994.

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

DAIMON, T.; HAMADA, K.; MITA, K.; OKANO, K.; SUZUKI, M.G.; KOBAYASHI, M.; SHIMADA, T. A *Bombyx mori* gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v.33, p. 749–759, 2003.

DALMOLIN, C.C.; da SILVA, F.R.; MELO, L.V.; RIGDEN, D.J.; CASTRO, M.E. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research** v. 110(1-2), p. 99-109, 2005.

DANYLUK, G.M. & MARUNIAK, J.E. *In vivo* and *in vitro* host range of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 50, p. 207-212, 1987.

DE LA VEGA, H.; SPECHT, C.A.; LIU, Y.; ROBBINS, P.W. Chitinases are a multi-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. **Insect Molecular Biology** v. 7, p. 233–239, 1998.

DWYER, K.G. & GRANADOS, R.R. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their in vitro translation products. **Journal of Virology** v. 62, p. 1535-1542, 1988.

ELDRIGDE, R.; O'REILLY, D.R.; HAMMOCK, B.D.; MILLER, L.K. Insecticidal properties of genetically engineered baculovirus expressing an insect juvenile hormone esterase gene. **Applied and Environmental Microbiology** v. 58, N° 5, p 1583-1591, 1992.

ENGELHARD, E.K.; KAM-MORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* Multiple nucleopolyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 91, p. 3324-3327, 1994.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. p. 33-59. In: Lois K. Miller. **The baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MONATH, T.P.; MELNICK, J.L.; ROIZMAN, B.; SRAUS, S.E. **Field-Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 2950, 2001.

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. (Eds.). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology** v. 2, p. 117-123, Supplement, 1991.

FROSCO, M.; CHASE, T.; MACMILLAN, J.D. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity** v. 60, p. 728-734, 1992.

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** v. 56, p. 472-474, 2000.

FUNK, C.J. & CONSIGLI, R.A. Evidence for zinc binding by two structural proteins of *Plodia interpunctella* granulosis virus. **Journal of Virology** v. 66(5), p. 3168-3171, 1992.

FUXA, J.R. Insect Control with baculovirus. **Biotechnology Advances** v. 9, p. 425-442, 1991.

_____, MITCHELL, F.L.; RICHTER, A.R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and the laboratory. **Entomophaga** v. 33 p. 55-63, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.D.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ**, p. 920, 2002.

GOODAY, G.W. Aggressive and defensive roles for chitinases. In **Chitin and Chitinases** (ed. R. A. A. Muzzarelli and P. Jolles), p. 157-169. Basel: Birkhäuserverlag, 1999.

GILLESPIE, A.T. Use of fungi to control pests of agricultural importance. In: Burge MN (ed) **Fungi in biological control systems**. Manchester: Manchester University Press, p. 37-60, 1988.

GOPALAKRISHNAN, B.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 25, p. 255-265, 1995.

GORMAN, M.J. & PASKEWITZ, S.M. Mosquito immunity and malaria parasites. **American Entomologist** v. 45, p. 80-94, 1999.

_____, ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anophelesambiae* hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 30, p. 35-46, 2000 a.

_____, ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene** v. 251, p. 9-17, 2000 b.

_____, & PASKEWITZ, S.M. Serine Proteases as mediator of mosquito immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 31, p. 257-262, 2001.

GRANADOS, R.R.; GUOXUN, L.; DERSKSEN, A.C.G.; MCKENNA, K.A.A. new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 64, p. 260-266, 1994.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** v. 69, N° 4, p. 447-448, 1976.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC. v. 1, p. 177-202, 1986.

GROSS, C.H. & SHUMAN, S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5' triphosphatase. **Journal of Virology**, v. 72(9), p. 7057-7063, 1998.

GUARINO, L.A.; XU, B.; JIN, J.; DONG, W. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology**, v. 72(10), p. 7985-7991, 1998.

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 – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília 2005.

HAMMOCK B.D.; BONNING B.; POSSEE R.D.; HANZLIK T.N.; MAEDA S. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. **Nature** v. 344, p. 458-461, 1990.

HANDLER, A.M. Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 32, p. 1211–1220, 2002.

HARRISON, R.L. & BONNING, B.C. Use of Proteases to Improve the Insecticidal Activity of Baculoviruses. **Biological Control** v. 20, p. 199–209, 2001.

HAWTIN, R.E.; ARNOLD, K.; AYRES, M.D.; ZANOTTO, P.M.; HOWARD, S.C.; GOODAY, G.W.; CHAPPELL, L.H.; KITTS, P.A.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology** v. 212, p. 673–685, 1995.

_____, ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; KUZIO, J.A.; POSSEE, R.D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology** v. 238, p. 243–253, 1997.

HERNIOU, E.A.; LUQUE, T.; CHEN, X.; VLAK, J.M.; WINSTANLEY, D.; CORY, J.S.; O'REILLY, D.R. Use of Whole Genome Sequence Data To Infer Baculovirus Phylogeny. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8117–8126, 2001.

_____, OLSZEWSKI, J.A., J.A.; CORY, J.S.; O'REILLY, D.R. The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. **Annual Review of Entomology** v. 48, p.211–34, 2003.

HINK, W.F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature** v. 226, p. 466-467, 1970.

HOFFMANN CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja**, Londrina, PR, Brasil, Documentos 10, p. 23 , 1985.

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 discs. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, p.15258–15264, 1994.

_____, & 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** v. 240, p. 443–447, 1996.

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

HUGHES, P.R.; WOOD, H.A.; BREEN, J.P.; SIMPSON, S.F.; DUGGAN, A.J.; DYBAS, J.A. Enhanced bioactivity of recombinant baculoviruses expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pests. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 69, p. 112-118, 1997.

HUGHES, A.L. & FRIEDMAN, R. Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculoviruses. **Molecular Biology and Evolution** v. 20, p. 979-987, 2003.

IMAI, N.; ALI, S.E.S.; EL-SINGABI, N.R.; IWANAGA, M.; MATSUMOTO, S.; IWABUCHI, K.; MAEDA, S. Insecticidal effects of a recombinant baculovirus expressing a scorpion toxin Lqh&IT2. **F Seric Sci Fpn** v. 69, p.197-205, 2000.

ISHIDO, K. & KOMINAMI, E. Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. **Journal of Biological Chemistry** v. 379, p.131-135, 1998.

JARVIS, D.L.; REILLY, L.M.; HOOVER, K.; SCHULTZ, C.; HAMMOCK, B.D.; GUARINO, L.A. Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides. **Biological Control** v. 7, p. 228-235, 1996.

_____, Baculovirus expression vectors. In L.K. Miller (ed.). **The Baculoviruses**. Plenum Press, New York p. 389-431, 1997.

JEHLE, J.A.; NICKEL, A.; VLAK, J.M.; BACKHAUS, H. Horizontal escape of the novel Tc1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus. **Journal of Molecular Evolution** v. 46, p.215-224, 1998.

JOHNSON, D.W. & MARUNIAK, J.E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology** v. 70, p. 1877-1883, 1989.

KAGEYAMA, T. & TAKAHASHI, S. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. **European Journal of Biochemistry** v. 193, p. 203-210, 1990.

KEDDIE, B.A.; APONTE, G.W.; VOLKMAN, L.E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. **Science** v. 243, p. 1728-1730, 1989.

KIM, M.G.; SHIN, S.W.; BAE, K.S.; KIM, S.C.; PARK, H.Y. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 28, p. 163-171, 1998.

KITTS, P.A.; AYRES, M.D.; POSSEE, R.D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. **Nucleic Acids Research** v. 18, p. 5667-5672, 1990.

KOLATTUKUDY, P.E.; LEE, L.D.; ROGERS, L.M.; ZIMMERMAN, P.; CESELSKI, S.; FOX, B.; STEIN, B.; COPELAN, E.A. Evidence for a possible involvement of an elastolytic serine protease in Aspergillosis. **Infection and Immunity** v. 61, N° 6, p. 2357-2368, 1993.

KORNFELD, S. Trafficking of lysosomal enzymes. **The FASEB Journal** 1, review p. 462-468, 1987.

_____, & MELLMAN, I. The biogenesis of lysosomes. **Annual Review of Cell Biology** v. 5, p. 483-525, 1989.

KOTHARY, M.; CHASE, H.T.; MACMILLAN, J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. **Infection and Immunity** v. 43, p. 320-325, 1984.

KRAMER, K.J.; CORPUZ, L.; CHOI, H.K.; MUTHUKRISHNAN, S. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v.23, p. 691- 701, 1993.

_____, & MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 27, p. 887-900, 1997.

LARCHER, G.; BOUCHARA, J.P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D.; TRONCHIN, G. Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. **FEBS Lett** v. 308, p. 65-69, 1992.

LIMA, L.; PINEDO, F.J.; RIBEIRO, B.M.; ZANOTTO, P.M.; WOLFF, J.L. Identification, expression and phylogenetic analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) Helicase gene. **Virus Genes** v. 29(3), p. 345-52, 2004.

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

LEHANE, S.M.; ASSINDER, S.J.; LEHANE, M.J. 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** v. 254, p. 290-296, 1998.

LERCH, R.A. & FRIESEN, P.D. The baculovirus-integrated retrotransposon TED encodes gag and pol proteins that assemble into viruslike particles with reverse transcriptase. **Journal of Virology** v. 66, p. 1590-1601, 1992.

LIU, J.C. & MARUNIAK, J.E. Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis bases upon GP41 and polyhedrin genes. **Virus Research** v. 64, N° 2, p. 187-196, 1999.

LU, A.; SESHAGIRI, S.; MILLER, L.K. Signal sequence and promoter effects on the efficacy of toxin-expressing as biopesticides. **Biological Control** v. 7, p. 320-332, 1996.

_____, & MILLER, L.K. Regulation of baculoviruses late and very late expression. p. 193-216. Em: Lois K. Miller. **The baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

LUCKOW, V.A. & SUMMERS, M.D. Trends in development of baculovirus expression vectors. **Bio/Technology** v. 119. p. 184-189, 1988.

_____, LEE, S.C.; BARRY, G.F.; OLINS, P.O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **Journal of Virology** v. 67, p. 4566-4579, 1993.

MAEDA, S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. **Biochemical Biophysical and Research Communication** v. 165, N° 3, p. 1177-83, 1989.

_____, VOLRATH, S.L.; HANZLIK, T.N.; HARPER, S.A.; MADDOX, D.W. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. **Virology** v. 184, p. 777-80, 1991.

MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YUH KOLATTUKUDY, P.E. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immuno electromicroscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. **Infection and Immunity** v. 62, p. 2149-2157, 1994.

MARTENS, J.W.; KNOESTER, M.; WEIJTS, F.; GROFFEN, S.J.; HU, Z.; BOSCH, D.; VLAK, J.M. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* Cry IA(b) crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 66, N° 3, p. 249-257, 1995.

MARTIGNONI, M.E. Baculovirus: an attractive biological alternative. In: GARNER, W.Y.; HARVEY JUNIOR, J. (Eds.). **Chemical and biological controls in forestry**. Washington, D.C.: American Chemical Society. p. 55-67. (ACS Symposium Series, 238), 1984.

MARUNIAK, J.E.; Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The Biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC. v. 1, p. 129-146, 1986.

MCCUTCHEN, B.F.; CHOUDARY, P.V.; CRENSHAW, R.; MADDOX, D.; KAMITA, S.G.; PALEKAR, N.; VOLRATH, S.; FOWLER, E.; HAMMOCK, B.D.; MAEDA, S. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. **Biotechnology** v. 9, p. 848-52, 1991.

MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (eds). **Controle biológico** v. 1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, p. 264, 1998.

MERRYWEATHER, A.T.; WEYER, U.; HARRIS, M.P.G.; HIRST, M.; BOOTH, T.; POSSEE, R.D. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* ssp. kurstaki HD-73 delta endotoxin. **Journal of General Virology** v. 71, p. 1535-44, 1990.

MERZENDORFER, H. & ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology** v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MIKITANI, K.; SUGASAKI, T.; SHIMADA, T.; KOBAYASHI, M.; GUSTAFSSON, J.A. The chitinase gene of the silkworm, *Bombyx mori*, contains a novel Tc-like transposable element. **Journal of Biological Chemistry** v. 275, p. 37725-37732, 2000.

MILLER, D.W. & MILLER, L.K. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. **Nature** v. 299, p. 562-564, 1982.

_____, SAFER, P.; MILLER, L.K. An insect baculovirus host-vector for high-level expression of foreign genes. In: SETLOW, J.K.; HOLLAENDER, A. (Eds.). **Genetic engineering**. New York: Plenum. p. 277-298, 1986.

MILLER, L.K.; MILLER, D.; ADANG, M. An insect virus for genetic engineering: developin baculovirus polyhedron substitution vectors. In P. Lurquin & A. Kleinhofs (eds), **Genetic engineering in eukaryotes**. New York, Plenum Press. p. 89-97, 1983.

_____, The baculoviruses. New York: Plenum. Thiem, S.M. Du, X. ; QUENTIN, M.A. (1996) Identification of a baculovirus gene *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in nonpermissive insect cell line. **Journal of Virology** v. 70(4), p. 2221-2229, 1997.

MONOD, M.; PARIS, S.; SANGLARD, D.; JATON-OGAY, K.; BILLE, J.; LATGE, J.P. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity** v. 61, p. 4099-4104, 1993.

MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus *Anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina: Embrapa-CNPSO. p. 13, **Embrapa-CNPSO. Comunicado técnico**, 23, 1983.

_____, The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 84, p. 51-56, 1989.

_____, Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 509-539, 1998.

_____, & CORREA-FERREIRA, B.S. Biological control of soybean caterpillars. In: **World Soybean Research Conference**, 3; 1984, Ames. Proceedings. Boulder: Westview. p. 703-711, 1985.

_____, & SOSA-GÓMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, I.G.; GREEN, M.B.; REEDS, R.T. (Eds.). Pest management in soybean. London: **Elsevier Applied Science**, p. 98-109, 1992.

_____, & SOSA-GÓMEZ, D.R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: **International Crop Science Congress**, 1; Ames, Iowa, 1992. International crop science I. Madison: Crop Science Society of America, p. 115-119, 1993.

_____, & SOSA-GÓMEZ, D.R. Utilización de virus a campo. In: LECUONA, R.E. (Ed.). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires: **Taller Mariano Mass** p. 261-276, 1996.

MOSER, M.; MENZ, G.; BLASER, K.; CRAMERI, R. Recombinant expression and antigenic properties of a 32-kilodalton extracellular alkaline protease, representing possible virulence factor from *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity** v. 62, p. 936-942, 1994.

MUNIER, A.R.; MEDZHITOV, R.; JANEWAY, JR, C.A.; DOUCET, D.; CAPOVILLA, M.; LAGUEUX, M. graal: a Drosophila gene coding for several mosaic serine proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 34, p. 1025-1035, 2004.

MURPHY, F.A.; FAUKQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.). Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. New York: Springer-Verlag Wien, **Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** p. 104-113, 1995.

NAKAJIMA, Y.; TSUJI, Y.; HOMMA, K-I.; NATORI, S. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). **Journal of Biological Chemistry** v. 38, p. 23805-23810, 1997.

NAKAZAWA, H.; TSUNEISHI, E.; PONNUVEL, K.M.; 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** v. 321, p. 154-162, 2004.

O'REILLY, D.R. & MILLER, L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science** v. 245, p. 1110-1112, 1989.

_____, & MILLER, L.K. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyl transferase gene. **Journal of Virology** v. 64, p. 1321-1328, 1990.

_____, MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York. W.H. Freeman and Company, 1992.

_____, Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 25(5), p. 541-50, 1995.

PANG, Y.; FRUTOS, R.; FEDERICI, B.A. Syntesis and toxicity of full-lenght and truncated bacterial Cry IVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector. **Journal of General Virology** v. 73, N° 1 p. 89-101, 1992.

_____, YU, J.; WANG, L.; HU, X.; BAO, W.; LI, G.; CHEN, C.; HAN, H.; HU, S.; YANG, H. Sequence Analysis of the *Spodoptera litura* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Genome. **Virology** v. 287, p. 391-404, 2001.

PASSARELLI, A.L. & MILLER, L.K. 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** v.197, p.704-714, 1993.

PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie** v. 32, p. 183-200, 1986.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* b-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology** v. 4, p. 399-406, 1984.

PERECMANIS, S. **Construção de um baculovirus recombinante com o gene de serino protease fúngica**. Tese de doutorado – Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

PILLOFF, M.G.; BILEN, M.F.; BELAICH, M.N.; LOZANO, M.E.; GHIRINGHELLI, P.D. Molecular cloning and sequence analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus GP64 glycoprotein. **Virus Genes** v. 26, p. 57-69, 2003.

PINEDO, F.J.R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J.A.; RIBEIRO, B.M. Inactivation of the Ecdysteroid UDP-glucostransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. **Biological Control** v. 27, p. 336-344, 2003.

PRIKHOD'KO, G.G.; POPHAM, H.J.R.; FELCETTO, T.J.; OSTLIND, D.A.; WARREN, V.A.; SMITH, M.M.; GARSKY, V.M.; WARMKE, J.W.; COHEN, C.J.; MILLER, L.K. Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes

on the properties of baculoviruses as biopesticides. **Biological Control** v.12, p. 66-78, 1998.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology reviews** p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N.D.; PEARL, L.H.; BUTTLE, D.J. The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome includes a papain-like sequence. **Biology and Chemistry** v. 373, p.1211-1215, 1992.

_____, & BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal** v. 290, p. 205-218, 1993.

_____, O'BRIEN, E.; BARRETT, A.J. MEROPS: the protease database. **Nucleic Acids Research** v. 30, p. 343-346, 2002.

RAZUCK, F.B.; RIBEIRO, B.; VARGAS, J.H.; WOLFF, J.L.; RIBEIRO, B.M. Characterization of the p10 gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes** v. 23, p. 243-247, 2002.

RIBEIRO, B.M. & CROOK N.E. 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** v. 62, N° 2, p. 121-130, 1993.

_____, & CROOK, N.E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal Medical Biological Research** v. 31, N° 6, p. 763-769, 1998.

_____, & PINEDO, F.J.R. Baculovirus recombinante para controle de praga. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento** v. 22, p. 50-58, 2001.

_____, SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, B.S. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, Unesp, p. 481-503, 1998.

RICHARDSON, C.D. (Ed.). Baculovirus expression protocols. Totowa: Humana, p. 418. **Methods in Molecular Biology** 39, 1995.

RODRIGUES, J.C.M.; SOUZA, M.L.; REILLR, D.O.; VELLOSO, L.M.; PINEDO, F.J.R.; RAZUCK, F.B.; RIBEIRO, B.; RIBEIRO, B.M. Characterization of the Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes** v. 22, N° 1, p. 103-112, 2001.

ROELVINK, P.W.; VAN MEER, M.M.M.; DE KORT, C.A.D.; POSSEE, R.D.; HAMMOCK, B.D. Temporal expression of *Autographa californica* nuclear

polyhedrosis virus polyhedrin and p10 gene. **Journal of General Virology** v. 73, p.1481-89, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 2. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

_____, & ROUSSELL, D.W. **Molecular Cloning A Laboratory Manual** 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 2001.

SANTANA, J.M. **Identificação, purificação e caracterização de proteases do *Trypanosoma cruzi* com atividades sobre colágeno e peptídeos fluorogênicos**. Tese de Doutorado, Departamento de Patologia. Universidade de Brasília, Brasília, p.132, 1993.

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

_____, FIRMINO, A.A.P.; DE SÁ, C.M.; FELIX, C.R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology** v. 33, p. 364-370, 1996.

SAVILLE, G.P.; THOMAS, C.J.; POSSEE, R.D.; KING, L.A. Partial redistribution of the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* chitinase in virus-infected cells companies mutation f the carboxy-terminal KDEL ER-retrieval motif. **Journal of General Virology** v. 83, p. 685–694, 2002.

_____, PATMANIDI, A.L.; POSSEE, R.D.; KING, L.A. Deletion of the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* chitinase KDEL motif and *in vitro* and *in vivo* analysis of the modified virus. **Journal of General Virology** v. 85, p. 821–831, 2004.

SECCHI, V.A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos, **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável** v.3, Nº 3, 2002.

SIEBURTH, P.J. & MARUNIAK, J.E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology** v. 24, p. 195-198, 1988.

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** v. 31, p. 521–532, 2001.

SLACK, J.M.; 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** v. 76, p. 1091-1098, 1995.

_____, RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L. The gp64 locus of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks v-cath and ChiA genes. **Journal of General Virology** v. 85, p. 211-219, 2004.

_____, & SHAPIRO, M. *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus v-trex gene encodes a functional 3' to 5' exonuclease. **Journal of General Virology** v. 85 (Pt 10), p. 2863-71, 2004.

SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular weight protein. **Journal of Virology** v. 45, p. 215-225, 1983.

_____, FRASER, M.J.; SUMMERS, M.D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations the polyhedron gene. **Journal of Virology** v. 46, p. 584-493, 1983 a.

_____, FRASER, M.J.; SUMMERS, M.D. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology** v.3, p. 2156-2165, 1983 b.

SMITH, C.R.; HEINZ, K.M.; SANSONE, C.G.; FLEXNER, J.L. Impact of recombinant baculovirus applications on target heliothines and nontarget predators in cotton. **Biological Control** v. 19, p. 201–214, 2000.

SOUZA, M.L.S.; CASTRO, M.E.B; SILHER, W.; RIBEIRO, Z.M.A.; MOSCARDI, F. Caracterização de baculovirus utilizados no controle de pragas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento** v. 24, p. 18-20, 2002.

St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 58, p. 415-426, 1991.

_____, JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; ROBERTS, D.W. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. **Mycological Research** v. 99, p. 1034–1040, 1995.

_____, JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; RIZZO, M.J.; ROBERTS, D.W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology** v. 62, p.1257–1264, 1996 a.

_____, JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; RIZZO, M.J.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology** v.62, p. 907–912, 1996 b.

STEWART, L.M.D.; HIRST, M.; FERBER, M.L.; MENYWEATHER, A.T.; CAYLEY, P. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. **Nature** p. 35285- 88, 1991.

SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. College Station, TX : Department of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station/Texas A&M University. **Texas Agricultural Experiment Station. Bulletin** 1555, p. 56, 1987.

_____, SMITH, G.E.; KNELL, J.D.; BURAND, J.P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ni* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal of Virology** v. 34, p.694-703, 1980.

SZEWCZYK, B.;HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO DE SOUZA M. Baculoviruses re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances** v. 24, p.143-60, 2006.

TAKAHASHI, S.Y.; YAMAMOTO, Y.; SHIONOYA, Y.; KAGEYAMA, T. Cysteine proteinase from the eggs of the Silkmoth, *Bombyx mori*: Identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Biochemistry** v. 114, p. 267-272, 1993.

TANI, H.; LIMN, C.K.; YAP, C.C.; ONISHI, M.; NOZAKI M.; NISHIMUNE Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. **Journal of Virology** v. 77, p. 799-808, 2003.

THIEM, S.M.; DU, X.; QUENTIN, M.E.; BERNER, M.M. Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. **Journal of Virology** v. 70(4), p. 2221-2229, 1996.

THOMAS, C.J.; BROWN, H.L.; HAWES, C.R.; LEE, B.Y.; MIN, M.K.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. **Journal of Virology** v. 72, p.10207–10212, 1998.

_____, GOODAY, G.W.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *chiA* gene. **Journal of General Virology** v. 81, p. 1403-1411, 2000.

TODD, J.W.; PASSARELLI, A.L.; LU, A.; MILLER, L.K. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. **Journal of Virology** v. 70, p. 2307-2317, 1996.

TOMALSKI, M.D. & MILLER, L.K. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. **Nature** p. 35282-85, 1991.

_____, & MILLER, L.K. Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides. **Biotechnology** v. 10, p. 545-49, 1992.

TREACY, M.F. & ALL, J.N. 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**. Nashville, TN, 1996.

_____, RENSNER, P.E.; ALL, J.N. Comparative insecticidal properties of two nucleopolyhedrovirus vectors encoding a similar toxin gene chimer. **Journal of Economic Entomology** v. 93, p. 1096–1104, 2000.

TURNIPSEED, S.G. & KOGAN, M. Integrated control of insectpests. In: WILCOX, J.R. (Ed.). Soybeans: improvement, production and uses. **Madison: Agronomy** p. 779-817, 1987.

VALICENTE, F.H. & CRUZ, I. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus. **Circular Técnica** 15, Embrapa/CNPMS, 1991.

VAN BEEK, N.A.M. & HUGHES, P.R.; The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 72, p. 338–347, 1998.

VAN REGENMORTEL, .M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VAUGH, J.L.; GOODWIN, R.H.; TOMPKINS, G.L.; MCCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro** v. 13, p. 213–217. 1977.

VOLKMAN, L.E. & KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology** v. 1, p. 249-256, 1990.

_____, & HOM, G. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus chiA Is Required for Processing of V-CATH. **Virology** v. 277, p. 178- 183, 2000.

VON FIGURA, K. & HASILI, A. Lysosomal enzymes and their receptors **Annual Review of Biochemistry** v. 55, p. 167-193, 1986.

WANG, X.; OOI, B.G.; MILLER, L.K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene** v.100, p. 131-137, 1991.

WILLIAMS, G.V. & FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In: MILLER, L.K. **The baculoviruses**. Plenum New York p. 61-107, 1997.

WILLIS, L.G.; SEIPP, R.; STEWART, T.M.; ERLANDSON, M.A.; THEILMANN, D.A. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. **Virology** v. 338, p. 209 – 226, 2005.

WINSTANLEY, D. & CROOK, N.E. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. **Journal of General Virology** v. 74, p. 1599-1609, 1993.

WOLFF, J.L.C.; RIBEIRO, B.M.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J.E.; MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L.; CASTRO, M.E.B.; ZANOTTO, P.M.A. The *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) genome. **XV Encontro Nacional de Virologia** 26-29 setembro, São Pedro- SP, 2004.

XU, B.; YOO, S.; GUARINO, L.A. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. **Journal of Virology** v. 69(5), p. 2912-2917, 1995.

YAN, J.; CHENG, Q.; LI, C.B.; AKSOY, S. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Molecular Biology** v 10, p. 47–56, 2001.

YARYGIN, D.; KLUNOVA, S.; FILIPPOVICH, Y. Isolation, purification, and properties of cysteine proteinase from *Bombyx mori* L. eggs. **Biochemistry** (Mosc) v. 68, p. 63-67, 2003.

YOUSEF, G.M.; KOPOLOVIC, A.D.; ELLIOT, M.C.; DIAMANDIS, E.P. Genomic overview of serine proteases. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 305, p. 28-36, 2003.

ZANOTTO, P.M.A.; SAMPAIO, M.J.A.; JOHNSON, D.W.; ROCHA, T.L.; MARUNIAK, J.E. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. **Journal of General Virology** v. 73, p. 1049-1056, 1992.

_____, KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 62, p. 147-164, 1993.

ZHENG, Y.P.; ZHENG, S-C.; CHENG, X-W.; LADD, T.; LINGOHR, E.J.; KRELL, P.J.; ARIF, B.M.; RETNAKARAN, A.; FENG, Q-L. A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** N° 32, p. 1813-1823, 2002.

_____, RETNAKARAN, A.; KRELL, P.J.; ARIF, B.M.; PRIMAVERA, M.; FENG, Q.L. Temporal, spatial and induced expression of chitinase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Insect Physiology** v. 49, p. 241–247, 2003.

ZHU, Q.; DENG, Y.; VANKA, P.; BROWN, S.J.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J. Computational identification of novel chitinase-like proteins in the *Drosophila melanogaster* genome. **Bioinformatics** v. 20, p. 161–169, 2004.

ZLOTKIN, E.; FIZHMAN, Y.; ELAZAR, M. AsIT: From neurotoxin to insecticide. **Biochemie** v. 82, p. 869-881, 2000.