



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

**Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de
aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante
infecção *in vitro***

DANIEL MENDES P. ARDISSON DE ARAÚJO

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Brasília, 2012.



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

**Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de
aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante
infecção *in vitro***

DANIEL MENDES P. ARDISSON DE ARAÚJO

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2012.

DANIEL MENDES P. ARDISSON DE ARAÚJO

Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante infecção *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Orientador) (CEL – UnB)

Prof. Dra. Kelly Grace Magalhães (FS/CEL – UnB)

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco (UCB)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Suplente) (CEL – UnB)

*“Posso não ter sentido, mas é a mesma falta de sentido
que tem a veia que pulsa”.*

Clarice Lispector

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”.

Theodosius Dobzhansky

*“E ainda que eu não mereça, permaneces assim:
fiel, Senhor, Meu Deus, fiel a mim”.*

Eyshila

“E conhecereis a verdade e a verdade vos libertará”.

João 8:32

*“Ao meu precioso Deus,
fonte de toda minha força e decisão,
Às minhas mães, Geovany (Jô) e Estelita,
razões físicas da minha existência,
e o motivo real de minha busca pela felicidade
Ao meu irmão, Moza, que eu tanto amo”.*

Dedico

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, amigo fiel e companheiro de todas as horas.

Agradeço a minha família, minha maravilhosa família (meu irmão, Moza; minha mãe, Jô; e minha mãezona, Estelita) por todo apoio emocional, por toda ajuda e auxílio nessa grande jornada. Vocês sabem o quanto foi difícil esta caminhada! Ao meu pai João que não está mais conosco, muito do que tenho eu devo a você e agradeço a sua memória. Veremo-nos em breve no céu. Aos meus tios (Gilvan e Jeovair), às minhas tias (Helisiana e Lúcia) e aos meus sobrinhos Artur, Geovanna e Ludmilla; pessoas que eu amo muito.

Agradeço ao meu professor e orientador, em quem me espelho, prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro. Homem íntegro, ético, profissional, de índole inquestionável e sábio. É bom poder contar com o senhor sempre; com sua confiança e torcida. Espero nunca decepcioná-lo!

Agradeço ao meu grande amigo, Djalma (te amo muito, muito). É bom dividir problemas com você! Você é o amigo que eu pedi a Deus. É bom te ouvir também!

Agradeço aos meus grandes amigos Roberto e Carol, especiais em vários aspectos. Amo muito vocês. Roberto com sua gentileza, empatia e principalmente humildade; espero que você ganhe o mundo; e conquiste todos os seus sonhos! Sua realizações também são minhas!

A minha querida amiga Liliane (Lili), sinto falta de nossas discussões filosóficas.

Aos meus importantes amigos Cláudia e Leandro que eu tanto amo. Chegaram e me conquistaram de uma forma inexplicável. Amo muito vocês.

Minha amiga querida, Arisai!

Ao meu pastor, Manuel Xavier e sua esposa, irmã Marta; pessoas queridas com quem sei que posso contar sempre; exemplos na minha vida, que admiro e respeito muito. Obrigado pelas orações. Estendo este agradecimento às irmãs da igreja que amo muito.

Aos amigos e irmãos Fábio, Valéria, Wall, Patrícia, Samella e Nicole (sempre torcendo por mim).

Aos meus amigos do laboratório de baculovírus (em ordem alfabética, para não ter problema): Anabele (Bele – mora no meu coração e nunca pagará aluguel, mas se quiser me pagar com bolo de chocolate, eu aceito!), Ana Carolina (Carol – amiga de todos os momentos, conte sempre comigo!), Briana (Bri – agradeço por sempre podermos conversar francamente, é bom ter você como amiga), Clara (Clarinha, nem sei dizer o quanto sinto sua falta!), aos promissores futuros pesquisadores Daniele e Miguel, amigos de quem eu me orgulho muito (sempre responderei suas perguntas; ao menos tentarei!), rs), Fábria e Mariana Senna (amigas, confidentes, irmãs em Cristo, que o Senhor conserve nossa amizade e nos faça crescer juntos; você são mais que especiais na minha vida!), Fabrício (meu amigo e parceiro de trabalho a quem admiro muito. É bom poder contar sempre com você), Dr. Fernando Lucas (amigo novo, mas já conquistou espaço. E um grande espaço. Obrigado por todos os momentos de implicância), Franklyn (irmão em Cristo), Greice Kelly (como sinto falta de você, mora no meu coração!), Lorena (Loris – uma amiga com quem eu sei que posso sempre contar; te amo! Caminharemos junto nessa nova jornada), Mariana Colasso (Mari, sinto falta de você sempre; te amo muito. É bom te ver feliz!), Maria (que nunca percamos o vínculo de amizade; conte sempre comigo), Raíssa (nossa agente infiltrada. Pessoa especial, de um coração de oro; como você é especial e importante para mim!).

Agradeço ao professor Dr. Tatsuya Nagata por ter participado de minha qualificação e sempre me ajudar quando preciso. É bom discutir ciência com o senhor! Uma mente admirável. Além dele, agradeço às minhas queridíssimas amigas do “Japão”. Sempre cheirosas, sempre lindas, sempre educadas e prestativas: Adriana, Ana Cláudia, Bruna, Fernanda, Fran, Layssa, Natália, Nayssa, Taciele, Thais, e em especial Kelly e Karol Anjos. Além das meninas, não posso esquecer meu amigo Câmara!

Agradeço ao professor Dr. Renato Resende, admirável pesquisador, e os amigos da “Holanda” (Virologia Vegetal): André, Bruno, Fernanda, Lorraine, Mikail, Dra. Michelle, Rayanne, Dra. Virgínia e em especial meu amigo mais chato e engraçado das quebradas, Athos.

Aos amigos da graduação: Dênis, Cecília, Hérika, Fernando, Ana Paula, Hellen, Dão, e principalmente meus amigos Fernanda, Dudu, Raphael e Vinícius. Sempre especiais. Saudade das conversas depois das aulas!

Aos amigos da Microscopia Eletrônica: Felipe, Dra. Marcella, Dra. Suzi, Débora e principalmente Ingrid pelo apoio técnico e gentileza.

A minha amiga baculovirologista Saluana Rocha (Saluzinha, querida!) da Embrapa. Não posso esquecer-me de agradecer também a Dra. Marlinda e a Zildinha, e especialmente a Dra. Elita que participou de uma forma muito produtiva de minha qualificação. Estas são pessoas que eu admiro muito, muito.

Agradeço também aos amigos da igreja, Andréia, Fernando, Ana Paula; Anderson, Simoni e Gabi; Tatizinha e Tatizona; Dênis e Carla; Fernanda e Wesley. Obrigado pela torcida e pelas orações.

Agradeço a todos os meus professores que sempre colaboraram com meu aprendizado desde o Ensino Fundamental, Médio e Graduação. Sou hoje cientista, porque vocês me fizeram pensar ciência; em especial professora Michelle Medeiros (Biologia – 8ª série), Ivo Maçal (Espanhol), Queijo (3º ano), Dra. Cynthia (Microbiologia), Dr. Pujol (Entomologia), Dra. Anamélia (Imunologia), Dr. Valdir (Fisiologia Animal), Dr. Sérgio (Fisiologia Vegetal), Dra. Lídia Pepe (Biologia Molecular), Dr. Fernando Araripe (Biologia Molecular), Dra. Ildinete (Biologia Molecular) e Msc. Zara (MEB).

Agradeço à colaboradora e professora Dra. Elisabeth Schwartz; obrigado por ceder o cDNA da toxina e seu tempo para discutir e ajudar neste trabalho.

Agradeço ao colaborador e professor Dr. Gerardo Corzo por sua total atenção, prontidão e disponibilidade para enviar-nos o anticorpo do México: ‘Muchas gracias profesor,

saludos'. Além de compartilhar informações importantes para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao professor Dr. Carlos Schwatz por ter participado da minha qualificação, tão prontamente.

Agradeço a secretária Ana pela paciência e ajuda quanto a questões burocráticas.

Não posso esquecer-me de agradecer aos participantes da banca, profa. Dra. Kelly Magalhães (UnB) e prof. Dr. Octávio Luiz (UCB) que contribuíram de forma ímpar para o meu trabalho; obrigado pela paciência e pelos conselhos.

Agradeço a Universidade de Brasília por ter-me aberto esta porta para o fantástico e apaixonante mundo da ciência.

Ao CNPq.

Ao Brasil, meu maravilhoso país.

ÍNDICE

AGRADECIMENTO	vi.
ÍNDICE	x.
ÍNDICE DE FIGURAS	xii.
ÍNDICE DE TABELAS	xv.
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS	xvi.
RESUMO	xxi.
ABSTRACT	xxii.
1. INTRODUÇÃO	1.
1.1 Insetos: pragas agrícolas e vetores de doenças	1.
1.2 Controle químico de insetos e sua problemática	3.
1.3 Bioinseticidas transgênicos: uma dentre muitas possíveis soluções	5.
1.4 Baculovírus: vírus com dois fenótipos infectivos	6.
1.5 Toxinas inseticidas de aracnídeos e baculovírus recombinantes	13.
1.6 <i>Brachypelma albiceps</i> e a toxina putativa BaTx derivada de biblioteca de cDNA	16.
1.7 Baculovírus e outras aplicações	18.
1.7.1 Baculovírus como potencial vetor para terapia gênica	19.
1.7.2 Baculovírus: potente ferramenta para expressão heteróloga	20.
2 OBJETIVOS	24.
2.1 Objetivo geral	24.
2.2 Objetivos específicos	25.
3 JUSTIFICATIVA	27.
4 MATERIAL E MÉTODOS	28.
4.1 Plasmídeo e bactérias	28.
4.2 Baculovírus e células de inseto	29.
4.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento da toxina BaTx	30.
4.4 Clonagem no vetor de transferência e construção de baculovírus recombinantes vAc/occ- contendo a toxina	35.

4.5	Construção de vírus contendo a toxina BaTx fusionada a peptídeos sinais para secreção	39.
4.6	Construção de pFastBac1® modificado e geração de baculovírus recombinantes vAc/occ ⁺ por transposição	41.
4.7	Construção de baculovírus recombinantes vAc/occ ⁺ expressando a toxina ...	45.
4.8	Microscopia de células de <i>S. frugiperda</i> e <i>T. ni</i> infectadas com baculovírus recombinantes	46.
4.9	Ensaio de citotoxicidade para células de <i>S. frugiperda</i> e <i>T. ni</i>	47.
4.10	Construção dos vetores para expressão bacteriana e obtenção de anticorpos murinos	48.
4.11	Análise de expressão da toxina BaTx a nível transcricional e traducional em células de inseto	54.
5	RESULTADOS	57.
5.1	Amplificação, clonagem e construção de vírus recombinantes occ-	57.
5.2	Construção de recombinantes occ- contendo toxina fusionada a peptídeo sinal de secreção	60.
5.3	Obtenção de vetor pFastBac1 modificado a fim de gerar vírus recombinantes occ+	63.
5.4	Clonagem da toxina de aranha no vetor pFastBac1/AccI-PSX para obtenção de vírus recombinantes occ+	68.
5.5	Análise microscópica de infecções	71.
5.5.1	Infecções em células de <i>S. frugiperda</i>	71.
5.5.2	Infecções em células de <i>T. ni</i>	80.
5.6	Ensaio de viabilidade celular em linhagem de <i>S. frugiperda</i> e de <i>T. ni</i>	86.
5.7	‘Amplicon’, plasmídeos obtidos por recombinação e expressão bacteriana da toxina BaTx fusionada a cauda de hexa-histidina e a GST	92.
5.8	Análise pós-traducional de toxina BaTx	100.
6	DISCUSSÃO	101.
7	PERSPECTIVAS	115.
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipos baculovirais maduros produzidos num ciclo infectivo completo.	8.
Figura 2. Relação filogenética dos quatro gêneros da família <i>Baculoviridae</i>	11.
Figura 3. Corpos de oclusão (OB) de <i>Nucleopolyhedrovirus</i> (NPVs – Poliedros, PIBs) e <i>Granulovirus</i> (GV – Grânulos).	13.
Figura 4. <i>Brachypelma albiceps</i> Procock, 1903.	17.
Figura 5. Alinhamento de toxinas da aranha <i>B. albiceps</i> com huwentoxina.	18.
Figura 6. Células de inseto em cultura utilizadas neste trabalho.	29.
Figura 7. Região do cDNA que contém a toxina BaTx da caranguejeira <i>B. albiceps</i>	31.
Figura 8. Mapa do plasmídeo comercial pFastBac1® (Invitrogen).	36.
Figura 9. Plasmídeo para construção de baculovírus recombinantes pelo ineficiente método de recombinação homóloga.	42.
Figura 10. Esquema da reação BP clonase.	50.
Figura 11. Esquema da reação LR clonase.	51.
Figura 12. Amplificação das diferentes versões da toxina BaTx.	57.
Figura 13. Confirmação de clonagem dos fragmentos SP-Pp-BaTx, Pp-BaTx e BaTx nos vetores pGem®-T easy e pFastBac1®.	58.
Figura 14. Confirmação de transposição para três diferentes versões da toxina clonadas no vetor pFastBac1®.	60.
Figura 15. Confirmação de clonagens dos fragmentos SP(egt)-BaTx e SP(bx)-BaTx nos vetores pGem®-T easy e pFastBac1®.	62.
Figura 16. Confirmação de transposições do gene da toxina fusionada a diferentes sequências de peptídeo sinal (SP(bx)-BaTx e SP(egt)-BaTx) para o genoma do baculovírus AcMNPV.	63.
Figura 17. Obtenção do fragmento PSX, para construção de vetor pFastBac1® modificado.	64.
Figura 18. Confirmação de construção do plasmídeo pFastBac1/ <i>AccI</i> a partir do vetor pFastBac1.	66.
Figura 19. Mapa e confirmação do vetor pFastBac1® modificado que permite a construção de vírus AcMNPV recombinante occ+ por transposição.	67.

Figura 20. Células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1-4 (A) ‘mock’-infectadas ou (B, C e D) infectadas a 48 h p. i. com recombinantes.	68.
Figura 21. Confirmação de clonagem de versões da toxina no vetor pFastBac1/AccI-PSX.	69.
Figura 22. Esquema de transposição e confirmação de recombinantes bAc-BaTx/occ+, bAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e bAc-SP(bx)-BaTx/occ+.	70.
Figura 23. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus controle vAc/occ-.	72.
Figura 24. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP-Pp-BaTx/occ-.	72.
Figura 25. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-Pp-BaTx/occ-.	73.
Figura 26. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ-.	74.
Figura 27. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ-.	74.
Figura 28. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc- SP(bx)-BaTx/occ-.	75.
Figura 29. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus controle vAc/occ+.	76.
Figura 30. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ+.	76.
Figura 31. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ+.	77.
Figura 32. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc- SP(bx)-BaTx/occ+.	77.
Figura 33. Análise ultraestrutural de células IPLB-SF21-AE infectadas com recombinantes occ- a 36 h p. i.	79.
Figura 34. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus controle vAc/occ-.	81.
Figura 35. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP-Pp-BaTx/occ-.	81.
Figura 36. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-Pp-BaTx/occ-.	82.

Figura 37. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ-.	82.
Figura 38. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ-.	83.
Figura 39. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc- SP(bx)-BaTx/occ-.	83.
Figura 40. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus controle vAc/occ+.	84.
Figura 41. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ+.	85.
Figura 42. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ+.	85.
Figura 43. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc- SP(bx)-BaTx/occ+.	86.
Figura 44. Ensaio de viabilidade celular com recombinantes occ- em duas linhagens celulares.	88.
Figura 45. Comparação da viabilidade celular em diferentes linhagens infectadas por recombinantes expressando a toxina fusionada a diferentes peptídeos sinais.	89.
Figura 46. Ensaio de viabilidade celular com recombinantes occ+ em duas linhagens celulares.	91.
Figura 47. Sequência nucleotídica do fragmento attB-BaTx obtido por PCR e fragmento gerado.	93.
Figura 48. Obtenção de vetor de doação pDONR207-BaTx.	94.
Figura 49. Construção de vetor de expressão bacteriano adicionando à toxina uma cauda de hexa-histidina.	95.
Figura 50. ‘Dot ELISA’ de extratos de bactéria marcados com anti-His.	96
Figura 51. Construção de vetor de expressão bacteriano adicionando à toxina GST.	97.
Figura 52. SDS-PAGE de extratos bacterianos expressando a proteína recombinante GST-BaTx.	98.
Figura 53. SDS-PAGE de extratos bacterianos para imunomarcção com anticorpos murinos.	99.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Nome e seqüências nucleotídicas dos primers utilizados neste trabalho.	32
Tabela 2. Programa utilizado para amplificação dos três cassetes da toxina BaTx.	33
Tabela 3. Poliedros e estruturas semelhantes a poliedros produzidas em 10 g de cadáveres de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas com recombinantes occ+.	78

ABREVIACOES E SÍMBOLOS UTILIZADOS

°C	graus <i>Celsius</i>
>	maior que
6xHis	cauda de hexa-histidina
x g	velocidade de sedimentação gravitacional
AcMNPV	baculovirus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
Ac-PH	promotor da poliedrina do AcMNPV
AgMNPV	baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
Amp(R)	gene de resistência a ampicilina
<i>att</i>	do inglês, ‘attachment sites’
Ba1/Ba2	toxinas derivadas presente no veneno de <i>B. albiceps</i>
bAc	bacmídeo recombinante do AcMNPV
BaTx	toxina putativa derivada de <i>B. albiceps</i>
BCIP	sigla do inglês, ‘5-bromo-4chloro-3’-indolyphosphate p-toluidine salt’
BTI-Tn5B1-4	linhagem derivada do lepidóptero <i>T. ni</i>
BV	do inglês, ‘budded virus’ (vírus brotado)
cDNA	DNA sintetizado a partir de um RNA mensageiro
Cm(R)	gene de resistência a cloranfenicol
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Desoxirribonucleato
dNTP	Desoxinucleotídeos
dot-ELISA	do inglês, ‘Enzyme-linked immunosorbent assay in dot’
D. P.	Desvio Padrão

ECV	do inglês, 'extracellular virus'
EDTA	ácido etilenediamina tetraacético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F	primer 'Forward'
g	grama
GST	glutathione-S-transferase
Gm(R)	gene de resistência a gentamicina
GV	<i>Granulovirus</i>
h	horas
h p. i.	horas pós-infecção
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IPLB-Sf21-AE	linhagem derivada do lepidóptero <i>S. frugiperda</i>
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	kiloDalton
Km(R)	gene de resistência a canamicina
kpb	kilo-pares de bases
kV	kilovolts
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LD50	dose que mata 50% de
μ g	microgramas
μ g/ml	microgramas/mililitro
min	minutos
mini- <i>att</i> Tn7	sítio alvo de inserção do transposon Tn7
M	Molar

μl	microlitro
ml	mililitros
μm	micrômetro
μM	micromolar
mM	milimolar
M-MLV-RT	‘Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase’
MNPV	<i>multiple nucleopolyhedrovirus</i>
m. o. i.	do inglês, ‘multiplicity of infection’
MSC	do inglês, ‘multiple cloning site’
NBT	sigla, do inglês ‘nitro-blue tetrazolium chloride’
ng	nanogramas
NPV	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
OB	do inglês, ‘occlusion body’
occ+	oclusão-positiva
occ-	oclusão-negativa
ODV	do inglês, ‘do inglês ‘occluded virus’
ORF	do inglês, ‘open reading frame’
PAGE	do inglês, ‘polyacrylamide gel electrophoresis’
PBS	‘Phosphate buffered saline’
pb	pares de base
pH	concentração de íon hidroxônio livre
PIB	do inglês, ‘polyhedral inclusion bodies’
PIF	do inglês, ‘ <i>per os</i> infectivity factor’
pSyn	promotor sintético da fase tardia

PSX	P – poliedrina; S – promotor Syn; X – promotor XIV
pXIV	promotor da poliedrina modificado
R	primer ‘Reverse’
região-c	região mais carboxi do peptídeo sinal
região-h	região hidrofóbica do peptídeo sinal
região-n	região mais amino do peptídeo sinal
RNA	Ribonucleato
RT-PCR	do inglês, ‘Reverse transcription polymerase chain reaction’
s	segundo
SDS	do inglês, sodium dodecyl sulfate
SNPV	<i>Single Nucleopolyhedrovirus</i>
SP	peptídeo sinal
SP(bx)	peptídeo sinal derivado do gene <i>bombyxina</i>
SP(egt)	peptídeo sinal derivado do gene <i>egt</i>
ssDNA	desoxirribonucleato de fita-simples
ssRNA	ribonucleato de fita-simples
T7 RNAP	T7 RNA polimerase
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
Tn7	braço homólogo marcador do transposon Tn7
Tricina	N-(Tri(hidroximetil)metil)glicina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TRP	tipo de canal, do inglês ‘transient receptor potential’
U	unidade de enzima
UTR	região não-traduzida

UV	ultra-violeta
vAc	recombinante da espécie AcMNPV
V	Volts
v/v	relação volume/volume
w/v	relação peso/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopinosídeo

RESUMO

Baculovírus são vírus de DNA dupla-fita circular que infectam insetos principalmente da ordem Lepidoptera. O problema de seu uso como inseticida é o tempo que este leva para matar o inseto hospedeiro. A fim de resolver este problema, inserção de genes inseticidas no genoma viral pode ser requerida. Uma importante fonte de proteínas inseticidas é o veneno de aracnídeos, cujo alvo e ação permanecem pouco elucidados. Assim, propomos o uso de baculovírus como ferramenta para entender mecanismo de ação de peptídeos tóxicos em células de inseto. Diante disso, diferentes versões da toxina putativa BaTx derivada de biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha caranguejeira *Brachypelma albiceps* foram obtidas por PCR e usadas para construção de baculovírus recombinantes. Os recombinantes foram usados para infecção de duas linhagens de lepidópteros, IPLB-Sf1-AE e BTI-Tn5B1-4 e a viabilidade celular foi avaliada durante a infecção. As diferentes versões da toxina causaram morte celular precoce por necrose em níveis diferenciados. Análise estrutural e ultraestrutural mostraram clara mudança citomorfológica em células, corroborando perda de integridade da membrana plasmática e do conteúdo citoplasmático, permanência do núcleo com carioteca intacta e associada a restos de membranas circundantes. Esta característica criou um aspecto rugoso quando observado em microscopia de luz. Além disso, o gene da toxina BaTx foi expresso em sistema procariótico para obtenção de antisoro policlonal murino. Entretanto, quando testado contra extratos de células infectadas com recombinantes, não houve marcação. Fato este esperado, uma vez que a toxina não foi observada em gel SDS-PAGE. Não há relatos de genes de toxinas de aranha com ação citotóxica clonadas em baculovírus, provavelmente esta característica não permitiu que houvesse acúmulo da toxina em níveis diagnosticáveis por imunomarcação ou pode ter promovido instabilidade peptídica. Peptídeos formadores de canais apresentam alto conteúdo de resíduos básicos (arginina e lisina), de cisteínas e conformação em folha-beta. BaTx apresenta todas estas características, porém alvo e ação permanecem obscuros. Canais tipo-TRP são encontrados em insetos e há indícios da presença desses transportadores na membrana plasmática e em membranas intracelulares. Talvez estes canais possam ser o alvo de ação da toxina BaTx.

Palavras-chave: Baculovírus recombinantes, toxina de aranha, Theraphosidae, *Brachypelma albiceps*, peptídeo sinal, peptídeo citotóxico, morte celular, necrose.

ABSTRACT

Baculoviruses are dsDNA circular virus infectives to insects mainly from the Order Lepidoptera. Its biopesticide use problem is the time of death during insect infection. To solve this problem, insecticide genes can be inserted into the viral genome. An important insecticide protein source is the venom of arachnids. However, the target and action of many peptides remain unclear. Baculoviruses can be used as a tool to understand the toxic peptides playing in insect cells. Thus, different versions of a putative toxin were obtained from cDNA library of the tarantula *Brachypelma albiceps* venom gland by PCR and used to construct recombinant baculoviruses. The recombinants were used to infect two lepidopteran cell lines, IPLB-Sf1-AE and BTI-Tn5B1-4, and cell viability was evaluated during infection. The toxin versions caused wide and early cell death by necrosis in different levels. Structural and ultrastructural analyses showed clear cytomorphological changes, corroborating loss of the plasma membrane integrity and cytoplasmic contents, and nucleus with intact karyotheca linked with surrounding plasma membrane remains. The features created a rough aspect when those infected cells were observed by light microscopy. Furthermore, the BaTx toxin gene was expressed by a prokaryotic system to obtain murine polyclonal antiserum. However, when the antiserum was tested against infected cells extract with recombinant virus carrying the BaTx toxin no reaction was detected. This observation was expected since the toxin was not observed by SDS-PAGE. There are no reports of spider toxin genes with necrotic action cloned into baculovirus, probably this feature did not allow toxin accumulation in detectable levels by immunoblot or it could have promoted protein instability. Channel former peptides show high content of basic amino acid residues (lysine and arginine), cysteine residues, and beta-sheet conformation. BaTx presents all those features, but its target and mode of action remain unknown. TRP-like channels are found in insects and there is evidence of the presence of these ion-transporters in intracellular membranes as well as in plasma membrane. Perhaps TRP-like channels can be the BaTx toxin target of action.

Keywords: recombinant baculovirus, spider toxin, Theraphosidae, *Brachypelma albiceps*, signal peptide, cytotoxic peptide, cell death, necrosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos: pragas agrícolas e vetores de doenças

Os insetos formam o mais diverso e bem disseminado grupo de metazoários em todo mundo, com aproximadamente 900 mil espécies conhecidas e distribuídas em praticamente todos os ecossistemas (*The Columbia Electronic Encyclopedia*, 2007). Uma pequena parte desses animais se beneficia com a alta concentração de alimentos encontrados em monoculturas. Os insetos-praga tendem a se espalhar rapidamente e a tornarem-se sérios problemas econômicos mundiais no que diz respeito à perda de produção e ao gasto em agentes químicos ou biológicos no controle populacional. Este pequeno número de espécies causa grandes perdas à safra mundial, provocando a destruição de quase 18% das plantações mundiais (Oerke e Dehne, 2004), a perda de mais de 20% dos grãos estocados (Bergvinson e Garcia-Lara, 2004) e causando uma demanda de US\$100 bilhões a cada ano para seu controle (Carlini e Grossi-de-Sa, 2002).

Entre as principais monoculturas agrícolas brasileiras, a soja e o milho se destacam no âmbito econômico nacional: o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e o terceiro na produção de milho. Em 2010 foram produzidos 68,5 milhões de toneladas de soja e 56 milhões de toneladas de milho (IBGE), ambos componentes essenciais na fabricação de rações animais e alternativas importantes na produção de biodiesel.

A produção agrícola mundial tende a aumentar consideravelmente no futuro próximo para atender a demanda de uma crescente população humana e pecuária. Diante disso, a proteção de lavouras e o combate rigoroso, ostensivo e urgente contra

insetos-praga, patógenos, vírus e daninhas desempenham um papel *sine qua non* para o futuro da agricultura mundial de modo a garantir qualidade e quantidade de alimentos para o consumo.

Tanto a cultura da soja quanto a do milho estão sujeitas ao ataque de diferentes tipos de insetos-praga ao longo de todo seu ciclo; insetos estes que, se não controlados, podem causar perdas econômicas significativas. Atualmente, os insetos fitófagos são a principal ameaça à produção de comida para consumo humano. Sem o uso de pesticidas químicos, perdas dramáticas nas plantações mundiais ocorreriam (Smaghe *et al.*, 2009)

Dentre os insetos fitófagos, as formas larvais de mariposas e borboletas são consideradas as mais destrutivas. Mais de 25% das 300 pragas de insetos nos Estados Unidos pertencem à ordem Lepidóptera, apresentando uma demanda de aproximadamente 40% de todo inseticida químico despendido para controle biológico (dados da Sociedade Entomológica Americana).

As lagartas desfolhadoras *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) são exemplos de importantes pragas na cultura da soja, responsáveis por grande impacto na produção de grãos (EMBRAPA Soja). Outro exemplo de inseto-praga de importância nacional é a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), considerada a principal praga de plantações de milho no Brasil e cujo ataque pode reduzir a produção em até 34% (EMBRAPA Milho e Sorgo).

Além disso, muitas pragas, e particularmente os insetos hematófagos, atuam como vetores importantes para transmissão de doenças. Vetores tais como fêmeas de mosquitos, pulgas, piolhos e barbeiros (hemípteros da família Triatomidae) são de grande importância para a saúde pública e crescente preocupação para a população mundial, principalmente para países de terceiro mundo (Gubler, 2002). Estes

representam uma ameaça para produtividade, para a saúde e bem estar de humanos, para a pecuária, para animais de companhia e para a vida selvagem (Brogdon e McAllister, 1998).

Os mosquitos são provavelmente o mais pernicioso exemplo de inseto-vetor. Estão envolvidos na transmissão de diversas doenças tais como malária, dengue, dengue hemorrágica, febre amarela, filariose, encefalite japonesa, entre outros (Mackenzie *et al.*, 2004). A malária, por exemplo, está presente em mais de 100 países/territórios e o número de pessoas vivendo em risco cresceu para três bilhões, é dizer, mais de 45% da população humana mundial têm alta possibilidade de adquirir malária. Além disso, esta doença é responsável por em média 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano, sendo a maioria na África subsaariana (Breman, 2001).

Doenças transmitidas por insetos não afetam somente populações humanas. Em muitas áreas do mundo, particularmente nos trópicos, estas doenças comprometem produção em larga escala de animais para o abate, como aves, suínos e bovinos (Dryden *et al.*, 1993); além de serem vetores para transmissão de doenças de plantas (Hogenhout *et al.*, 2008). Mais de 400 vírus transmitidos por insetos foram reconhecidos (sem levar em conta os vírus fitopatogênicos), incluindo agentes etiológicos importantes como os da febre suína africana, da doença de Acabana, da febre efêmera bovina, da encefalite equina, da língua azul e da febre hemorrágica epizoótica.

1.2 Controle químicos de insetos e sua problemática.

Até pouco tempo, o principal método para controle de pragas era o uso de pesticidas químicos clássicos. Estes pesticidas foram primeiro introduzido na década de 1940 com o marcado sucesso do diclorodifeniltricloroetano (DDT). O DDT foi não

somente um sucesso como pesticida na agricultura, mas também foi usado inicialmente em programas de erradicação da malária (Attaran *et al.*, 2000). A subsequente introdução de inseticidas organofosforado, carbamados e piretróides na década 1960 encorajou a idéia de que pesticidas químicos poderiam produzir amplo e eficiente controle de insetos-pestes.

A respeito desse otimismo inicial, em apenas um ano de uso do inseticida DDT para controle de mosquito, em 1946 o primeiro caso de resistência ocorreu em duas espécies do gênero *Aedes*, o maior vetor mundial de malária (Brown, 1986). A resistência do inseto a um determinado inseticida é definida pela OMS como o “desenvolvimento da habilidade, em uma linhagem de um organismo, para tolerar doses de produtos tóxicos que se demonstravam letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal (ou suscetível) da espécie”. A resistência para inseticidas já foi observada em quase todos os principais vetores de doenças. Por exemplo, em 1992 a OMS apontou mais de 500 espécies de insetos, incluindo os gêneros *Anopheles* e *Culex*, como portadores de resistência para uma ou mais classes de inseticidas químicos (Hemingway *et al.*, 2002).

As causas da resistência são muitas vezes devido ao acentuado uso dos agentes químicos que expõem os insetos a uma grande pressão de seleção (Brogdon e McAllister, 1998). A resistência aos inseticidas pode ser caracterizada por: (1) aumento na destruição dos produtos tóxicos resultando de elevados níveis de esterases, glutathione S-transferases ou monooxigenases, (2) dessensibilização do alvo e/ou (3) diminuição da viabilidade do agente por meio de moléculas sequestrantes (Feyereisen, 1995). O mecanismo molecular responsável por este aumento na resistência foi identificado como mutações pontuais em canais iônicos (como do receptor GABA, canais de sódio e o sítio ativo para acetilcolinesterase), amplificação dos genes de esterases e mutações

causando super-regulação de enzimas destruidoras dos produtos tóxicos (Perera *et al.*, 2008).

1.3 Bioinseticidas transgênicos: uma dentre muitas possíveis soluções

Avanços tecnológicos recentes têm destacado o potencial da engenharia genética no desenvolvimento de bioinseticidas capazes de controlar eficientemente populações de insetos-praga e substituir ou agir sinergicamente com inseticidas químicos. Para essas abordagens obterem sucesso, uma miríade de toxinas com atividades específicas para insetos são requeridas. Felizmente, existe uma ampla quantidade de produtores naturais de toxinas que as utilizam como defesa ou, principalmente como arma para captura de presas. A peçonha de aracnídeos e outros invertebrados, além das toxinas produzidas por microrganismos, podem servir de fonte para perspectivas agroquímicas e são de particular interesse, pois apresentam uma alta densidade de moléculas bioativas expressas em suas glândulas de veneno ou em compartimentos celulares (Nicholson, 2007).

Várias aplicações utilizando toxinas inseticidas são atualmente empregadas. Um exemplo desse emprego é a modificação genética de plantas de modo a expressarem genes codificando toxinas inseticidas ou genes com alguma ação desestabilizadora. Plantas transgênicas portando toxinas Cry da bactéria *Bacillus thuringiensis* foram comercializadas pela primeira vez nos Estados Unidos em 1996. A expressão dessas toxinas conferia proteção contra insetos (Shelton *et al.*, 2000). Além de bacteriotoxinas inseticidas, outros genes com diferentes fontes já foram usados para construção de plantas transgênicas: (1) lecitina derivada de planta foi introduzida no genoma de *Solanum tuberosum* (batata, batata-inglesa ou batatinha) aumentando sua resistência

para a larva da mariposa *Lacanobia oleracea*, em 50% (Gatehouse *et al.*, 1997); (2) proteína inibitória de tripsina extraída de feijão de corda e introduzida em tabaco (*Nicotiana tabacum*) conferiu resistência contra larvas da mariposa *Heliothis virescens* (Hilder *et al.*, 1987); (3) entenroquitinase extraída da mariposas *Manduca sexta* introduzida em tabaco conferiu resistência contra *H. virescens*, pois diminuiu o dano foliar e o crescimento das larvas (Ding *et al.*, 1998).

Os baculovírus são outra ferramenta interessante no controle de insetos-praga. São utilizados para proteção de plantações desde 1930 (Inceoglu *et al.*, 2001) com alta especificidade de hospedeiro artrópode e incapacidade de gerar infecção em vertebrados ou plantas (Herniou *et al.*, 2003). Alguns programas envolvendo estes patógenos pelo mundo mostraram-se efetivos contra insetos-praga como a lagarta da soja *A. gemmatilis* (Moscardi, 1999), a lagarta do algodão *Helicoverpa zea* (Zhang, 1994) e a mariposa cigana *Lymantria dispar* (Cook *et al.*, 2003). O sucesso deveu-se a fatores inerentes ao vírus, como especificidade de hospedeiro (insetos predadores importantes no controle de outras pragas não são mortos pelo vírus), permanência do vírus na lavoura, baixo custo de produção (insetos mortos pelo vírus são fortes agentes de propagação de infecção por produzirem mais bioinseticidas) e facilidade na aplicação biocontrolador. Todos estes fatores só são possíveis porque baculovírus apresentam um ciclo de infecção cujo final garante produção de novos vírus oclusos protegidos de fatores ambientais adversos (Castro *et al.*, 1999).

1.4 Baculovírus: vírus inseticida com dois fenótipos infectivos

Baculovírus são vírus pertencentes à família *Baculoviridae* com genoma na forma de DNA dupla-fita, circular, super-enovelado e com tamanho variando entre 80 e

180 kpb (Rohrmann, 2011). Em forma de bastão e envelopados (do latim, *baculum*, cano, bengala, bastão), infectam animais da Classe Insecta; fato este que permite os baculovírus desempenharem importante papel ecológico controlando a população de insetos (Inceoglu *et al.*, 2001). Atualmente foram descritos baculovírus infectando três Ordens filogeneticamente relacionadas de endopterigotas (insetos holometabólicos): Diptera (Subordem Nematocera, os mosquitos), Hymenoptera (Subordem parafilética Symphyta, algumas vespas basais semelhantes a lagartas) e principalmente Lepidoptera (larvas de mariposas e borboletas), sugerindo uma co-evolução entre vírus e hospedeiros (Herniou *et al.*, 2004; Thézé *et al.*, 2011). Entretanto, foram encontrados também em outras Ordens de insetos (Orthoptera, Neuroptera, Thysanura, Trichoptera) e até outras Classes de artrópodes, porém estes não foram bem caracterizados ou estudados (Rohrmann, 2011).

A forma madura de um baculovírus, o vírion, apresenta dois fenótipos infectivos com diferentes alvos de infecção: o primeiro fenótipo é o vírus ocluso (ODV, do inglês ‘occluded virus’) oralmente infectivo que é responsável pela infecção primária no inseto hospedeiro (Figura 1 A); já o segundo, o vírus extracelular ou brotado (ECV ou BV, do inglês ‘extracellular virus’ ou ‘budded virus’, respectivamente) é responsável pela infecção secundária e sistêmica (Figura 1 B) (Slack e Arif, 2007).

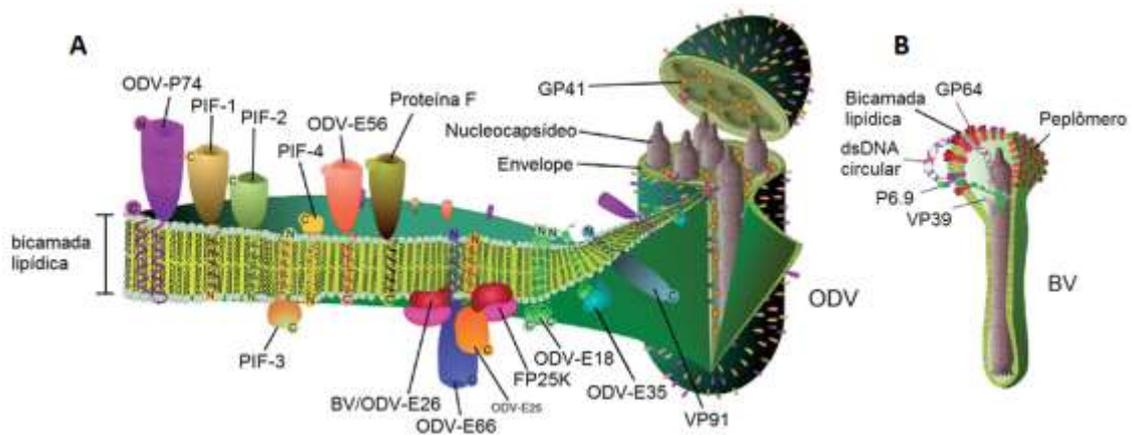


Figura 1. Fenótipos baculovíricos maduros produzidos num ciclo infeccioso completo. Estes fenótipos apresentam composição nucleocapsídica bastante semelhante. (A) Vírus ocluso (ODV), com proteínas de superfície importantes para infecção *per os*. (B) Vírus que brota da célula (BV) ou extracelular (ECV), com região peplomérica importante para a entrada do vírus na célula. Modificado de Slack e Arif (2007).

O primeiro fenótipo produzido, infeccioso para células epiteliais do intestino médio, está ocluso em uma matriz proteica e cristalina (daí o nome do vírion) composta por um único tipo de polipeptídeo produzido em larguíssima escala (Slack e Arif, 2007). Esta matriz contendo nucleocapsídeo(s) recebe o nome de corpo de oclusão (OB, do inglês ‘occlusion body’) e torna o vírus resistente a maioria das condições ambientais adversas que normalmente destruiriam um vírion comum (Rohrmann, 2011). O corpo de oclusão dissolve ao entrar em contato com o suco gástrico alcalino presente no intestino médio dos insetos-alvo (Hughes, 1950). Ao dissolver, ocorre a liberação de vírions no lúmen do intestino e início do processo infeccioso (Rohrmann, 2011). O segundo fenótipo, por sua vez é produzido depois do estabelecimento da infecção primária e tem por objetivo promover o espalhamento da infecção ao longo do inseto hospedeiro. Apesar de idênticos quanto à estrutura do nucleocapsídeo, BVs e ODVs apresentam papéis claramente distintos no ciclo de infecção do hospedeiro; diferença

esta que é dada pela composição protéica de seus envelopes (Braunagel e Summers, 2007; Wang *et al.*, 2010).

O ciclo de infecção inicia-se com um inseto suscetível se alimentando do vírus na forma de poliedro ou grânulo (nomes comumente dado aos corpos de oclusão dos baculovírus conforme a proteína de matriz expressa). Quando o vírus ingerido atinge o intestino da lagarta, ocorre a dissolução da matriz cristalina e liberação dos ODVs no lúmen do órgão. O vírus agora ultrapassa a barreira de proteção inata do inseto, a membrana peritrófica e atinge as células colunares do intestino. Para isso, o vírus penetra por lesões causadas pelo próprio alimento ou por pequenas frestas abertas na membrana por proteínas enhancinas, metaloproteases virais que foram oclusas durante a montagem do poliedro (Lepore *et al.*, 1996) ou que estavam presentes na superfície do ODV (Slavicek e Popham, 2005). Depois de atingir o epitélio colunar, o vírus promove fusão direta com as microvilosidades das células intestinais mediada por proteínas presentes no envelope do ODV denominadas PIF (do inglês, ‘*per os infectivity factor*’); estas proteínas estão presentes em ambas as faces do envelope, formando um complexo fundamental para a fusão, liberação de nucleocapsídeos no interior no citoplasma celular e início da infecção viral (mostradas na Figura 1 A) (Peng *et al.*, 2010).

Os nucleocapsídeos podem tomar diferentes caminhos dentro da célula epitelial como (1) ser direcionado para o núcleo, (2) infectar células da traquéia, (3) infectar células regenerativas anexas ao intestino e/ou (4) atingir a hemolinfa (Slack e Arif, 2007). Uma célula de inseto infectada por baculovírus apresenta uma mudança brusca em sua morfologia (Pombo *et al.*, 1998), bem como em seu funcionamento (Schultz e Friesen, 2009). Este vírus é direcionado para o núcleo da célula, onde estabelece a formação de um estroma de alta síntese de mRNAs e progênie viral madura e imatura (Guarino *et al.*, 1992).

A expressão de proteínas virais pode ser didaticamente dividida em três estágios: precoce, tardio e muito tardio (O'Reilly *et al.*, 1991). Entre as duas primeiras fases ocorre o desligamento da síntese de proteínas do hospedeiro e o recrutamento de toda maquinaria celular em prol da produção de novos vírus (Schultz e Friesen, 2009). Os genes expressos na fase precoce apresentam em seus promotores motivos que podem ser reconhecidos pela RNA polimerase II do próprio hospedeiro (Hoopes e Rohrmann, 1991). A principal proteína envolvida na transregulação transcricional da expressão de genes precoces é a IE-1 que pode atuar aumentando ou diminuindo a transcrição de genes (Choi e Guarino, 1995; Guarino e Summers, 1986).

O objetivo da fase precoce é preparar a célula para iniciar a produção massiva de vírus. Quando a célula inicia a replicação viral em regiões homólogas (HR, do inglês 'homologue region'), inicia-se a fase tardia. Esta fase ocorre entre 6 e 12 h pós-infecção e é caracterizada principalmente pela produção do fenótipo responsável pela infecção sistêmica, os vírus que brotam da célula ou extracelulares. A sequência promotora apresenta motivos de ligação da RNA polimerase viral e não a do hospedeiro. Esta fase tardia permite o espalhamento da infecção pelos tecidos do inseto através de vírions que brotam da célula e caem na hemolinfa (BV ou ECV). Esses vírions extracelulares apresentam uma glicoproteína (GP64) na região peplomérica (Figura 1 B) que reconhecem receptores celulares e iniciam o processo de endocitose adsortiva (entrada do vírus na célula, que é diferente da fusão direta ocorrida com ODVs). Depois de entrar, o vírus está recoberto por um endossoma primário que é amadurecido por fusões com lisossomos. Com a diminuição do pH, ocorre uma mudança conformacional na GP64, que catalisa a fusão da membrana do envelope com a membrana do endossoma, promulgando assim, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Blissard e Wenz, 1992). Este nucleocapsídeo é direcionado para o núcleo e então desmontado para

iniciar a infecção. Só a partir das 12 h pós-infecção ocorre expressão de genes relacionados à formação do fenótipo ODV que está ocluído em uma matriz protéica. Esta fase é denominada muito tardia e culmina na formação massiva de poliedros ou grânulos com vasta produção de poliedrina ou granulina (Rohrmann, 2011).

Até 2006, a forma dos OBs dividia os baculovírus em dois gêneros claramente distintos: *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) e *Granulovirus* (GVs) (Ackermann e Smirnoff, 1983). Estes dois gêneros foram posteriormente reagrupados em quatro novos grupos com base não mais na composição e forma dos OBs, mas sim em análise de sequências de genes conservados (Jehle *et al.*, 2006). Os resultados convergiram tanto com o espectro de hospedeiro quanto com a antiga classificação em dois gêneros. Atualmente a família *Baculoviridae* é dividida nos gêneros *Alphabaculovirus*, NPVs que infectam Lepidoptera; *Betabaculovirus*, GVs que infectam Lepidoptera; *Gammabaculovirus*, NPVs que infectam Hymenoptera; e *Deltabaculovirus*, NPVs que infectam Diptera (Figura 2).

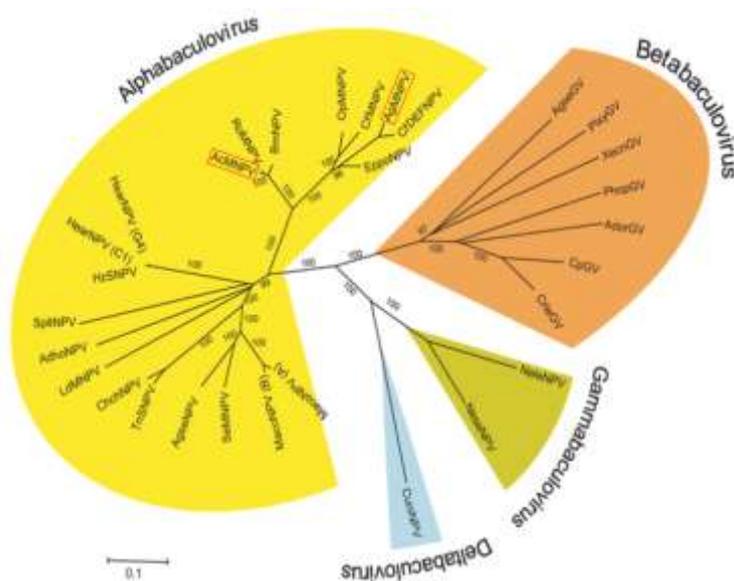


Figura 2. Relação filogenética dos quatro gêneros da família *Baculoviridae*. Árvore mostrando a relação de proximidade filogenética com base em sequências gênicas ou aminoácidas e consequente agrupamento nos quatro gêneros atualmente aceitos. Estão sendo destacados os *Alphabaculovirus* AcMNPV e AgMNPV (retângulos vermelhos). A árvore foi modificada de Jehle *et al.* (2006); na figura original não há a incursão do vírus AgMNPV. Esta incursão foi feita com base em Oliveira *et al.* (2006).

Os NPVs contêm poliedrina como principal proteína do OB ou poliedro (Jarvis *et al.*, 1992). Esta estrutura apresenta 0,15 a 3 µm de tamanho com muitos ODVs oclusos na matriz. Os ODVs podem conter um único nucleocapsídeo por envelope (SNPV, do inglês ‘single nucleopolyhedrovirus’) ou vários (MNPV, do inglês ‘multiple nucleopolyhedrovirus’) (Figura 3 A). Além disso, os NPVs podem ser também agrupados com base na sequência de aminoácidos da proteína poliedrina em dois grupos, Grupo I (NPVs I) e Grupo II (NPVs II) (Zanotto *et al.*, 1993). Estes grupos divergem também quanto ao conteúdo gênico; por exemplo, NPVs do Grupo I usam GP64 como proteína de fusão em BV (Blissard e Wenz, 1992), enquanto que NPVs do Grupo II não contém GP64 e usam a proteína F como proteína de adsorção e posterior fusão (Pearson e Rohrmann, 2002).

Os GVs contêm granulina como principal proteína do OB ou grânulo (Eason *et al.*, 1998) . Estes apresentam formato ovóide de 0,13 a 0,5 µm de tamanho, semelhante a um grão de arroz. E dentro de sua matriz protéica existe um único ODV com mais comumente um único nucleocapsídeo (Figura 3 B).

Entretanto baculovírus são microrganismos limitados, pois demoram a matar seus hospedeiros. Tipicamente, levam dias a semanas para o inseto infectado parar de comer e/ou morrer. Assim, diante dessa premissa, uma forma de possibilitar o aumento da toxicidade do baculovírus ao inseto-alvo é construir vírus transgênicos que expressem toxinas recombinantes específicas para insetos.

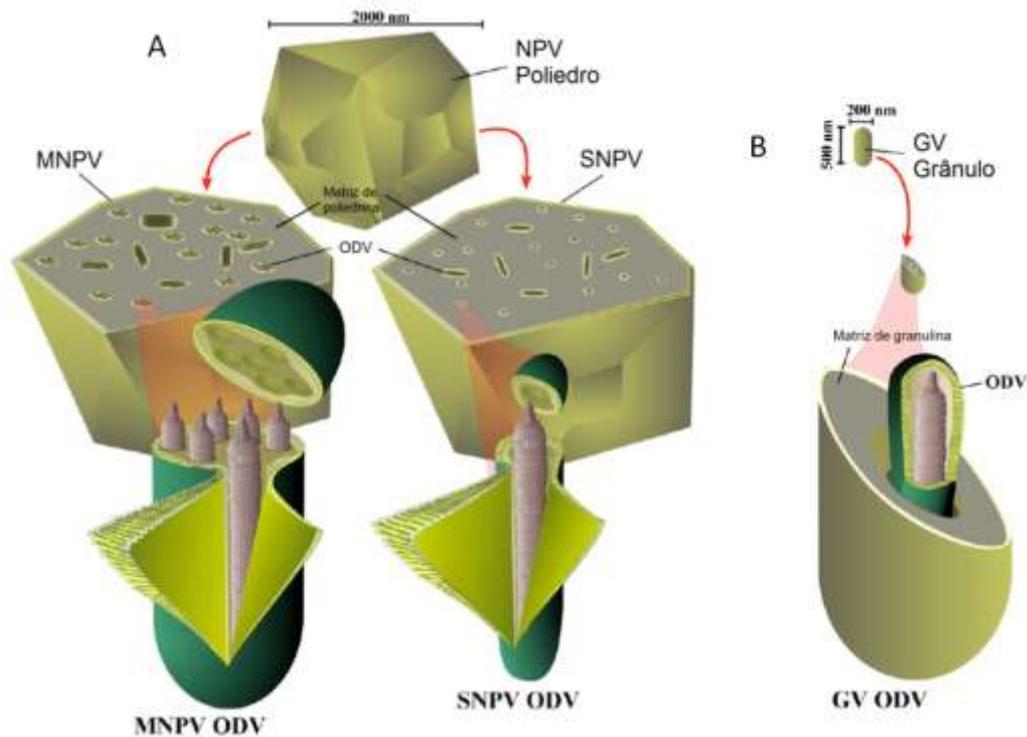


Figura 3. Corpos de oclusão (OB) de *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs – Poliedros, PIBs) e *Granulovirus* (GV – Grânulos). (A) Os poliedros, formados por uma matriz cristalina de poliedrina podem conter um (SNPV) ou vários (MNPV) nucleocapsídeos por envelope, formando ODVs oclusos (vírions). (B) Os grânulos, por sua vez, contêm um único ODV ocluso por matriz cristalina de granulina e este vírion porta um único nucleocapsídeo envelopado (modificado de Slack e Arif, 2007).

1.5 Toxinas inseticidas de aracnídeos e baculovírus recombinantes

O propósito principal do veneno da maioria dos artrópodes caçadores é paralisar a sua presa natural. A maioria das aranhas, dos escorpiões e de alguns ácaros apresenta como principal presa os insetos (De Lima *et al.*, 2007). Venenos de artrópodes são misturas químicas complexas que apresentam componentes biologicamente ativos, como toxinas protéicas e não-protéicas, enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas, uma sopa de íons e outras substâncias desconhecidas (Rash e Hodgson,

2002). Essa mistura complexa é um grande reservatório de componentes com atividade específica para insetos (Wang *et al.*, 2001).

Vários estudos mostraram que as neurotoxinas purificadas de venenos de artrópodes exibem uma forte especificidade para animais de diferentes Filos ou Classes (Possani *et al.*, 1999). De acordo com sua especificidade, as toxinas de artrópodes foram classificadas em toxinas de ação em mamíferos, de ação em inseto e de ação em crustáceos, com base em sua toxicidade para camundongos, larvas/adultos de inseto ou isópodos, respectivamente (de la Vega e Possani, 2005).

De Lima *et al.* (2007) falam (em sua revisão sobre venenos de aracnídeos) que a existência de componentes tóxicos distintos com efeito específico em mamíferos e insetos foi primeiro mostrado para o veneno da viúva negra *Latrodectus tredecimguttatus* e mais tarde para o veneno dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Androctonus australis*. Os pesquisadores que mostraram essas diferentes atividades discriminaram entre proteínas que causam letalidade em camundongo e proteínas que afetam insetos. Sob essa ótica, uma neurotoxina específica tem a habilidade de modificar canais iônicos de insetos, mas não de vertebrados (Tedford *et al.*, 2001).

Diante da capacidade de promover modificação em canais de inseto sem afetar vertebrados, vários estudos foram feitos a fim de aumentar a virulência de baculovírus com base na inserção de genes codificantes para neurotoxinas de aracnídeos no genoma baculoviral. O ‘Medical Subject Headings’ (MeSH) define virulência como “o grau de patogenicidade dentro de um grupo ou espécie de parasita indicado pela taxa de mortalidade e/ou habilidade do organismo parasita em invadir os tecidos do hospedeiros”. Modificações como a deleção de genes virais (deleção do gene *egt* do baculovírus AcMNPV em O’Reilly e Miller, 1991 e do AgMNPV em Pinedo *et al.*, 2003), super-expressão de genes do próprio inseto (hormônio de eclosão em Eldridge *et*

al., 1992; esterase do hormônio juvenil em Hammock *et al.*, 1990; neuropeptídeos reguladores de feromônios em Ma *et al.*, 1998; hormônio diurético em Maeda, 1989; entomoquitinase em Gopalakrishnan *et al.*, 1995) e até inserção de sequências antisense de genes relacionados ao metabolismo do hospedeiro (gene essencial no crescimento e desenvolvimento do inseto da família *c-myc* em Lee *et al.*, 1997) culminaram num aumento considerável de virulência e/ou redução na alimentação do inseto.

A expressão de toxinas inseticidas, em muitos casos, promoveu o aumento expressivo na virulência do microrganismo ao inseto hospedeiro, principalmente neurotoxinas de aracnídeos predadores naturais de insetos como aranhas, escorpiões e ácaros. Expressão da neurotoxina Tox34 presente em biblioteca de cDNA da glândula de veneno da fêmea do ácaro *Pyemotes tritici*, por exemplo, promulgou paralisia do inseto infectado, semelhante aos sintomas ocorridos naturalmente, quando um inseto é picado pelo ácaro (Tomalski e Miller, 1991).

Neurotoxinas de escorpiões também foram clonados no genoma de baculovírus como a toxina BeIt de *Buthus eupeus* (Carbonell *et al.*, 1988). Esta neurotoxina, diferente da Tox34, não aumentou a toxicidade do vírus. Por outro lado, a α -toxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, Lqh1 promulgou sintomas típicos de intoxicação (Chejanovsky *et al.*, 1995). No caso da neurotoxina BmK IT do escorpião chinês *Buthus martensii* Karsch houve aumento de 13% na velocidade de ação (morte do inseto) do vírus recombinante (Fan *et al.*, 2008). Outra neurotoxina usada para construção de AcMNPV recombinante obtida do escorpião *Androctonus australis* promoveu significativa redução no tempo de morte de larvas infectadas (McCutchen *et al.*, 1991).

Aranhas da subordem Aranaeomorphae, com os únicos representantes de interesse médico por provocar araneísmo (picada em humanos), também foram fontes de neurotoxinas inseticidas para aquisição de baculovírus recombinantes. Neurotoxinas

das aranhas *Diguetia canities*, *Tegenaria agrestis* (Hughes *et al.*, 1997) e *Agelonopsis aperta* (Prikhod'ko *et al.*, 1996) foram clonadas no genoma do baculovírus AcMNPV, promovendo aumento na virulência do parasita celular e parada precoce na alimentação da larva.

1.6 *Brachypelma albiceps* e a toxina putativa BaTx derivada de biblioteca de cDNA

Aranhas formam um grupo de predadores de insetos muito diverso, com aproximadamente 42.000 espécies descritas (Platnick, 2011). Muitas dessas aranhas apresentam arsenais de toxinas invejáveis a qualquer controlador químico de insetos, uma vez que agem de forma sinérgica em diferentes alvos promovendo paralisia da nutritiva presa. Análises comparativas mostram que venenos de aranhas e de escorpiões apresentam os componentes mais letais contra insetos de diferentes ordens (Corzo *et al.*, 2009). E, além disso, representam uma população diversa e atrativa de peptídeos com potencial para descoberta de drogas ou produtos de aplicação biotecnológica (Chaim *et al.*, 2011).

A aranha mexicana *B. albiceps* (Pocock, 1903 – Figura 4), popularmente conhecida como ‘tarântula mexicana dourada da traseira vermelha’ (nomes não-oficiais, do inglês ‘Mexican golden red rump’ e do espanhol ‘araña dorada de México’) é uma espécie pertencente à família Theraphosidae (Aranae: Mygalomorphae). Este táxon agrupa aranhas caranguejeiras não nocivas aos humanos, geralmente criadas como animais de estimação. A única lesão que pode ser causada é o lançamento de pelos urticantes presentes no abdômen da aranha, como autodefesa. O gênero é nativo de partes da América Central e apresenta um crescimento excepcionalmente lento com uma impressionante expectativa de vida de até 20 anos para fêmeas.



Figura 4. *Brachypelma albiceps* Procock, 1903. (A) Fontes: www.tarantulasdemexico.com; (B) www.gallery.tarantulas.us.

Ao longo dos anos, esta espécie sofreu muitas modificações taxonômicas, sendo primeiramente considerada uma aranha pertencente ao gênero *Brachypelma* (Pocock, 1903). Posteriormente, Smith (1995) transferiu a espécie para o gênero *Aphonopelma* que mais tarde foi “redescoberta” e chamada de *Brachypelmides ruhnaui* (Schmidt, 1997). Só há pouco tempo, o gênero *Brachypelmides* foi invalidado e colocado como um sinônimo menor de *Brachypelma* (Locht *et al.*, 2005); assim, prevaleceu o nome mais antigo, ficando *Brachypelma albiceps*.

O veneno solúvel bruto extraído desta aranha mostrou atividade inseticida considerável para insetos holometábolos e hemimetábolos (Gentz *et al.*, 2009). O perfil de HPLC de fase reversa do veneno solúvel de *B. albiceps* já foi anteriormente analisado (Corzo *et al.*, 2009). A mistura derivada da glândula de veneno foi fracionada usando HPLC de fase reversa revelando duas principais frações chamadas de Ba1 e Ba2. Estas frações foram tóxicas para insetos, mas não para ratos. Os dois peptídeos apresentaram alto conteúdo de resíduos de aminoácidos básicos (principalmente lisina). Além disso, apresentaram três pontes dissulfeto confirmadas por espectrometria de massa e alta similaridade com peptídeos inseticidas de Theraphosidae de outras espécies como a norte-americana *Aphonopelma sp.*, a mexicana *B. smithi* e a chinesa

Haplopelma huwenum indicando uma relação próxima entre elas. Ambas as toxinas não apresentaram toxicidade para camundongos injetados de forma intra-craniana e intra-peritoneal nem tampouco mostraram antagonismo de condutância para canais de sódio-voltagem dependentes de inseto (Para/tipE) e de mamíferos (Nav1.2 e Nav1.5) clonados em oócitos de *Xenopus leavis*. Entretanto, ambos mostraram-se tóxicos e letais para grilos numa faixa de toxicidade que é característica de toxinas com atividade contra canais de sódio-voltagem dependentes. Os autores discutem esta diferença, especulando que as toxinas podem afetar outros canais de íons ou algum diferente subtipo de canal de sódio voltagem-dependente.

Durante a análise de biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *B. albiceps* (dados não publicados), um peptídeo putativo, genericamente chamado BaTx, mostrou grande semelhança com Ba1 e Ba2. Este possível peptídeo apresentava, respectivamente, uma identidade de 95% e de 92% com os peptídeos citados; e de 59% com toxinas derivadas de uma aranha chinesa (HwTx – huwentoxina-1 e -2) como pode ser observado na Figura 5.

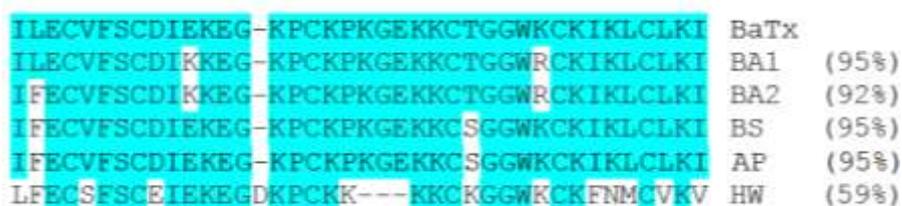


Figura 5. Alinhamento de toxinas da aranha *B. albiceps* com outras toxinas. (A) As toxinas BA1 e BA2 foram alinhadas com a toxina putativa encontrada no cDNA da glândula de veneno da aranha citada com toxinas derivadas de *B. smithii* (BS), de uma *Aphonopelma sp.* (AP) e da principal representante da família das huwentoxinas (HW). Resíduos de aminoácidos semelhantes em todas as toxinas foram destacados em azul claro.

BaTx, Ba1 e Ba2 são toxinas que apresentam assinatura de peptídeos da família das huwentoxinas-2 derivada da aranha chinesa *Haplopelma huwenum* (sinônimo *Selenocosmia huwena*) que tem a característica de bloquear transmissão neuromuscular (Shu e Liang, 1999). Um fato controverso, uma vez que as toxinas derivadas de *B. albiceps* não modificaram a condutância de canais de sódio-voltagem dependente, fato este que torna o alvo de ação destas toxinas bastante obscuro.

1.7 Baculovírus e outras aplicações

1.7.1 Baculovírus como potencial vetor para terapia gênica

A terapia gênica é uma ferramenta para tratamento de doenças herdadas e para prevenção, correção ou modulação de doenças genéticas e adquiridas por meio da introdução de genes codificando para proteínas terapêuticas que estão ausentes ou truncadas no organismo-alvo (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004). Vetores que introduzem essa correção podem ser classificados em virais ou não-virais. Os vetores virais derivados de retrovírus, lentivírus, adenovirus e vírus associados à adenovírus são a melhor escolha para uma entrega gênica eficiente (Robbins e Chivizzani, 1998). Entretanto existem alguns problemas relativos à utilização desses vetores virais, como a segurança na utilização e o seu caráter transiente de expressão.

Nesse palco de insegurança na utilização de vetores virais surge o baculovírus como uma alternativa como veículo gênico cujas vantagens são a incapacidade replicativa e a não-toxicidade para células de mamíferos (Makela *et al.*, 2006). Em 1985 foi descoberto que baculovírus contendo um promotor adequado era capaz de transduzir células de mamíferos (Carbonell *et al.*, 1985). Depois disso, várias características

intrínsecas ao vírus o tornaram alvo de estudo para terapia gênica como, por exemplo, o capsídeo na forma de bastão que permite alta capacidade transgênica (inserção de genes heterólogos) sem limite conhecido (Fipaldini *et al.*, 1999; Cheshenko *et al.*, 2001).

A entrada do baculovírus dentro de células de inseto ocorre via endocitose seguida por fusão induzida por baixo pH entre proteínas do envelope viral e a membrana do endossomo no caso de BVs ou por fusão direta mediada também por proteínas virais de superfície no caso de ODVs, dessa forma permitindo inserção viral no citoplasma e núcleo (Dee e Shuler, 1997; Peng *et al.*, 2010). Por outro lado, o mecanismo de entrada do vírus em células de mamífero permanece ainda obscuro. Pesquisas iniciais *in vivo* de baculovírus como veículo gênico foi feito em tecido hepático (Hofmann e Strauss, 1998). Entretanto, a expressão do transgene não foi detectada quando o vetor baculoviral foi introduzido dentro de comundongos e ratos por uma variedade de métodos, incluindo injeção direta no parênquima do fígado. Esta falha sugere que o baculovírus possa ser inativado pelo sistema complemento que surge como uma potente barreira para aplicação de baculovírus *in vivo* (Sandig *et al.*, 1996).

1.7.2 Baculovírus: potente ferramenta para expressão heteróloga

O sistema de expressão heteróloga baseado em infecção celular por baculovírus apresenta dois componentes fundamentais para funcionamento: o vírus, como vetor de expressão contendo o gene de interesse sob o comando de um promotor forte e a célula hospedeira que fornecerá o aparato metabólico para promoção da infecção e consequente expressão protéica (Hitchman *et al.*, 2009). O desenvolvimento dessa ferramenta biotecnológica ocorreu no início da década de 1980, nos laboratórios dos

pesquisadores Max Summers (Texas A & M, EUA) e Lois Miller ('University of Georgia', EUA).

O *Alphabaculovirus Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), isolado da lagarta da alfafa *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae), é a espécie-tipo da família *Baculoviridae*. Esta foi a primeira espécie utilizada para construção de vetores de expressão heterólogos há mais de 20 anos por Smith *et al.* (1983) para expressão de β -interferon humano.

Existem muitas características que tornam esse sistema mais vantajoso que outros sistemas de expressão heteróloga, mas a principal característica é o ambiente de expressão eucariótica. Este ambiente permite que algumas proteínas de interesse sofram modificações pós-traducionais fundamentais para aquisição de conformação nativa. Além disso, o sistema permite rapidez e alto nível de expressão (presença de promotores fortes), produção de mais de uma proteína simultaneamente, e custo baixo quando comparado com animais transgênicos ou células de mamíferos transformadas (Kost *et al.*, 2005). As células apresentam também fácil manutenção por poderem ser cultivadas a temperatura ambiente, em meio sem soro e sem necessidade de câmara de CO₂.

Entretanto, existem algumas limitações no sistema baseado em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes como o caráter transiente de expressão devido à natureza lítica da infecção (Hitchman *et al.*, 2009). Este fato pode levar a degradação da proteína recombinante e processamento ineficiente em estágios avançados da infecção. Outro caráter a ser levado em conta é que as células de inseto promovem uma glicosilação do tipo N-ligada que difere da glicosilação em células de mamíferos. As células de inseto são incapazes de produzir oligosacarídeos complexos N-ligados contendo galactose e ácido siálico como penúltimo e último sacarídeo adicionado, respectivamente. Entretanto, estudos foram feitos de modo a “mamalizar” ou

“humanizar” células de inseto (Harrison e Jarvis, 2006), conferindo características naturalmente inexistentes.

Diante das vantagens do sistema de expressão baculoviral e de desvantagens contornáveis, vários usos de caráter médico e veterinário podem ser listados, como expressão de antígenos virais com potencial para uso em vacinas humanas e animais. Algumas vacinas produzidas em células de inseto já estão disponíveis no mercado mundial, como por exemplo, as vacinas contra a Peste Suína (BAYOVAC CSF E2TM e PORCILIS PESTITM) baseadas na glicoproteína CSFV E2 e a vacina humana contra câncer cervical induzido pelo HPV-16 (Cervarix - *Human papillomavirus 16*) baseada em VLP (do inglês, ‘virus-like particle’) (Zheng *et al.*, 2004).

Outras vacinas já estão em situação de aprovação ou em desenvolvimento como vacinas contra protozoários como *Plasmodium falciparum* (agente causador da malária – Herrington *et al.*, 1992; Daugherty *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2000), *Theileria parva* (agente causador da theileriose – Kaba *et al.*, 2003, 2004 e 2005) e *Babesia rodhaini* (causadora da babesiose – Igarashi *et al.*, 2000); contra helmintos como *Fasciola hepatica* (Reszka *et al.*, 2005) e *Schistosoma mansoni* (redução de 29 a 39% na quantidade de vermes – Hota-Mitchell *et al.*, 1997); e vacinas terapêuticas contra o câncer de próstata (Provenge) (amplamente revisado em Stanbridge *et al.*, 2003).

Além de aplicação na produção de vacinas, várias pesquisas envolvendo o sistema de expressão baculoviral visaram à produção de kits de diagnóstico de proteínas recombinantes de interesse médico, como foi o caso da expressão de proteínas de capsídeo (VP1 e VP2) do *Human parvovirus B19* (Yoto *et al.*, 1995);

proteínas VPX e VP3 do birnavírus causador da doença da bursite infecciosa (IBD, do inglês, ‘infectious bursal disease’) (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000); e da proteína quimase humana, uma serino-protease com papel fisiológico e patofisiológico desconhecido presente em várias doenças (Suzuki *et al.*, 2002). Outra aplicação importante do ponto vista toxinológico diz respeito à capacidade de baculovírus em produzir toxinas eucarióticas funcionais para estudo sistemático de função (Volynski *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi analisar os efeitos da toxina BaTx putativa em células de inseto expressa durante infecção por vírus recombinantes a fim de constatar seu efeito na virulência do baculovírus e descobrir o modo de atuação do peptídeo.

Perguntas hipotéticas:

1. Baculovírus são capazes de produzir toxinas inseticidas biologicamente ativas da aranha *B. albiceps*? Como diagnosticar a funcionalidade da toxina?
2. É possível observar pistas do modo de ação de toxinas inseticidas com alvo desconhecido amplificando seu efeito ao expressá-la em células de inseto sob o comando de um promotor forte?
3. A toxina seria ativa subtraindo-se apenas seu peptídeo sinal? E quanto ao peptídeo sinal e o pró-peptídeo?
4. Diferentes linhagens de células de inseto se comportariam da mesma forma durante infecção?
5. Existiria alguma diferença caso a toxina fosse expressa sob o comando de promotores de fases diferentes da infecção viral?

6. Peptídeo sinal derivado de gene do inseto e peptídeo sinal derivado de gene viral promoveriam alguma mudança no padrão de expressão da toxina?

2.2 Objetivos específicos

- Construções de baculovírus AcMNPV geneticamente modificados para expressão de diferentes versões da toxina BaTx sob o comando de um promotor muito tardio: vAc-SP-Pp-BaTx, vAc-Pp-BaTx, vAc-eBaTx, vAc-SP(egt)-BaTx e vAc-SP(bx)-BaTx.
- Construção de vetor doador para produção de baculovírus oralmente infectivos por transposição bacteriana.
- Construção de baculovírus AcMNPV recombinantes oralmente infectivos para expressão de diferentes versões da toxina BaTx sob o comando de um promotor híbrido ativo durante as fases tardia e muito tardia: vAc-BaTx, vAc-SP(egt)-BaTx e vAc-SP(bx)-BaTx.
- Produção de vírions recombinantes oralmente infectivos contendo a toxina para avaliação de toxicidade em larvas de lepidóptera.
- Análise quantitativa e qualitativa de toxicidade induzida pela infecção com vírus recombinantes em diferentes linhagens celulares derivadas da lagarta do cartucho do milho, *S. frugiperda* e da lagarta do repolho, *Trichoplusia ni*.

- Análise estrutural e ultraestrutural dos efeitos citopáticos de células de inseto infectadas com recombinantes expressando a toxina.
- Construção de vetores de expressão heteróloga para obtenção da toxina BaTx fusionada a epítomos 6xHis e GST em sistema procariótico e produção de anticorpos policlonais em camundongos.
- Análise de expressão da toxina em células de inseto a nível transcricional e traducional.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos envolvendo expressão de toxinas inseticidas derivadas de aracnídeos em baculovírus visaram aumentar a toxicidade do vírus ao hospedeiro de modo a gerar um controlador biológico mais potente. Tais pesquisas se restringiram ao estudo de toxinas moduladoras de canais voltagem-dependentes (neurotóxicas), negligenciando peptídeos inseticidas com alvos desconhecidos. Um exemplo de toxinas pouco estudadas deriva do veneno bruto de aranhas caranguejeiras. Estas aranhas apresentam pouco ou quase nenhum interesse médico, por não provocarem araneísmo. Tanto o alvo quanto o mecanismo de atuação, por exemplo, da toxina inseticida de caranguejeira BaTx permanecem não elucidados. Usar baculovírus como ferramenta para entender o alvo de ação de toxinas *in vitro* e/ou *in vivo* é uma inovação do ponto de vista toxinológico, podendo assim, ajudar a compreender estas pequenas proteínas com vasto potencial agroeconômico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plasmídeos e bactérias

Para construção e propagação dos diferentes plasmídeos usados ou construídos neste trabalho foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* das linhagem DH5 α ou One Shot® TOP10 (Invitrogen). Bactérias foram manipuladas em VECO Capela de Fluxo Laminar.

Os plasmídeos pDONR207, pDEST15 e pDEST17 foram propagados em bactérias *E. coli* da linhagem DB3.1 (Invitrogen) resistentes à CcdB. Os plasmídeos apresentam o gene *ccdB* entre os sítios de recombinação (Figura 7 e 8) que codifica uma toxina bloqueadora da atividade da enzima girase bacteriana.

Para expressão procariótica da toxina fusionada a cauda de hexa-histidina ou a GST (glutathiona-S-transferase), os plasmídeos recombinantes derivados dos vetores comerciais pDEST17 e pDEST15 (Invitrogen) foram transformados em bactérias *E. coli* da linhagem BL21-AI (Invitrogen).

Os cromossomos artificiais bacterianos (BACs, do inglês ‘bacterial artificial chromosome’) recombinantes construídos neste trabalho foram obtidos e propagados em bactérias *E. coli* da linhagem DH10Bac® (Invitrogen) quimiocompetentes.

As diferentes cepas de bactérias da espécie *E. coli* utilizadas neste trabalho foram tornadas quimiocompetentes ou eletrocompetentes de acordo com método disponível em Sambrook & Russel (2001). A extração de plasmídeos foi feita por método de lise alcalina também disponível também nesta referência citada.

4.2 Baculovírus e células de inseto

Foram utilizadas neste trabalho células de lepidópteros das linhagens BTI-Tn5B1-4 derivada de *T. ni* (Granados *et al.*, 1994) (Figura 6 A), a lagarta do repolho (do inglês, ‘cabbage looper’) e IPLB-Sf21-AE derivada de *S. frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) (Figura 6 B), a lagarta do cartucho do milho (do inglês, ‘fall armyworm’). Células eucarióticas foram manipuladas em NUAIRE™ ‘Biological Safety Cabinets’. As células foram mantidas a temperatura ambiente (27°C – em LAB-LINE® AMBI-HI-LOW ® ‘Chamber’) em meio TC100 (Gibco, Sigma e HIMEDIA) suplementadas ou não com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Sigma e HIMEDIA) conforme o uso. Este meio utilizado foi esterilizado por filtração (TPP®).

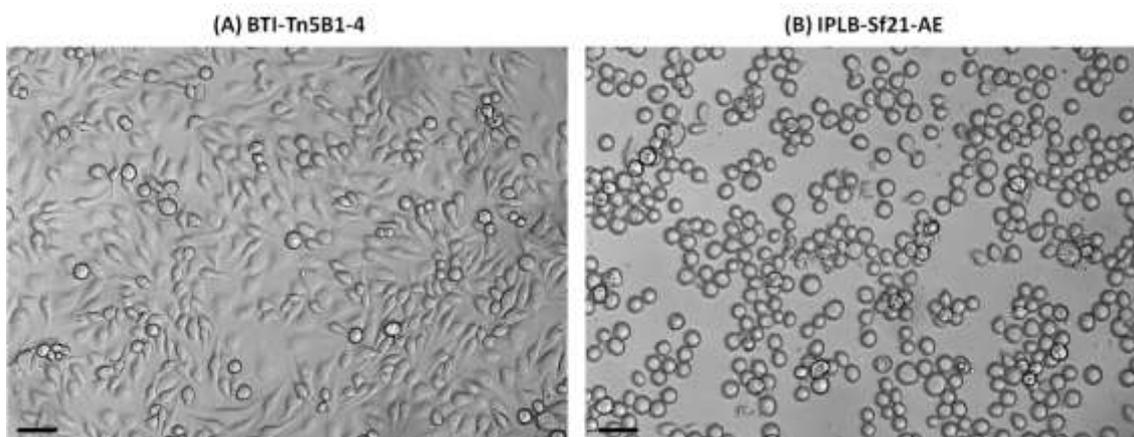


Figura 6. Células de inseto em cultura utilizadas neste trabalho. Estão sendo mostradas culturas de células das linhagens (A) BTI-Tn5B1-4 derivadas da lagarta do repolho (B) IPLB-Sf21-AE derivada da lagarta do cartucho do milho. (Barra = 50 μm)

As células foram empregadas como hospedeiras para propagação dos baculovírus selvagem e recombinantes obtidos neste trabalho. Material plástico para cultivo de células de inseto: TPP® (Techno Plastic Products AG, Switzerland), garrafas de 25 cm^2 (10^6 células confluentes) e 75 cm^2 (entre 5×10^6 e 1×10^7 células); placas de 6

poços (10^6 células confluentes), 12 poços (5×10^4 células confluentes) e 96 wells (10^4 células confluentes). Cultivo de células procarióticas: Prolab® Placas de Petri descartáveis.

4.3 Amplificação, clonagem e sequenciamentos da toxina BaTx

O gene da toxina genericamente denominada BaTx foi amplificado a partir de biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *B. albiceps*, gentilmente cedido pelos colaboradores Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Nogueira Schwartz (Departamento de Ciências Fisiológicas, UnB) e Prof. Dr. Gerardo Corzo (Instituto de Biotecnologia, Universidade Nacional Autônoma do México) (dados não publicados, porém cedidos para futura publicação com os dados obtidos neste trabalho) (Figura 7 A). Foram feitas três reações com diferentes conjuntos de iniciadores (Figura 7 B), de modo a gerar três diferentes versões da toxina contendo (1) o peptídeo sinal (SP, do inglês ‘signal peptide’), o pró-peptídeo (Pp, do inglês ‘pro-peptide’) e a toxina madura (BaTx, do inglês ‘*B. albiceps*’ toxin’) (fragmento SP-Pp-BaTx), (2) o pró-peptídeo e a toxina madura (fragmento Pp-BaTx) e (3) apenas a toxina madura (fragmento BaTx).

A

```

1 GGTCTGGCTGTTTTTCGTAATAGCAGATTTTCATTCCGCAGTATCTGAATTTTCAGGAGAAT 60
61 TTCAAGCAAAAAGatgagatcctttgacgttggtgctgTCTGGCATGCAGCCTGTTGTTA 120
    M R S L T L A A V L A C S L L L
121 GTTTTTCACACTTCAGCAGCTgaagagcatgaagctcaggaaggcTATCTGATGAACCCC 180
    V F H T S A A E E H E A Q E G Y L M N F
181 GGTGATACTGACACCGCACTAGCAACTGTCGATGATGAAAAGaattctogaatgtgttttc 240
    G D T D T A L A T V D D E R I L E C V F
241 tcatgagacATTGAAAAAGAAGGCAAGCCATGCAAACCAAGGGGGAGAAAAAATGTACT 360
    S C D I E K E G K P C K P K G E K K C T
361 GGTGGATGGAAAatgtaagatcaagttgtgtctgaagatttaaTATGAAAATGCTGTCATC 420
    G G W K C K I K L C L K I *
421 ACTACGAGAAAACTCACCATAACATCCACACGAAGAGCTATTCTAGTGATGCTGTTGGAA 480
481 ATATATTAACATGATAGCCAGAAATGTTGTTGAATTCTATTATGTTTCTGAACTAATet 540
541 ttaataaaatcgtttcaatctttcAAAAAAA

```

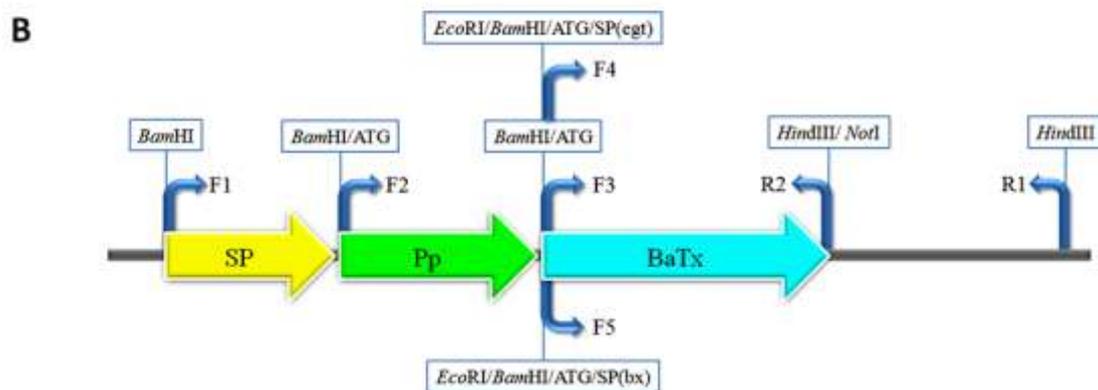


Figura 7. Região do cDNA que contém a toxina BaTx da caranguejeira *B. albiceps*. (A) Sequência nucleotídica obtida a partir do sequenciamento de cDNA da glândula de veneno da aranha *B. albiceps*. Está sendo mostrada a sequência aminoacídica da toxina putativa tipo-Ba1/2, genericamente chamada neste trabalho de BaTx. Sequências em letras minúsculas e destacadas em negrito apresentam regiões utilizadas para a confecção de primers. (B) Esquema da ORF putativa da toxina. Os primers F1, F2, F3, F4, F5, R1 e R2 estão ancorados em suas respectivas regiões de pareamento. Além disso, estão representadas sequências não-pareáveis adicionadas pelos iniciadores: sítio de restrição para *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI e *Not*I, códon de iniciação de tradução (ATG) quando necessário, peptídeo sinal de secreção do gene *egt* do baculovírus AgMNPV, denominado SP(egt) e o peptídeo sinal de secreção do gene da *bombyxina* de *Bombyx mori*, denominado SP(bx).

Com base na sequência do cDNA, três primers ‘Forwards’ (F1, F2 e F3 – Tabela 1) foram construídos contendo sítio de restrição para a enzima *Bam*HI e um primer ‘Reverse’ (R1 – Tabela 1) contendo sítio de restrição para a enzima *Hind*III (Figura 7

B). Nos primers F foi adicionado, além dos sítios de restrição, o códon de iniciação de tradução (ATG) na posição 5' quando este fora necessário (caso apenas dos iniciadores F2 e F3).

Tabela 1. Nome e sequências nucleotídicas dos primers utilizados neste trabalho.

Primer	Sequência (5' → 3')
F1	CGGATCCATGAGATCTTTGACGTTGGCTGCTG
F2	CGGATCCATGGAAGAGCATGAAGCTCAGGAAGGC
F3	CGGATCCATGATTCTCGAATGTGTTTTCTCATGCGAC
F4	GAATTCGGATCCATGATTTTTATTTTACTAACAACGCTTTTAGCAGT AAGCGGAGCAAAAACCGCAAATATTCTCGAATGTGTTTTCTCA
F5	GAATTCGGATCCATGAAGATCCTCCTTGCTATTGCCCTTATGCTTAG CACCGTGATGTGGGTGAGCACCATTCTCGAATGTGTTTTCTCA
R1	AAGCTTGAAAGATTGAAACGATTTTATTAAAG
R2	GCGGCCGCAAGCTTTTAAATCTTCAGACACAACCTTGATCTTACA
pSyn (MCS) F†	GCGGCCGCGAATTCGATGATCTATTTATAGG
pSyn (Ac-PH) R†	GTCGACCTGTAAATCAACAACGCACAGAATCTAGCGC
attB-BaTx-F‡	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATTCTCGAATGTGTTTTCTCAT
attB-BaTx-R‡	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAATCTTCAGACACAACCTTGATC
P35 F*	ATGTGTGTAATTTTTCCGGTAGAAATCG
P35 R*	TTATTTAATTGTGTTTAATATTACA
M13 F**	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13 R 2***	GAGCGGATAACAATTTACACAGG

†Usados para construção do vetor pFastBac1® modificado para produção de baculovírus oclusão positiva via transposição; ‡ primers usados para inserir região de recombinação *in vitro* usada em tecnologia Gateway (Invitrogen); * primer usado para confirmar presença de DNA viral; **primer indicado para confirmação de transposição via bac-to-bac pelo fabricante; *** este primer é diferente do recomendado pelo fabricante; uma vez que o recomendado gera muitas bandas inespecíficas.

As reações continham 10 ng do cDNA, 1X do tampão da enzima, 1 U da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega) e 300 μ M de dNTP. Cada uma das três reações feitas apresentava F1 e R1, F2 e R1 ou F3 e R1 numa concentração final de 0,4 μ M. A amplificação foi feita em termociclador ESCO ® modelo Swift maxi® ou BIO-RAD Thermal Cycler modelo C1000™ de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Programa utilizado para amplificação dos três cassetes da toxina BaTx. Para os três conjuntos de iniciadores foram utilizadas a mesma temperatura de anelamento.

	Etapa	Temperatura	Tempo
35 ciclos	Desnaturação inicial	95 °C	3 min
	Desnaturação	94 °C	15 s
	Anelamento	54 °C	20 s
	Extensão	72 °C	20 s
	Extensão final	72 °C	5 min
	Estoque	12 °C	∞

As reações foram aplicadas em gel de agarose 2% submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5 X (solução aquosa contendo 45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA), coradas em brometo de etídio (solução aquosa de 0,5 μ g/ml), analisadas em luz UV (Alpha Innothech AlphaImager® Mini com software homônimo) e fotografadas conforme descrito em Sambrook & Russel (2001). Neste trabalho foram utilizadas cuba Owl modelos B1 e D3 ou BIO-RAD modelo Sub-Cell GT Basic e Wide Mini-Sub Cell GT Basic, e como fonte Pharmacia LKB modelo EPS 500/400 para esta e as seguintes eletroforeses. Os fragmentos observados foram cortados do gel com uma lâmina e purificados seguindo instruções do fabricante do ‘GFX PCR DNA and Gel Band

Purification kit' (GE Healthcare) (todas as purificações posteriores relacionadas à eluição de DNA de gel de agarose utilizaram o mesmo material e método supracitado).

Os fragmentos purificados foram ligados no vetor pGem®-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Este vetor permite a clonagem direta de fragmentos de PCR amplificados com a enzima *Taq* DNA polimerase. Esta enzima tem a característica de adicionar no fim de cada molécula de DNA amplificada um desoxiadenilato sobressalente. O sistema de clonagem utiliza-se dessa característica ao fornecer o vetor pGem®-T easy aberto no meio de um peptídeo marcador (peptídeo α da enzima β -galactosidase) com extremidades contendo um desoxitimidilato sobressalente (daí o termo '-T easy'). Estes desoxitimidilatos se pareiam com os desoxiadenilatos presentes nas extremidades do amplicon e na presença da enzima T4 DNA-ligase e condições favoráveis (tampão e temperatura) ocorre ligação do fragmento amplificado (inserto) ao vetor. A reação resultante foi transformada em linhagem DH5 α (Invitrogen) de bactérias *E. coli* quimiocompetentes (Sambrook e Russel, 2001) e os procedimentos para obtenção de plasmídeos clonados foi feito conforme instrução do fabricante (incubadora a 37 °C sem agitação em QUIMIS® Estufa Incubadora).

Plasmídeos recombinantes resultantes foram purificados (Sambrook e Russel, 2000), digeridos com *Bam*HI e *Hind*III (Promega) seguindo instruções do fabricante e separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmação de clonagem. Todos os plasmídeos foram submetidos a sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) com iniciadores universais (SP6 e T7) que se anelam em regiões flanqueadora do cassete clonado, presentes no vetor pGem®-T easy.

4.4 Clonagem no vetor de transferência e construção de baculovírus recombinantes vAc/occ- contendo a toxina

Os fragmentos observados em gel de agarose 1,5% a partir da digestão de pGem-SP-Pp-BaTx, pGem-Pp-BaTx e pGem-BaTx com enzimas *Bam*HI e *Hind*III foram purificados do gel e clonados no vetor de transferência pFastBac1® (Invitrogen). Este vetor foi comercialmente obtido e transformado por choque térmico em bactérias quimiocompetentes da linhagem DH5α (Invitrogen) a fim amplificá-lo. As bactérias transformadas foram então semeadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e gentamicina (7 µg/ml). Colônias que apareceram em placa foram postas para crescer em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos citados e em mesma concentração. O plasmídeo foi extraído e digerido com enzimas *Bam*HI e *Hind*III, corrido em gel de agarose a 0,8%, purificado do gel e utilizado em subclonagens posteriores.

O vetor pFastBac1® foi construído por Anderson *et al.* (1996) (citado no manual Bac-to-bac) e contém um promotor do baculovírus AcMNPV que permite alto nível de expressão protéica em tempos tardios de infecção (até 1 g de proteína heteróloga por litro de cultura – Grenwald e Heitz, 1993). Conforme pode ser observado na Figura 8, o plasmídeo pFastBac1® contém o gene de resistência ao antibiótico ampicilina e o cassete de expressão flanqueado a direita e a esquerda por “braços” Tn7 que são marcadores de um transposon bacteriano. O entre-flancos contém, além do cassete de expressão (promotor mais algum gene de interesse clonado no sítio para clonagens múltiplas), o gene de resistência a gentamicina e um sinal de poliadenilação do vírus SV40, formando assim um mini-Tn7. Por esse motivo, o pFastBac1® pode ser denominado plasmídeo de transferência ou doador. Assim, para que ocorra a

transposição bacteriana, é necessário um DNA-doador que contenha os braços Tn7, um DNA alvo que contenha o sítio alvo de inserção chamado de mini-*att*Tn7 e a enzima que executará o evento de transposição.

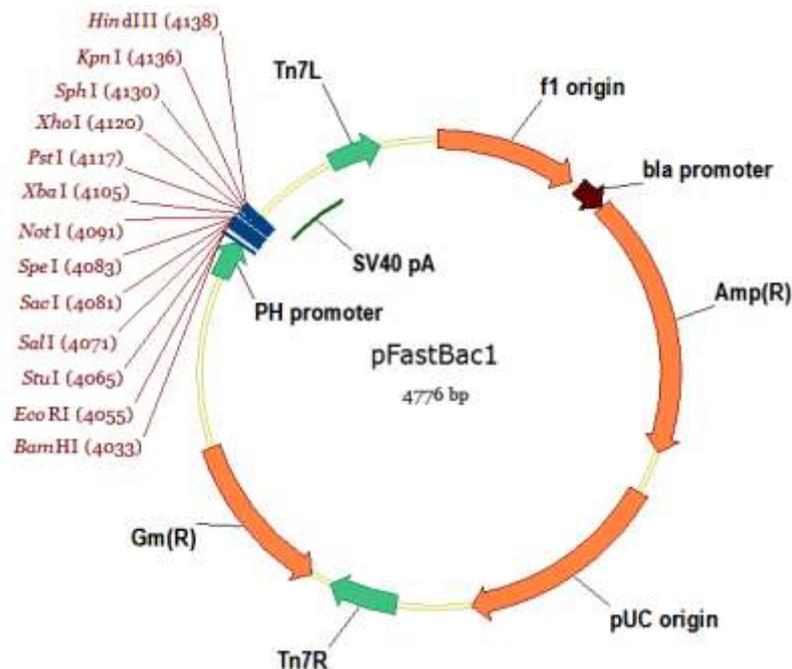


Figura 8. Mapa do plasmídeo comercial pFastBac1® (Invitrogen). Este plasmídeo apresenta um amplo sítio múltiplo para clonagem (sítio para enzimas estão sendo mostrados em vermelho) posterior ao promotor da poliedrina (PH promoter). Neste esquema estão sendo mostrados os braços homólogos para transposição Tn7L e R, um sinal de poli-adenilação (SV40 pA); gene de resistência a gentamicina (Gm(R)) e ampicilina (Amp(R)); duas origens de replicação para cópias múltiplas (f1 e PUC) .

O sistema de expressão baculoviral Bac-to-bac (Invitrogen) contém uma linhagem de *E. coli* DH10Bac que fornece as duas moléculas necessárias para que ocorra a transposição, o bacmídeo bMON14272 (136 kpb) e o plasmídeo pMON14272 (13,2 pb).

O bacmídeo bMON14272 é a molécula alvo da transposição que contém (a) uma origem de replicação mini-F para baixo número de cópias, (b) marcador de resistência a canamicina, e (c) segmento de DNA que codifica o peptídeo LacZ α , no qual o sítio para transposição bacteriana *miniattTn7* foi inserido (o sítio não interrompe a ORF do peptídeo). O bacmídeo é, na verdade, o genoma do baculovírus AcMNPV (DNA dupla-fita circular) transformado em um plasmídeo gigante que se propaga em *E. coli* conferindo resistência a canamicina e complementando uma deleção do gene LacZ presente no cromossomo da bactéria (semelhante ao que ocorre em clonagens utilizando o vetor pGem®-T easy). Na presença do peptídeo α do LacZ, colônias azuis podem ser formadas quando um substrato cromogênico como X-gal e seu indutor artificial, IPTG são adicionados ao meio de cultura. O bacmídeo apresenta o fenótipo de não-formação de poliedros (aqui chamado de *occ-*, do inglês ‘negative occlusion’), uma vez que o cassete Mini-F/LacZ α (*miniattTn7*)/canamicina substituiu o locus do gene da poliedrina.

O plasmídeo pMON7124, por sua vez, confere resistência a tetraciclina e atua como plasmídeo ‘helper’ (do inglês, ‘ajudante’), fornecendo a função de transposição Tn7 *in trans* (Barry, 1988) ao produzir constitutivamente uma transposase (enzima capaz de reconhecer fragmentos de DNA flanqueados por regiões homólogas, excisar e inserir este fragmento em regiões específicas *in trans* ou *in cis*). Assim, quando uma bactéria da linhagem DH10bac é transformada com o vetor pFastBac1®, ocorre a transposição de todo o cassete para a região alvo *miniattTn7* presente no bMON14272 (plasmídeo gigante contendo o genoma do baculovírus AcMNPV).

Os plasmídeos doadores recombinantes contendo as três diferentes estratégias da toxina foram separadamente transformados em linhagem DH10bac (500 ng de cada plasmídeo recombinante) segundo instruções do fabricante. As células transformadas

foram incubadas em placa de Petri contendo tetraciclina (10 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), gentamicina (7 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) e X-gal (100 µg/ml) a 37°C por 48 h. Os bacmídeos recombinantes (advindos de colônias brancas) foram submetidos à análise por PCR para confirmar a transposição utilizando-se iniciador específico para o gene da toxina (F3) e também para a região próxima ao gene do peptídeo LacZ- α (primers M13) ou do gene da canamicina presente no bacmídeo (KL F). As reações continham 10 ng dos bacmídeos recombinantes, 1X do tampão da enzima, 1 unidade da enzima *Taq* DNA polymerase (Phoentria), 300 µM de dNTP e 0,4 µM dos primers. As reações foram submetidas ao programa representado na Tabela 2, mudando-se apenas a temperatura de anelamento para 53°C e o tempo de extensão para 1,5 min.

Seguiram-se as instruções do fabricante para obtenção do vírus recombinante a partir dos três bacmídeos remanescentes da transposição. Uma característica bastante interessante e peculiar do baculovírus é a de que seu DNA nu é infectivo. Isso permite que, uma vez propagado como plasmídeo gigante em sistema bacteriano, o bacmídeo possa ser recuperado e transfectado em células permissivas de inseto, iniciando o ciclo de infecção (Rohrmann, 2011).

A internalização do DNA nu infectivo é feita por meio de transfecção lipossomal. Este método consiste na associação prévia do DNA-alvo a lipossomos (pequenas vesículas formadas por bicamadas de fosfolipídios sintéticos) e posterior incorporação desse sistema à cultura de células alvejada. Depois da incorporação (fusão do lipossomo à membrana celular), o DNA é liberado dentro do citoplasma e por motivos desconhecidos, é encaminhado para o núcleo, iniciando assim a infecção viral.

Para as transfecções, células DH10Bac portando bacmídeos recombinantes foram postas para crescer em meio contendo apenas canamicina (50 µg/ml) e gentamicina (7 µg/ml). Os três plasmídeos gigantes recombinantes foram purificados

por lise alcalina e 1 µg de DNA vindo de cada bacmídeo foi diluído em 100 µl de meio de cultura TC-100 (GIBCO), para cada amostra, 5 µl de lipossomos (Cellfectin®, Invitrogen) foi adicionados em 100 µl de meio de cultura TC-100. As duas misturas foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente para que o DNA se incorporasse aos lipossomos. Após a incubação, o meio de cultura contendo monocamada de células de inseto (aproximadamente 10^6 células) da linhagem BTI-Tn5B1-4 foi removido e a mistura acrescida de 800 µl de meio de cultura sem soro foi adicionada à placa, de modo a recobrir toda a monocamada celular. Este sistema foi incubado à temperatura ambiente por 4 h e depois foram adicionados 1,5 ml de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 7 dias em estufa a temperatura ambiente e características infectivas foram observadas via microscopia de luz.

Os sobrenadantes das placas contendo vírus recombinantes foram utilizados como inóculo para amplificação do microrganismo em placas de 100 mm, contendo células BTI-Tn5B1-4 (5×10^6 células) e para posteriores ensaios. O DNA dos três vírus recombinantes gerados foi purificado segundo O'Reilly *et al.* (1992) e utilizado em reação de PCR semelhante a reação inicial de amplificação mostrada na Tabela 2.

4.5 Construção de vírus contendo a toxina BaTx fusionada a peptídeos sinais para secreção

A toxina madura (BaTx) foi fusionada a um peptídeo sinal de secreção a fim de enviá-lo para o retículo endoplasmático e promover incursão à via exocítica. É fato que o fragmento SP-Pp-BaTx (cujo método de obtenção foi discutido anteriormente) contém um peptídeo sinal de secreção natural à aranha; entretanto, não se pode, por exemplo,

certificar o reconhecimento da maquinaria do inseto e correto processamento deste sinal intra-molecular em insetos.

Diante disso, foram utilizados neste trabalho os peptídeos sinais (57 pb) dos genes *UDP-glicosiltransferase de ecdisteróide (egt)* do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyedrovirus* (AgMNPV) (Pinedo *et al.*, 2003) e *bombyxina* da mariposa *Bombyx mori* (Adachi *et al.*, 1989).

Promoveu-se, então, a síntese de dois novos primers F (F4 e F5, Figura 5 e Tabela 1) que permitiram a fusão direta dos peptídeos sinais à toxina BaTx madura por uma única reação de PCR. Além disso, estes primers adicionaram sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* respectivamente. Foi também desenhado um segundo primer R (R2, Figura 5 e Tabela 1) que excluía a região 3' UTR e adicionava aos fragmentos amplificados sítios de restrição para as enzimas *HindIII* e *NotI*.

As reações continham 10 ng do cDNA, 1X do tampão da enzima, 1 unidade da enzima Platinum Taq DNA polymerase (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂, 300 µM de dNTP e 0,4 µM dos primers F4/F5 e R2. As amplificações foram feitas em termociclador (citado no tópico 4.3) de acordo com a Tabela 2, mudando-se apenas a temperatura de anelamento para 65°C. Os fragmentos gerados foram ligados no vetor pGem®-T easy (Promega) e transformado em bactérias quimiocompetentes (método citado em 4.1) da linhagem DH5α seguindo instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram submetidos à digestão com enzimas *BamHI* e *HindIII* (Promega) conforme orientações do fabricante e sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul).

Os fragmentos liberados pela digestão dos plasmídeos recombinantes com *BamHI* e *HindIII* (Promega) foram purificados e clonados no vetor comercial pFastBac1® (Invitrogen) previamente digerido com mesmas enzimas e purificado de gel. Os plasmídeos resultantes foram purificados por lise alcalina conforme descrito em

Sambrook & Russel (2001), confirmados por digestão com *Bam*HI e *Hind*III e utilizados para transformar separadamente linhagem bacteriana DH10Bac quimiocompetentes (por volta de 500 ng de cada plasmídeo) conforme instruções do fabricante, a fim de gerar bacmídeos recombinantes semelhante ao método abordado anteriormente. Os plasmídeos gigantes transpostos foram purificados por lise alcalina e confirmados por PCR utilizando-se 0,4 µM dos primers F3 e M13 R2 em reação contendo 10 ng dos bacmídeos recombinantes, 1X do tampão da enzima, 1 unidade da enzima Taq DNA polymerase (Phoneutria) e 300 µM de dNTP. As reações foram submetidas ao programa mostrado na Tabela 2, mudando-se apenas a temperatura de anelamento para 60°C e o tempo de extensão para 1 min. Um micrograma de cada um dos bacmídeos confirmados foi então utilizado em ensaio de transfecção para obtenção dos vírus recombinantes carregando duas versões da toxina fusionada aos peptídeos sinais de secreção, semelhante aos três bacmídeos citados anteriormente.

4.6 Construção de pFastBac1® modificado e geração de baculovírus recombinantes vAc/occ⁺ por transposição

Os vírus até então produzidos não apresentam o fenótipo de infecção PIB (do inglês ‘Polyhedral inclusion bodies’, são baculovírus occ⁻); isto quer dizer que não podem ser utilizados em ensaio de infecção *per os* em lagartas suscetíveis. Dessa forma, a infecção só poderia ocorrer via injeção intra-hemocélica. Para aquisição de vírus que produzam poliedros (aqui denominado de fenótipo occ⁺, do inglês ‘positive occlusion’), foi construído um vetor pFastBac1® que continha o gene intacto da poliedrina com seu promotor. Para tal propósito, dois primers foram sintetizados, pSyn(MSC) F e pSyn(Ac-PH) R (Tabela 1). Uma reação de PCR foi feita utilizando-se estes dois iniciadores e o

vetor pSyn XIV VI+ X3 (Wang *et al.*, 1991) (Figura 9) como DNA molde. Este vetor de transferência é utilizado para construção de baculovírus AcMNPVs recombinantes através do método de recombinação homóloga. Com base na Figura 9, é possível observar que o vetor apresenta dois promotores virais híbridos (pSyn e pXIV) *in tandem* dirigindo a expressão de um gene heterólogo a ser clonado no sítio de clonagens múltiplas, o gene da poliedrina com seu promotor e duas ORFs virais (ORF 603 e ORF 1629) flaqueando todo o cassete.

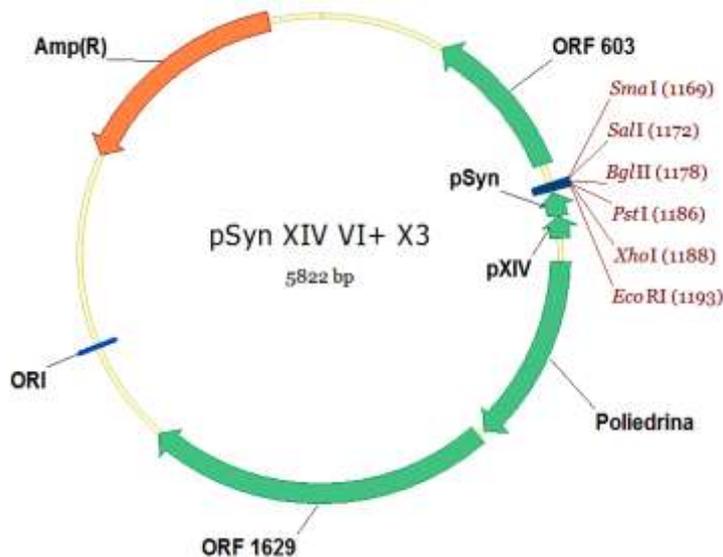


Figura 9. Plasmídeo para construção de baculovírus recombinantes pelo ineficiente método de recombinação homóloga. O plasmídeo apresenta um sítio múltiplo de clonagem (sítio para enzimas estão sendo mostrados em vermelho) próximo a dois promotores virais *in tandem*, pXIV e pSyn que dirigem a expressão do gene heterólogo e o gene da poliedrina com seu promotor nativo, pPolh. Flanqueando este cassete existem duas ORFs virais, ORF 603 e ORF 1.629 que serão substrato para a recombinação dentro da célula de inseto.

No processo de recombinação homóloga, assim como no processo de transposição *in trans* explicado anteriormente, dois tipos de materiais genéticos são necessários: o DNA alvo, neste caso o vírus vSynVI-gal (Wang *et al.*, 1991) e o DNA doador, o plasmídeo pSyn XIV VI+ X3 que apresenta flancos para o processo de

recombinação como mostrado na figura 6. O DNA do vírus transgênico vSynVIgal (derivado do AcMNPV) apresenta na região alvo da recombinação um cassete contendo o gene da β -galactosidade (*lac-Z*) sob o comando do promotor pSyn. O fenótipo de placa deste vírus é occ^- , pois o gene da poliedrina está interrompido pelo cassete anteriormente citado, e na presença de substrato cromogênico, como o X-gal, o meio fica com coloração azul. Após a recombinação homóloga com o plasmídeo pSyn XIV VI+ X3 recombinante, o vírus resultante passa a expressar um gene heterólogo de interesse, ter o fenótipo occ^+ e na presença de X-gal o meio não fica azul. O vírus desejado é então purificado pelo método de ‘end point dilution’ (O’Reilly *et al.*, 1992), em sucessivas diluições, infecções e análise de características da infecção, a fim de enriquecimento da população viral recombinante.

Para abandono deste método, propôs-se a construção de um vetor de transposição bacteriana (pFastBac1®) contendo o gene da poliedrina intacto e promotores para expressão de genes heterólogos de interesse. O objetivo da PCR utilizando os primers pSyn(MSC) F e pSyn(Ac-PH) R foi amplificar o cassete contendo os promotores *in tandem* e o gene da poliedrina com seu promotor nativo. A reação continha 10 ng do plasmídeo pSyn XIV VI+ X3, 1X do tampão da enzima, 5 unidades da enzima ‘LongAmp Taq DNA Polymerase’ (New England Biolabs), 300 μ M de dNTP e 0,4 μ M dos primers pSyn(MSC) F e pSyn(Ac-PH) R. O fragmento gerado (denominado PSX) foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,5% (Sambrook & Russel, 2001), purificado do gel e clonado no vetor pGemT® easy conforme instruções do fabricante. O plasmídeo gerado foi confirmado por digestão com a enzima *EcoRI* e sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul).

O vetor pFastBac1®, antes de ser alvo de ligação do cassete amplificado, foi modificado a fim de excluir de sua sequência o promotor da poliedrina. O vetor foi

digerido com a enzima *AccI* (Promega) conforme instrução do fabricante. Após digestão, o fragmento que correspondia ao vetor sem o promotor viral foi separado em gel de agarose a 0,8%, purificado de gel, religado (usando enzima T4 DNA ligase (Promega) segundo instrução do fabricante) e transformado em bactérias *E. coli* quimiocompetentes da linhagem One Shot® TOP10 (Invitrogen). As células transformadas foram semeadas em meio LB-ágar contendo gentamicina (7 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml). A construção do plasmídeo recombinante foi confirmada por digestão usando-se enzimas *Bgl*II e *Eco*RI (FastDigest® – Fermentas), seguindo instruções do fabricante e o vetor foi usado para transposição em linhagem DH10Bac, a fim de gerar o bacmídeo recombinante “selvagem” sem característica oclusiva.

Para construção do pFastBac1® modificado, o plasmídeo pGem-PSX foi digerido com as enzimas *Spe*I (Promega) e *Not*I (FastDigest®, Fermentas) conforme instruções dos fabricantes. O fragmento liberado foi separado em gel de agarose e clonado no vetor pFastBac1/*Acc*I também digerido previamente com as enzimas *Spe*I e *Not*I. Este vetor recombinante foi usado para transposição em linhagem DH10Bac, a fim de gerar o bacmídeo recombinante com característica oclusiva. Além disso, o vetor pFastBac1/*Acc*I também foi utilizado em transposição a fim de gerar bacmídeo recombinante sem característica oclusiva e sem gene heterólogo. O DNA de ambos foi extraído por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001) e 1 µg de cada foi utilizado para transfecção em células de insetos da linhagem BTI-Tn5B via lipossomos (Cellfectin®, Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Os fenótipos occ (presença ou ausência de poliedros) foram observados e fotografados em placa por microscopia de luz invertida (Axiovert 100, Zeis).

4.7 Construção de baculovírus recombinantes vAc/occ⁺ expressando a toxina

Para construção dos vírus occ⁺ contendo diferentes estratégias da toxina, o plasmídeo pGem-BaTx foi digerido com *NotI* (Promega) e os plasmídeos pGem-SP(egt)-BaTx e pGem-SP(bx)-BaTx foram digeridos com *EcoRI* e *NotI* (Promega) segundo instruções dos fabricantes. Os fragmentos gerados foram purificados e clonados (como citado para clonagens em pFastBac1) no vetor pFastBac1/*AccI*-PSX previamente digerido ou com *NotI* e defosforilado com SAP (do inglês, ‘Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega) ou com *EcoRI* e *NotI*, conforme instruções dos fabricantes. Os plasmídeos recombinantes gerados foram purificados por lise alcalina, confirmados por digestão com *BamHI* (Promega), sequenciados utilizando-se o primer pFastBac R (fornecido pela empresa de sequenciamento Macrogen Inc., Coreia do Sul) e utilizados para transposição em linhagem DH10Bac.

Os bacmídeos recombinantes gerados foram purificados, confirmados por PCR utilizando-se primers F3 e KL F. A reação de amplificação para confirmar a transposição continha 10 ng dos bacmídeos recombinantes, 1X do tampão da enzima, 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), 300 µM de dNTP e 0,4 µM dos primers F3 e KL F. As reações foram submetidas ao programa apresentado na tabela dois, mudando apenas a temperatura de anelamento para 60 ° C e o tempo de extensão para 1,5 min. Depois de confirmados, um micrograma dos bacmídeos recombinantes foi utilizado em transfecção em células de insetos da linhagem BTI-Tn5B via lipossomos, semelhante a transfecções anteriores.

4.8 Microscopia de células de *S. frugiperda* e *T. ni* infectadas com baculovírus recombinantes

Monocamadas confluentes de células IPLB-Sf21-AE e BTI-Tn5B1-4 (aproximadamente 10^5 células) foram incubadas com meio contendo multiplicidade de infecção (termo geralmente abreviado por m. o. i., do inglês, ‘multiplicity of infection’ que representa o número de partículas virais maduras e infectivas [= vírions] para cada célula) de 10 vírus/célula por 1 h para cada um dos 10 recombinantes virais construídos neste trabalho. O meio contendo vírus foi removido e substituído por meio estéril, a fim de se fotografar as células infectadas em cultura a 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (h p.i.).

Para análise ultraestrutural de infecção, somente células IPLB-Sf21-AE (10^6 células) foram infectadas semelhantemente ao método supracitado apenas com os vírus recombinantes vAc/occ- e vAc-BaTx. O processamento iniciou-se a 36 h p.i.: (1) as células foram ressuspendidas no próprio meio de cultura; (2) foram postas em tubo tipo Falcon de 15 ml e; (3) coletadas por centrifugação a $2.000 \times g$ por 5 minutos em 4°C . (4) As células foram lavadas por três vezes em 1 ml de PBS 1X (pH 6,4) em tubo de microcentrífuga e (4) fixadas em tampão Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 6,4) por 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, (5) as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1M (pH 6,4) por três vezes; e conservadas neste mesmo tampão a 4°C até processamento. (6) As células foram então sedimentadas e pós-fixadas por 30 min em solução de pós-fixação (tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianete de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio, pH 6,4). (7) Os sedimentos foram lavados por três vezes em água destilada e (8) contrastados *in bloc*

por 12 h em acetato de uranila a 0,5%. (9) As células foram desidratadas em soluções contendo concentração crescente de acetona (30 – 100%) por 5 min em cada concentração. Depois disso, (10) os sedimentos foram incluídos em resina Spurr e emblocadas por 72 h a 60°C. Após ultramicrotomia, as seções foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

4.9 Ensaio de citotoxicidade para células de *S. frugiperda* e *T. ni*

Baculovírus recombinantes occ- e occ+ contendo diferentes versões da toxina sob o comando de diferentes promotores foram propagados em células BTI-Tn5B1-4. Posteriormente os sobrenadantes obtidos foram titulados segundo O'Reilly *et al.* (1992) em mesma linhagem e usados em ensaio de viabilidade celular.

Monocamadas confluentes de células IPLB-Sf21-AE e BTI-Tn5B1-4 em triplicata foram incubadas com meio contendo multiplicidade de infecção de 10 vírus/célula, por 1 h. O meio infectante foi removido e substituído por meio estéril, a fim de se iniciar os ensaios de contagem de células mortas e de viáveis a 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h p.i.

Para contagem de células (1) o meio de cultura foi removido, (2) foi adicionado solução de azul de Trypan (Gibco) 0,4% em PBS 1X até recobrir a monocamada; e então, as células permaneceram com o corante por 5 min. Posteriormente (3) o azul de Trypan foi removido e (4) foi adicionado PBS estéril 1X por duas vezes à monocamada de células, primeiro para remoção do excesso de corante e segundo para deixar as células em solução aquosa isotônica.

Diferentes campos, no mínimo quatro e no máximo seis, escolhidos randomicamente, de cada uma das três repetições foram fotografados por microscopia

ótica. As células foram contadas e foi, então, calculada a porcentagem de células mortas (coradas em azul) para cada campo. Para obtenção do percentual de células mortas, o número total de células coradas em azul foi multiplicado por 100% e dividido pelo número total de células observadas (células coradas somadas a células não-coradas). Foi calculada a média e o desvio padrão para as porcentagens obtidas e por fim os valores foram plotados em gráficos de linhas usando-se o programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft).

4.10 Construção dos vetores para expressão bacteriana e obtenção de anticorpos murinos

Para clonagem e expressão da toxina BaTx em bactéria foi utilizado o sistema Gateway® (Invitrogen). A tecnologia é baseada no sistema de recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda que age na integração do genoma do fago ao cromossomo da bactéria hospedeira *E. coli* e no equilíbrio de infecção entre os ciclos lítico e lisogênico (Ptashne, 1992). Os componentes que permitem o funcionamento do sistema de recombinação lambda são modificados para fornecer a especificidade e a eficiência de inserção do bacteriófago como ferramenta de clonagem molecular (Bushman *et al.*, 1985).

Existem dois principais componentes dessa tecnologia baseados na estratégia viral: as sequências de recombinação de DNA e as proteínas que medeiam à reação de recombinação (fator de integração do hospedeiro, integrase e excisionase). A integração do vírus no cromossomo do hospedeiro ocorre via recombinação de DNA intermolecular mediada por duas enzimas codificadas pelo invasor e um fator apropriado do hospedeiro. A recombinação ocorre entre sítios de ligação específicos *att* (do inglês, 'attachment sites') na molécula de DNA-alvo. No início do ciclo lisogênico a recombinação ocorre entre sítios *att* do DNA hospedeiro alvo (*attB*) e do DNA doador viral (*attP*) de modo a permitir a inserção

do vírus no genoma bacteriano e conseguinte início do ciclo. Para esta via, o fago necessita da enzima viral integrase e do fator de integração do hospedeiro e o sítio, por sua vez, serve como região de ligação das proteínas de recombinação.

Depois de ocorrer o evento, novos sítios *att* são gerados (*attL* e *attR*) e estes serão utilizados pelo fago para promover a remoção de seu genoma do DNA do hospedeiro e iniciar o ciclo lítico mediante estresse fisiológico, ambiental ou outros fatores arbitrários desconhecidos. O evento é catalisado pelas duas enzimas que participam do ciclo lisogênico e mais uma enzima viral denominada excisionase.

No sistema de clonagem Gateway® os quatro sítios de ligação específicos (*att B*, *P*, *L* e *R*) são utilizados. A reação de recombinação ocorre *in vitro* e a seleção é dada positivamente mediante a presença de gene de resistência no vetor alvo e por seleção negativa mediante adição do antibiótico cloranfenicol que junto à toxina *ccdB* é substituída pelo DNA de interesse.

O cDNA da glândula de veneno da aranha *B. albiceps* foi utilizado em reação de PCR contendo: 50 ng do DNA-molde, 1X do tampão da enzima, 1 U da enzima Platinum Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,4 μM de dNTP e 0,4 μM dos primers *AttB1-BaTx F* e *AttB2-BaTx R* (Tabela 1). Estes primers fornecem flancos *attB* ao amplicon gerado, tornando-o substrato para a reação BP. O programa utilizado é semelhante ao da tabela 2, mudando-se apenas a temperatura de anelamento para 55°C.

O fragmento *attB-BaTx* foi analisado, purificado e utilizado em reação BP Clonase™ (mix de enzima contendo integrase e o fator de integração do hospedeiro – Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Esta reação utilizou como alvo o plasmídeo de entrada pDONR207 que contém sítios de recombinação *attP* flanqueando o gene de resistência a cloranfenicol e à toxina *ccdB* (Figura 10). Uma vez recombinado, este vetor abre uma porta de entrada que permite clonar o DNA inserido por recombinação numa série

de vetores que respondam a objetivos pretendidos. A única restrição é que o vetor alvo contenha sítios específicos para recombinação *attR*.

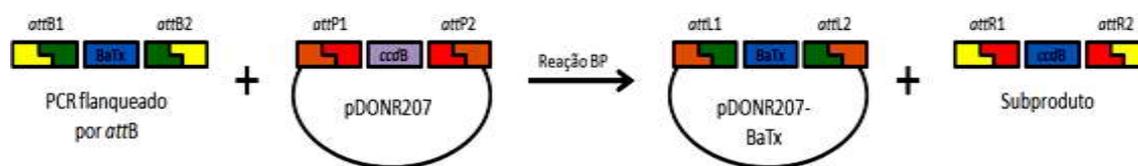


Figura 10. Esquema da reação BP clonase. Durante esta reação, os genes *ccdB* e de resistência a cloranfenicol (oculto no esquema) flanqueados pelos sítios *attP* presentes no plasmídeo pDONR207 são substituídos pelo gene da toxina. Uma vez incorporada ao plasmídeo de entrada, a toxina forma novos sítios específicos *attL* (pDONR207-BaTx).

A reação contendo o plasmídeo recombinante foi utilizada para transformar células quimiocompetentes *E. coli* da linhagem One Shot® TOP10 (Invitrogen). As células transformadas foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico gentamicina (7 µg/ml) e deixadas em estufa a 37°C por 16h. O plasmídeo recombinante pDONR207-BaTx gerado foi purificado e confirmado por digestão utilizando-se as enzimas *ApaI* e *PstI* (Fermentas), conforme instrução do fabricante.

O plasmídeo pDONR207-BaTx gerado por reação BP Clonase™ apresenta sítio específico *attL*, substrato para reação de LR Clonase™ (Invitrogen) (Figura 11 A e B). Para esta reação foram utilizados os vetores de destino e expressão pDEST15 e pDEST17 que apresentam sítios específicos *attR*. As reações LR foram feitas segundo instruções do fabricante. Assim como na reação BP, o mix contendo o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células quimiocompetentes *E. coli* da linhagem One Shot® TOP10 no caso do pDEST17 e da linhagem DH5α no caso do pDEST15. Células foram semeadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml) e colônias geradas foram crescidas a 37°C por 16h em LB líquido mais antibiótico. O vetor de expressão pDEST17 recombinado foi purificado e confirmado por digestão, utilizando-se as enzimas *BglII*

(Fermentas) e *Hind*III (Promega) segundo instruções do fabricante e por sequenciamento; enquanto o vetor de expressão pDEST15 recombinado foi purificado e confirmado por digestão com *Eco*RI e *Nco*I (FastDigest®, Fermentas) segundo instruções dos fabricantes.

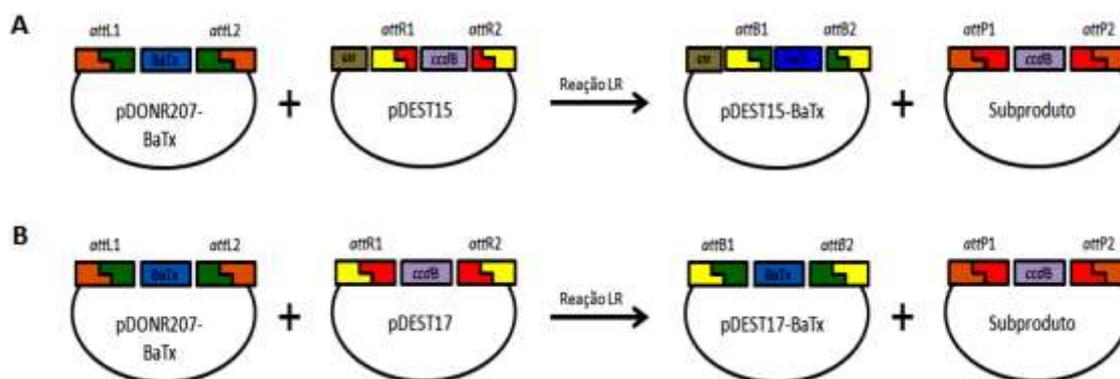


Figura 11. Esquema da reação LR clonase. Durante esta reação clonase – mostrada na figura B, os genes *ccdB* e de resistência a cloranfenicol flanqueados pelos sítios *attR* também são substituídos pelo gene da toxina, que agora está fusionada a (A) GST ou a (B) cauda de hexa-histidina. Uma vez incorporada ao plasmídeo de entrada, a toxina refaz os sítios *attB*.

A expressão da toxina-quimera nos vetores construídos é dirigida pelo promotor T7 similar ao sistema de expressão pET que usa elementos do bacteriófago para controlar a expressão heteróloga. No fago T7 este promotor forte é reconhecido exclusivamente por uma RNA polimerase codificada pelo próprio vírus, a enzima T7 RNA polimerase (T7 RNAP). Assim, para que ocorra a transcrição do gene exógeno em sistema bacteriano é necessário que se forneça a polimerase ao sistema. Isso só é possível de duas formas: (1) inserindo-se no genoma da bactéria a sequência da enzima sob o comando de um promotor sujeito a indução química ou (2) infectando a célula com o fago.

Células de *E. coli* da linhagem BL21-AI (Invitrogen) quimiocompetentes foram transformadas com os vetores pDEST15-BaTx e pDEST17-BaTx. Esta linhagem permite que genes regulados pela T7 RNAP sejam expressos por indução química. Derivada da linhagem BL21 (Grodberg e Dunn, 1988; Studier e Moffatt, 1986), a cepa BL21-AI contém

uma troca cromossomal do gene *araB* pelo gene que codifica a enzima T7 RNAP do fago T7 dentro do operon araBAD. Assim, a expressão da enzima é regulada pelos açúcares L-arabinose que induz a expressão a partir do PBAD e glicose que reprime a expressão basal a partir do PBAD.

Para análise do peptídeo recombinante expresso pelo vetor pDEST17-BaTx, foi feita expressão piloto da toxina BaTx em BL21-AI conforme instruções contidas no manual ‘*E. coli* Expression System with Gateway Technology’ versão G, páginas 18 e 19 (Invitrogen). As proteínas obtidas foram aplicadas em gel tris-tricina SDS-PAGE (Schägger, 2006), usando-se o aparelho Mini-Protean® Cell (BioRad) segundo instruções do fabricante.

Análise da expressão da toxina 6xHis-BaTx foi feita por imunomarcção usando anticorpo primário anti-hexa-histidina monoclonal (Invitrogen) e secundário conjugado a fosfatase alcalina. Depois de realizada tris-tricina SDS-PAGE, as proteína presentes na matriz foram submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C pure – Amershan), segundo instruções do fabricante e utilizando tampão de transferência Bjerrum e Schanfer-Nielsen (48mM de Tris; 39 mM de glicina; 20% metanol, pH 9,2). A membrana foi lavada com água destilada sucessivas vezes para retirar o corante e bloqueada por 30 min sob agitação leve a 25°C em tampão PBS/leite (5% de leite em pó desnatado diluído em PBS 1X).

Para imunomarcção, (1) a membrana foi lavada por 15 min em tampão PBS/Tween (PBS 1X ; Tween 0,05%) sob agitação leve em Thermolyne RotoMix Type 48200 (o tampão foi trocado a cada 5 min). Depois da lavagem, (2) a membrana foi colocada em contato sob agitação leve por 1 hora com solução contendo o anticorpo primário anti-hexa-histidina de camundongo diluído em PBS/leite (PBS 1X; leite em pó desnatado 0,5%). A solução foi descartada e (3) a membrana foi lavada por 3 vezes com o tampão PBS/Tween. (4) A membrana foi então colocada em contato com o tampão contendo anticorpo

secundário anti-IgG de camundongo (Sigma) conjugado a fosfatase alcalina em solução PBS/leite (PBS 1X; leite em pó desnatado 0,5%) por 1 hora sob agitação leve. (5) A solução foi descartada e a membrana foi lavada por mais 3 vezes com PBS/Tween. Depois da lavagem, (6) a membrana foi incubada com tampão da fosfatase alcalina (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM e Tri-HCl 100 Mm – pH 9.0) por 5 min sob agitação leve. (7) A solução foi removida e a membrana foi incubada por 10-20 min em solução reveladora contendo NBT/BCIP (substrato para fosfatase alcalina – SIGMA) e tampão da fosfatase alcalina conforme instrução do fabricante. (8) A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água destilada.

Para expressão e análise da toxina fusionada a proteína GST expressa pelo vetor pDEST15-BaTx, foi feita expressão piloto em BL21-AI. Os extratos celulares para diferentes tempos de indução e para as frações solúveis e insolúveis foram aplicados em gel tris-glicina SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) usando-se o aparelho Mini-Protean® Cell (BioRad) segundo instruções do fabricante.

Posteriormente foi feito ensaio de expressão em escala maior para excisão da banda correspondente a proteína recombinante cuja expressão aumentou mediante indução com L-arabinose. As bandas cortadas do gel foram solubilizadas em PBS 1X e utilizadas para imunização em camundongos.

Para imunização, quatro camundongos albinos Balb/c foram injetados subcutaneamente em região dorsal com 100 µl de solução contendo a proteína de interesse a um intervalo de 15 dias para cada injeção. Em primeira imunização (dia 0), solução contendo proteína (componentes: proteína numa concentração total > 5 µg)/poli-acrilamida/PBS) foi misturada numa proporção de 1:1 com adjuvante completo de Freund (Sigma). Para a segunda imunização (dia 15) foi misturada a solução da proteína ao adjuvante incompleto de Freund (Sigma) na proporção de 1:1. A última imunização (dia 30) feita apenas com a solução contendo a proteína. Os camundongos no dia 45 foram

devidamente sedados e por pulsão orbital, o sangue foi extraído, adicionado em tubo de microcentrífuga e incubado por 2 h a 37°C. A solução coagulada foi centrifugada por 15 min a 2.000 x g e o plasma contendo anticorpos circulantes foi removido. O plasma foi misturado com glicerol para uma concentração final de 10% e incubado a 4°C.

Os anticorpos murinos produzidos foram testados em dot-ELISA contra extratos de bactérias induzidas a 0 e 1 h, expressando a proteína GST-BaTx. Os extratos foram incubados com 'Laemmli Sample Buffer' (com modificações 60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol) e aplicados na forma de pequenos círculos ('dots') em membrana de nitrocelulose (Hybond-C purê – Amershan). A membrana foi tratada conforme citado anteriormente em ensaio de imunomarcção, usando como anticorpo primário cada um dos soros obtidos. Depois de testados por dot-ELISA os antisoros foram usados em imunomarcção dos extratos bacterianos imobilizados em gel para confirmação de produção de anticorpos anti- a banda excisada do gel. Extratos de bactérias induzidas a 0 e 1 h foram aplicados em gel SDS-PAGE 12%. Proteínas imobilizadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose que foi bloqueada e imunomarcada como descrito anteriormente, porém usando como anticorpo primário o plasma obtido dos ratos imunizados, numa diluição de 1:500 em solução PBS/leite (PBS 1X; leite em pó desnatado 0,5%). Como alternativa para o antisoro produzido a partir da toxina fusionada a GST, um antisoro produzido contra a toxina Ba1 foi gentilmente cedido pelo Dr. Gerardo Corzo (Universidade Autônoma do México).

4.11 Análise de expressão da toxina BaTx a nível transcricional e traducional em células de inseto

Monocamada de células da linhagem IPLB-Sf21-AE foram infectadas com os diferentes recombinantes construídos neste trabalho em placas de 12 poços. As células

foram infectadas sob mesma condição citada no tópico 4.10 do Material e Métodos. Promoveu-se a coleta das amostras testadas a 0, 12, 24 e 36 h p. i., para extração de RNAs totais produzidos antes e durante infecção. Nos tempos devidos de infecção, o sobrenadante das células foi removido e adicionou-se 500 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen) diretamente à cada poço da placa com cultura. A amostra foi homogeneizada pipetando-se sucessivas vezes e transferida para tubo de microcentrífuga (as amostras foram incubadas a -80°C até finalização do experimento, após finalização, os tubos foram retirados do freezer e descogelados a temperatura ambiente). Para passos posteriores o protocolo padrão fornecido pelo fabricante foi rigorosamente seguido.

Para reação de transcrição reversa foi utilizada a enzima ‘Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase’ (M-MLV-RT) (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. O primer F3 foi usado para aquisição de cDNA. Esta enzima é empregada na síntese da primeira fita do cDNA e usa como molde moléculas de ssRNA ou ssDNA para sintetizar uma fita de DNA complementar a partir de um primer. Para reação de PCR usando cDNAs como molde, foi feita reação semelhante à primeira reação com cDNA de glândula de veneno, segundo tabela 2, porém com temperatura de anelamento de 60°C, tempo de extensão de 20 s e primers F3/R2.

Para análise pós-traducional de versões da toxina, monocamadas confluentes de células de *S. frugiperda* e de *T. ni* foram individualmente infectadas (multiplicidade de infecção de 10 vírus/célula) com baculovírus recombinantes em placas de seis poços. As células foram re-suspendidas no próprio meio de cultura em 1 ml de PBS 1X a 48 h p. i. A solução contendo as células infectadas foi centrifugada a 2.000 x g por 5 min e o sedimento foi lavado por três vezes com solução aquosa de PBS 1X. As células, após lavagem, foram ressuspendidas em 50 µl de PBS 1X e por fim, foi adicionado 50 µl de ‘Laemmli Sample Buffer’ (com modificações 60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol) a cada amostra. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C.

Os extratos celulares foram duplamente aplicados em gel SDS-PAGE a 17% e corridos a 150 V (voltagem constante) usando o aparelho Mini-Protean® Cell (BioRad) segundo instruções do fabricante. Uma das repetições dos géis foi incubada com Solução Descorante (40% metanol e 10% de ácido acético) por 1 h para fixação de proteínas ao gel. A solução foi removida e o gel foi corado por 2 h em Solução Corante (0,1% (w/v) de azul de Coomassie, 20% (v/v) de metanol e 10% (v/v) ácido acético); o gel foi então descorado e analisado. Por outro lado, o segundo gel foi transferido para membrana de nitrocelulose como supracitado. Membranas contendo as proteínas dos extratos de células e do sobrenadante foram bloqueadas e imunomarcadas com antisoros murinos produzidos neste trabalho para uma concentração de 1:500 e específicos construídos com base na toxina Ba1 em mesma concentração.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação, clonagem e construção de vírus recombinantes occ-

Neste trabalho foram propostas inicialmente três diferentes estratégias para amplificação e clonagem do gene da toxina BaTx encontrada em biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *B. albiceps*. A primeira estratégia utilizando os primers F1 e R1 gerou um fragmento de 447 pb que continha o peptídeo sinal natural da toxina (SP), o pró-peptídeo (Pp) e a toxina madura (BaTx); este fragmento recebeu o nome de SP-Pp-BaTx (Figura 12, Poço 2, esquema I). A segunda estratégia utilizando os primers F2 e R1 gerou um fragmento de 381 pb que continha o pró-peptídeo e a toxina madura e foi denominado de Pp-BaTx (Figura 12, Poço 3, esquema II). Por último, a terceira estratégia utilizando os primers F3 e R1 gerou fragmento de 300 pb que continha apenas a toxina madura e foi chamado de BaTx (Figura 12, poço 4, esquema III).

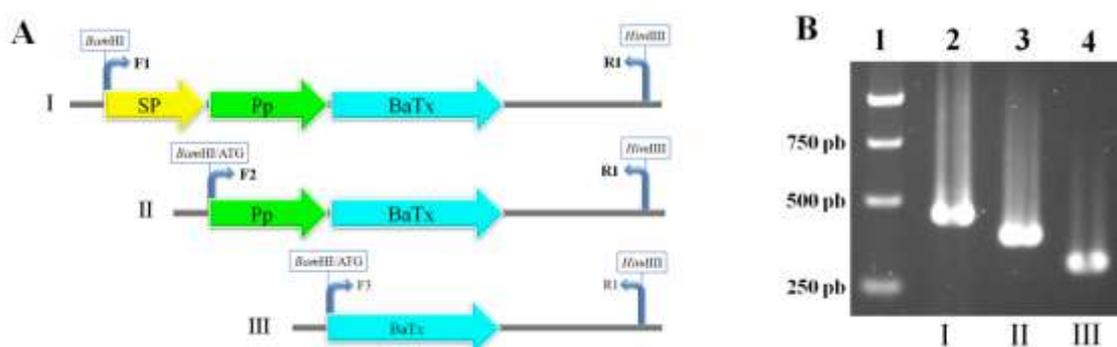


Figura 12. Amplificação das diferentes versões da toxina BaTx. (A) Esquema de diferentes versões da toxina mostrando regiões do peptídeo sinal (SP), pró-peptídeo (Pp) e toxina madura (BaTx). Nos esquemas estão sendo mostrados os locais de anelamento dos primers F1, F2, F3 e R1, sítios de restrição e códon de iniciação adicionados pelos primers. (B) Gel de agarose a 2%: Poço 1 – 1kb DNA ladder (Fermentas); Poço 2 – fragmento de PCR SP-Pp-BaTx de 447 pb (I); Poço 3 – fragmento de PCR Pp-BaTx de 381 pb (II); 4 – fragmento de PCR BaTx de 300 pb (III).

Os três fragmentos obtidos foram separadamente purificados e clonados no vetor pGem®-T easy (3.015 pb), gerando os recombinantes pGem-SP-Pp-BaTx (3.462 pb), pGem-Pp-BaTx (3.396 pb) e pGem-BaTx (3.315 pb). Estes plasmídeos recombinantes foram confirmados por digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 13 A) e por sequenciamento utilizando-se primers universais SP6 e T7. Ambos os resultados confirmaram correta construção dos plasmídeos recombinantes.

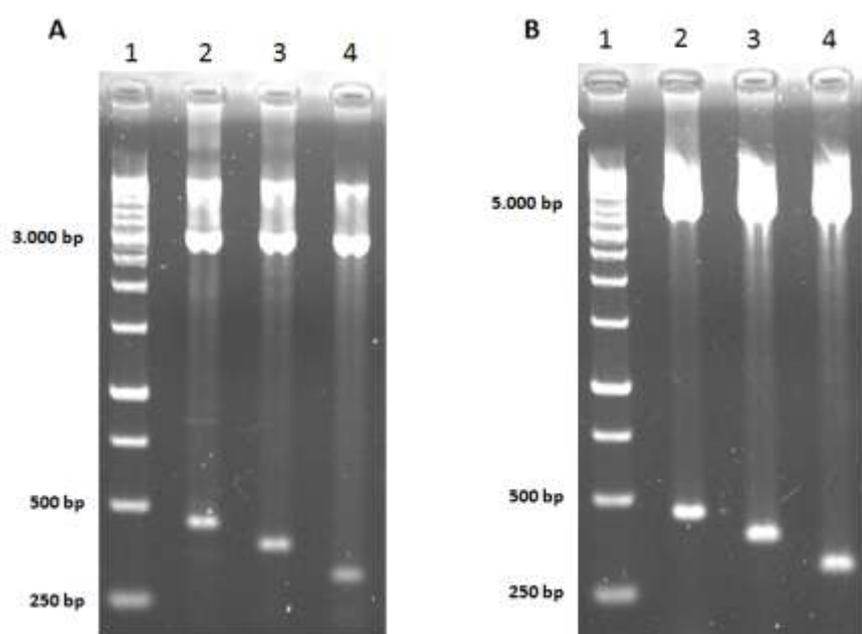


Figura 13. Confirmação de clonagem dos fragmentos SP-Pp-BaTx, Pp-BaTx e BaTx nos vetores pGem®-T easy e pFastBac1®. (A) Digestão de plasmídeos com *Bam*HI e *Hind*III – gel de agarose a 1,5%: Poço 1 – 1kb DNA ladder (Fermentas); Poço 2 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-SP-Pp-BaTx; Poço 3 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-Pp-BaTx; 4 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-BaTx (A). Digestão de plasmídeos com *Bam*HI e *Hind*III – gel de agarose a 1,5%: Poço 1 – 1kb DNA ladder (Fermentas); Poço 2 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1-SP-Pp-BaTx; Poço 3 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1-Pp-BaTx; 4 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1-BaTx (B).

Depois da digestão com *Bam*HI e *Hind*III, os fragmentos foram clonados no vetor pFastBac1® previamente digerido com mesmas enzimas, gerando assim os

recombinantes pFastBac1-SP-Pp-BaTx (5.109 pb), pFastBac1-Pp-BaTx (5.043 pb) e pFastBac1-BaTx (4.962 pb). Estes recombinantes foram também confirmados por digestão usando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 13 B).

Os plasmídeos originados por subclonagem molecular foram utilizados separadamente para transformar *E. coli* da linhagem DH10Bac (Invitrogen) e geraram três bacmídeos recombinantes, bAc-SP-Pp-BaTx/occ-, bAc-Pp-BaTx/occ- e bAc-BaTx/occ-. Estes recombinantes foram confirmados por PCR usando-se primers M13F e R1 (fragmentos de aproximadamente 2.000 pb – Figura 14 B, poços 2, 4 e 6).

Regiões de anelamento dos primers podem ser vistas na Figura 14 A (1, 2, 3 e 4). Para confirmar a presença de DNA viral, foi feita reação contendo os primers p35F e p35R (fragmento gerado de aproximadamente 900 pb – Figura 14 B, poços 3, 5 e 7). As bandas observadas corresponderam aos tamanhos esperados, certificando a correta transposição dos cassetes advindos dos plasmídeos doadores recombinantes e a presença de DNA viral.

Depois de confirmados, os bacmídeos recombinantes foram usados em ensaio de transfecção via lipossomo em células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1-4, a fim de gerar baculovírus recombinantes. As células foram observadas por microscopia óptica e características infectivas foram observadas. Em primeiro momento observou-se que as células pararam de se dividir; houve, além disso, hipertrofia nuclear e perda da integridade de forma da célula corroborando eficiente transfecção com DNA viral. Após transfecção, três baculovírus recombinantes foram gerados: vAc-SP-Pp-BaTx/occ-, vAc-Pp-BaTx/occ- e vAc-BaTx/occ-. Estes foram confirmados respectivamente com reação de PCR contendo pares de primers F1/R1, F2/R1 e F3/R1 que geraram fragmentos de 447 pb, 381 pb e 300 pb (Figura 14 C), semelhante aos fragmentos gerados na PCR inicial (Figura 12).

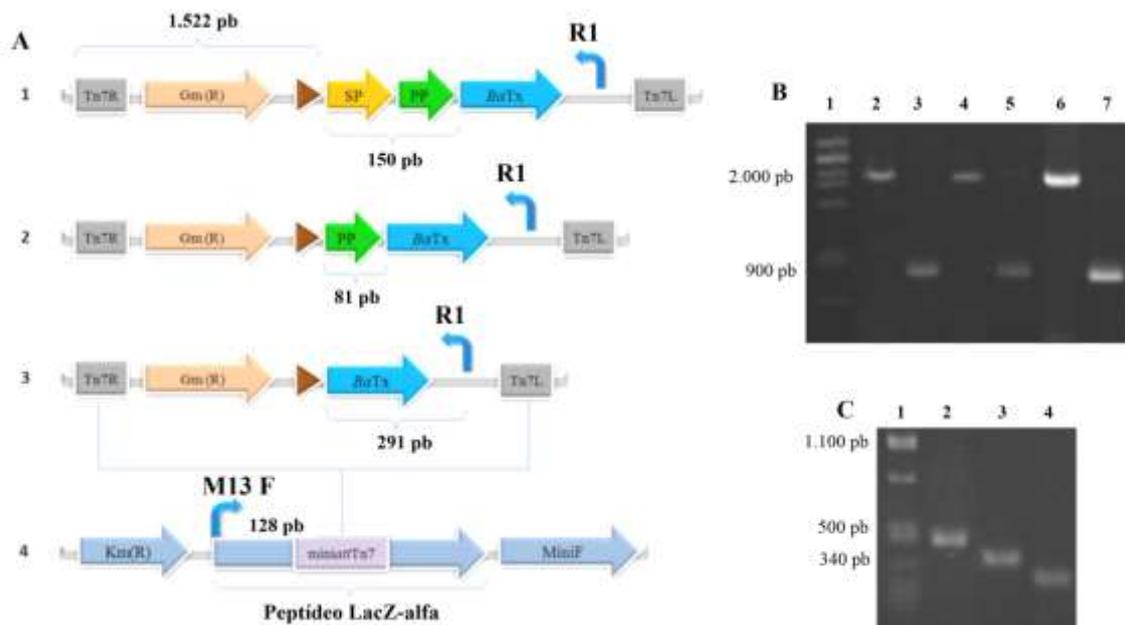


Figura 14. Confirmação de transposição para três diferentes versões da toxina clonadas no vetor pFastBac1®. (A) Esquemas de regiões flanqueadas por braços homólogos Tn7 dos vetores doadores recombinantes pFastBac1-SP-Pp-BaTx (1), pFastBac1-Pp-BaTx (2) e pFastBac1-BaTx (3). Estas regiões foram transpostas para dentro do sítio *miniattTn7* internas ao peptídeo LacZ- α por ação da proteína transposase (4). (B) Gel de agarose a 0,8%: Poço 1 – DNA λ digerido com *PstI*; Poço 2 – Fragmento de PCR de bAc-SP-Pp-BaTx/occ- com M13F e R1; Poço 3 – Fragmento de PCR de bAc-SP-Pp-BaTx/occ- com p35F e p35R; Poço 4 – Fragmento de PCR de bAc-Pp-BaTx/occ- com M13F e R1; Poço 5 – Fragmento de PCR de bAc-Pp-BaTx/occ- com p35F e p35R; Poço 6 – Fragmento de PCR de bAc-BaTx/occ- com M13F e R1; Poço 7 – Fragmento de PCR de bAc-BaTx/occ- com p35F e p35R. (C) Gel de agarose a 1,5%: Poço 1 – DNA λ digerido com *PstI*; Poço 2 – Fragmento de usando o DNA do vírus vAc-SP-Pp-BaTx/occ- com os primers F1 e R1; Poço 3 – Fragmento de usando o DNA do vírus vAc-Pp-BaTx/occ- com os primers F2 e R1; Poço 3 – Fragmento de usando o DNA do vírus vAc-BaTx/occ- com os primers F3 e R1.

5.2 Construção de recombinante occ- contendo toxina fusionada a peptídeo sinal de secreção

Para fusionar os peptídeos sinais de secreção dos genes *egt* do baculovírus AgMNPV e do neuropeptídeo *bombyxina* da mariposa *B. mori* à toxina BaTx, reações

de amplificação em cadeia contendo os pares de primers F4/R2 e F5/R2 (mostrados na figura 7, Materiais e Métodos) foram realizadas. As reações geraram bandas de 205 pb que foram denominadas de fragmentos SP(egt)-BaTx e SP(bx)-BaTx (Figura 15 A, poço 2 e 15 B, poço 2). Estes fragmentos foram purificados e clonados no vetor pGem®-T easy, gerando os plasmídeos pGem-SP(egt)-BaTx e pGem-SP(bx)-BaTx (ambos de 3.375 pb). Os plasmídeo foram confirmados por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III gerando bandas de 3.037 pb e de 183 pb (Figura 15 A, poço 3 e 15 B, poço 3). Os resultados obtidos com o sequenciamento mostraram que os fragmentos gerados correspondiam a ORF putativa da toxina BaTx fusionada aos peptídeos sinais de secreção supracitados.

Os fragmentos de 183 pb gerados por digestão com *Bam*HI e *Hind*III foram separadamente ligados ao plasmídeo pFastBac1® previamente digerido com mesmas enzimas a fim de gerar os recombinantes pFastBac1-SP(egt)-BaTx e pFastBac1-SP(bx)-BaTx (ambos com 4.854 pb). Estes recombinantes foram confirmados por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 15 A e B, poços 4).

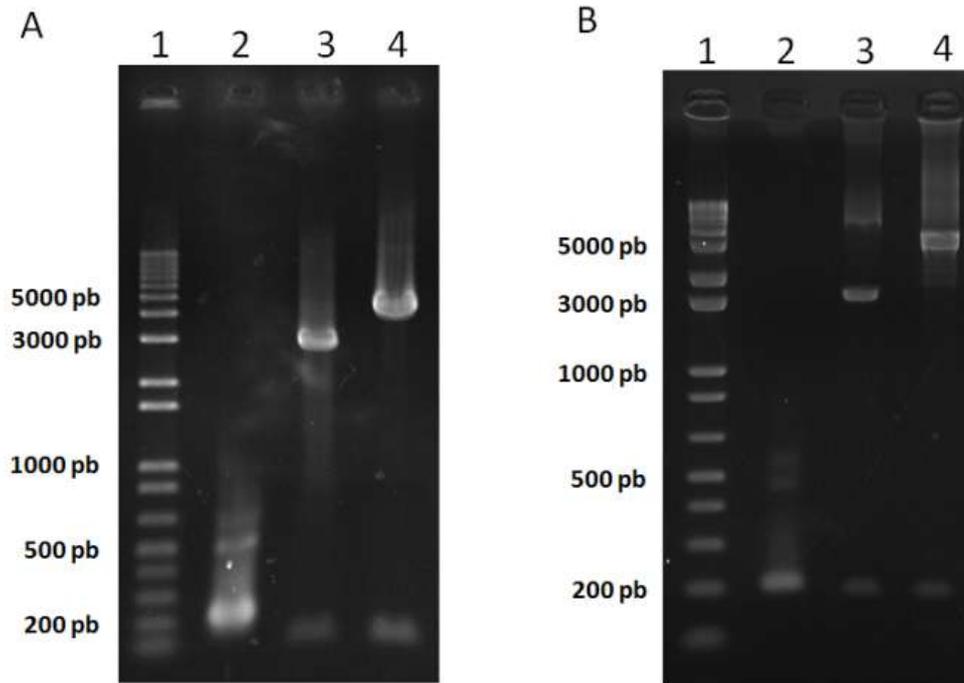


Figura 15. Confirmação de clonagens dos fragmentos SP(egt)-BaTx e SP(bx)-BaTx nos vetores pGem®-T easy e pFastBac1®. (A) Gel de agarose a 1,0%: poço 1 – Marcador de massa molecular 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen); poço 2 – fragmento SP(egt)-BaTx obtido por PCR; poço 3 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-SP(egt)-BaTx digerido com *Bam*HI e *Hind*III; poço 4 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1-SP(egt)-BaTx digerido com *Bam*HI e *Hind*III. (B) Gel de agarose a 1,5%: poço 1 – Marcador de massa molecular 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen); poço 2 – fragmento SP(bx)-BaTx obtido por PCR; poço 3 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-SP(bx)-BaTx digerido com *Bam*HI e *Hind*III; poço 4 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1-SP(bx)-BaTx digerido com *Bam*HI e *Hind*III.

Os plasmídeos pFastBac1-SP(egt)-BaTx e pFastBac1-SP(bx)-BaTx gerados foram utilizados para transformar bactérias da linhagem DH10Bac. Após transposição, foram gerados os bacmídeos bAc-SP(egt)-BaTx/occ- e bAc-SP(egt)-BaTx/occ- que foram confirmado usando-se primers F3 e KL F (Tabela 1). As amplificações geraram bandas por volta de 752 pb (Figura 16 A e B), confirmando corretas transposições. Os bacmídeos recombinantes bAc-SP(egt)-BaTx/occ- e bAc-SP(bx)-BaTx/occ- foram separadamente utilizados em ensaio de transfecção com lipossomos e células da

linhagem BTI-Tn5B1-4. Por fim, foram gerados dois baculovírus recombinante, vAc-SP(egt)-BaTx/occ- e vAc-SP(bx)-BaTx/occ- (Figura 16, poços 2 e 3).

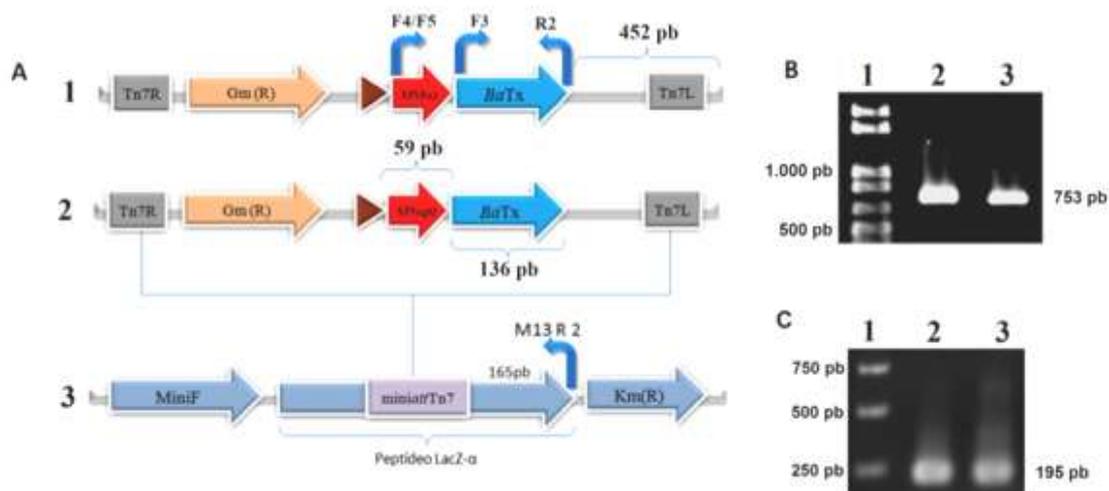


Figura 16. Confirmação de transposições do gene da toxina fusionada a diferentes seqüências de peptídeo sinal (SP(bx)-BaTx e SP(egt)-BaTx) para o genoma do baculovírus AcMNPV. (A) Esquemas de regiões flanqueadas por braços homólogos Tn7 dos vetores doadores recombinantes pFasBac1-SP(bx)-BaTx (1) e pFasBac1-SP(egt)-BaTx (2). Esta região foi transposta para dentro do sítio *miniattTn7* internas ao peptídeo LacZ α (3). O diagrama mostra os locais de anelamento dos primers F3 e M13R 2. SP(egt): peptídeo sinal do gene *egt* de AgMNPV; SP(bx): peptídeo sinal do gene *bombyxina* de *B. mori*. (B) Gel de agarose a 0,8%: poço 1 – 1kb DNA plus ladder (Fermentas); poço 2 – Fragmento gerado por PCR com primers F3 e M13R 2 usando bAc-SP(egt)-BaTx/occ- como DNA-molde; poço 3 – Fragmento gerado por PCR com primers F3 e M13R 2 usando bAc-SP(bx)-BaTx/occ- como DNA-molde. (C) Confirmação de vírus recombinantes. Gel de agarose a 1,0%: poço 1 – 1kb DNA ladder (Promega); poço 2 – PCR com primers F4/R2 usando DNA do vírus vAc-SP(egt)-BaTx/occ-; poço 3 – PCR com primers F5/R2 usando DNA do vírus vAc-SP(bx)-BaTx/occ-.

5.3 Obtenção de vetor pFastBac1 modificado a fim de gerar vírus recombinantes occ+

Para construção do vetor pFastBac1 modificado foi feita uma reação de amplificação em cadeia com os primers pSyn(MSC) F e pSyn(Ac-PH) R e com o vetor de recombinação homóloga pSyn XIV VI+ X3 como DNA-molde. Um fragmento de

1.102 pb foi gerado contendo os promotores virais *in tandem* pSyn e pXIV e o cassete do gene da poliedrina intacto (Figura 17 B, poço 2). Este fragmento denominado PSX (a letra P refere-se à poliedrina, o S ao promotor Syn e X ao promotor XIV) foi clonado no vetor pGemT® easy, gerando o plasmídeo pGem-PSX (Figura 17 A e B, poço 4). O resultado do sequenciamento revelou que o inserto foi corretamente amplificado.

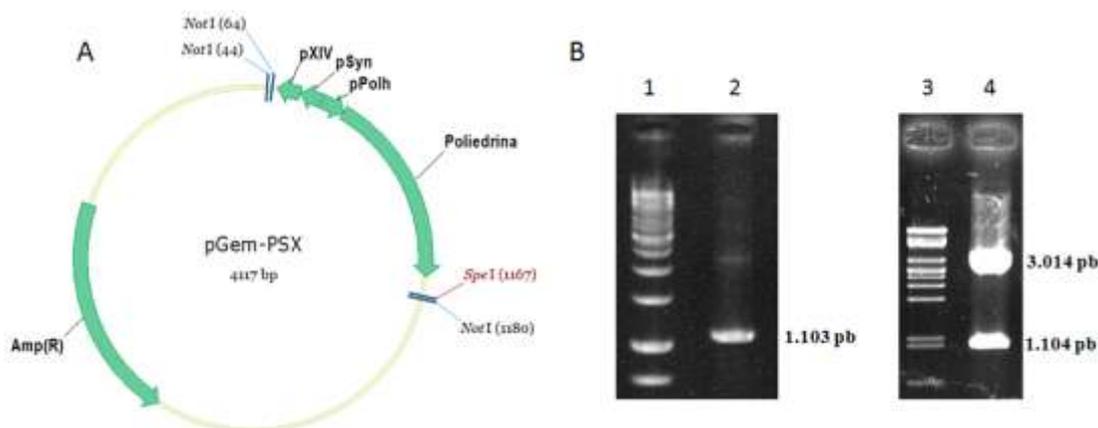


Figura 17. Obtenção do fragmento PSX, para construção de vetor pFastBac1® modificado. (A) Mapa do vetor pGem-PSX mostrando os sítios *NotI* e *SpeI* utilizados em passos posteriores de clonagem; o cassete de 1.102 pb (PSX, amplificado do vetor de recombinação homóloga pSyn XIV VI+ X3) é mostrado entre os sítios de restrição. O fragmento contém o promotor (pPolh) e o gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV; além disso, existem dois promotores *in tandem*, pSyn e pXIV; construído com o programa Vector NTI v. 11 (Invitrogen). (B) Géis de agarose a 0,8%: poço 1 – 1 kb DNA ladder (Fermentas); 2 – fragmento PSX gerado por PCR; poço 3 – DNA λ digerido com *PstI*; poço 4 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGem-PSX com as enzimas *SpeI* e *NotI*.

Foi necessário excluir por restrição enzimática o promotor da poliedrina presente no vetor comercial pFastBac1® antes de promover a ligação do fragmento PSX. O vetor foi, então, digerido com a enzima *AccI*. Como pode ser observado na figura 18 A, o promotor da poliedrina é flanqueado por sítios de *AccI* e depois da digestão houve a produção de duas bandas, uma de 188 pb que corresponde ao promotor e outra de 4.588

que corresponde ao vetor linear livre de promotor (Figura 18 C). Esta segunda banda citada foi utilizada para gerar o plasmídeo pFastBac1/AccI que não contém o promotor viral (Figura 18 B). Para confirmação de clonagem, o vetor gerado foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *BglII*. Na figura 18 A, é possível observar que o sítio único para *EcoRI* está presente no entre-flancos da enzima *AccI*; logo, quando digerido com ambas as enzimas, apenas duas bandas deveriam ser geradas, bandas de 4.118 pb e de 470 pb. No caso do plasmídeo pFastBac1® comercial digerido com mesmas enzimas, haveria três e não apenas duas bandas: 3.269 pb, 1.037 pb e 470 pb. Ambos os resultados podem ser vistos na figura 18 D, conforme o previsto.

O plasmídeo pGem-PSX foi, então, digerido com *SpeI* e *NotI* a fim de liberar um fragmento de aproximadamente 1.100 pb (Figura 17 B, poço 4) que corresponde ao fragmento PSX. Este fragmento foi purificado e clonado no vetor pFastBac1/AccI previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando o vetor pFastBac1/AccI-PSX (Figura 19 A). A clonagem foi confirmada por digestão com as enzimas *SalI* e *EcoRI*, gerando dois fragmentos, 4.599 e 1.087 pb (Figura 19 B, poço 2).

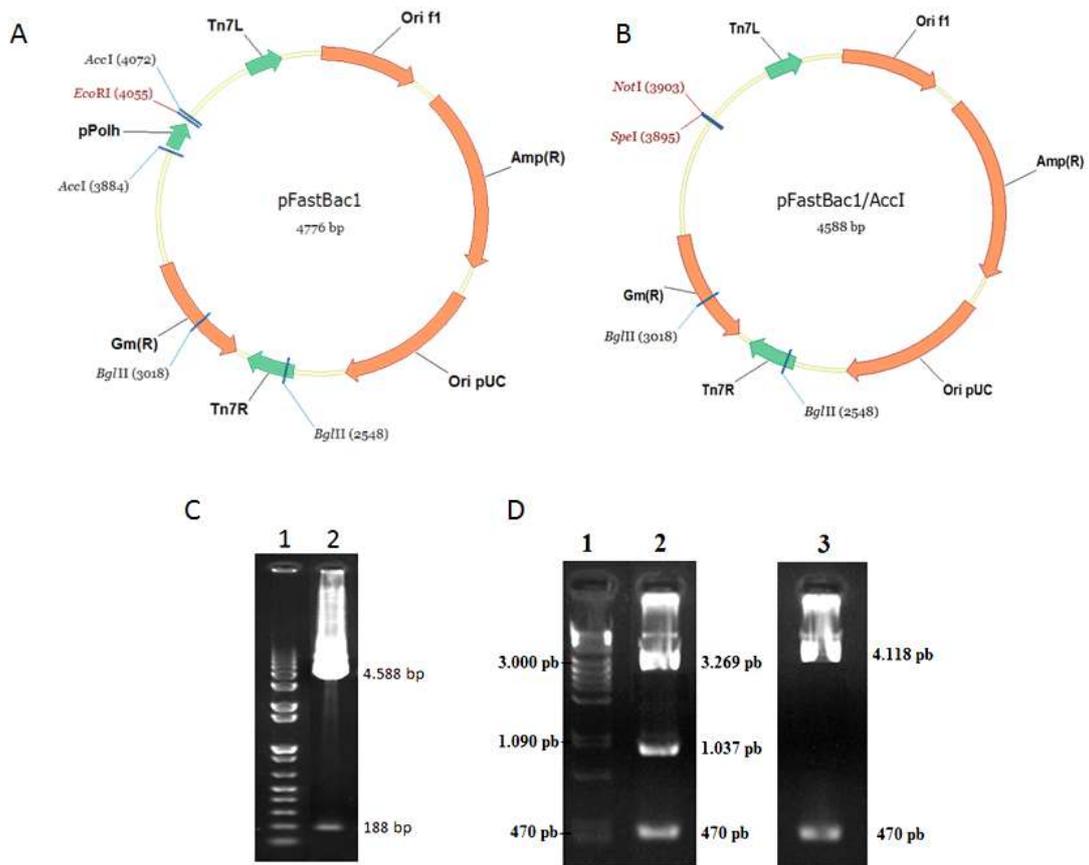


Figura 18. Confirmação de construção do plasmídeo pFastBac1/AccI a partir do vetor pFastBac1. (A) Mapa do plasmídeo pFastBac1® salientando os sítios para a enzima *AccI* que flanqueiam o promotor viral da poliedrina, pPolh. Entre os flancos também está presente o sítio único para a enzima *EcoRI* também mostrado. (B) Mapa do plasmídeo pFastBac1/AccI gerado após digestão com enzima *AccI*. O fragmento obtido foi religado e transformado. Ambos os mapas foram construídos no programa Vector NTI v. 11 (Invitrogen) e mostram sítios de restrição para *BglIII*. (C) Gel de agarose a 1,5%, 1: Marcador 1 kb DNA plus ladder (Fermentas); 2: fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1 com a enzima *AccI*. (D) Gel de agarose a 0,8%: 1 – DNA λ digerido com *PstI*; 2 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1 com as enzimas *EcoRI* e *BglIII*; 3 – fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1/AccI com as enzimas *EcoRI* e *BglIII*. A fotografia do gel foi separada apenas para fins estéticos; ambas as imagens fazem parte de um mesmo gel.

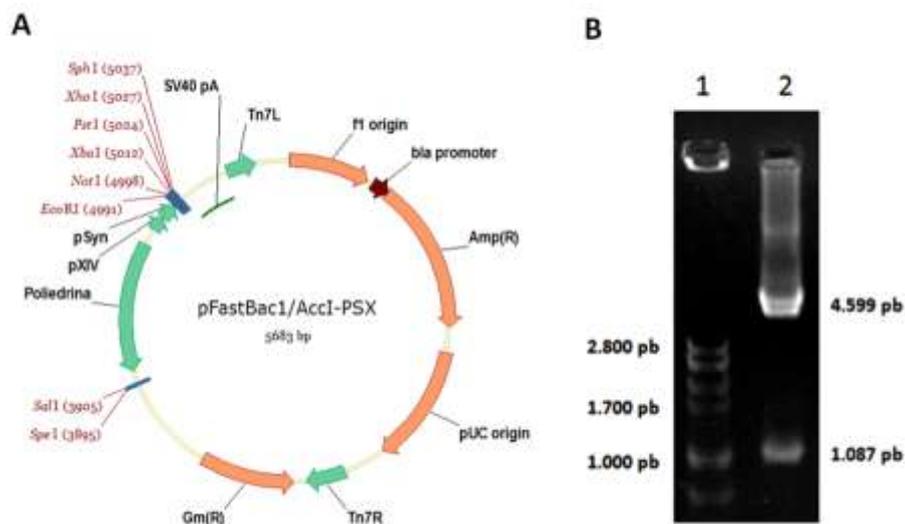


Figura 19. Mapa e confirmação do vetor pFastBac1® modificado que permite a construção de vírus AcMNPV recombinante occ+ por transposição. (A) Mapa do plasmídeo gerado mostrando sítios únicos em vermelho para clonagens (*EcoRI*, *NotI*, *XbaI*, *PstI*, *XhoI* e *SphI*) e o sítio para confirmação de clonagem (*SalI*). (B) Gel de agarose 0,8%: poço 1 – fragmentos parciais de DNA λ digerido com *PstI*; poço 2 - pFastBac1/AccI-PSX digerido com *SalI* e *EcoRI* liberando bandas de 4.599 pb e 1.087 pb.

Depois da transformação dos plasmídeos pFastBac1/AccI e pFastBac1/AccI-PSX em DH10Bac, os bacmídeos recombinantes bAc/occ- e bAc/occ+ foram isolados e utilizados para transfecção com células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1-4 a fim de gerar os baculovírus vAc/occ- e vAc/occ+. As células foram observadas e fotografadas a 48 h pós-infecção (h p. i.), para análise da presença ou ausência de poliedros. Como controle positivo, células da mesma linhagem foram infectadas com o vírus AcMNPV selvagem e fotografadas também a 48 h p. i. (Figura 20 C).

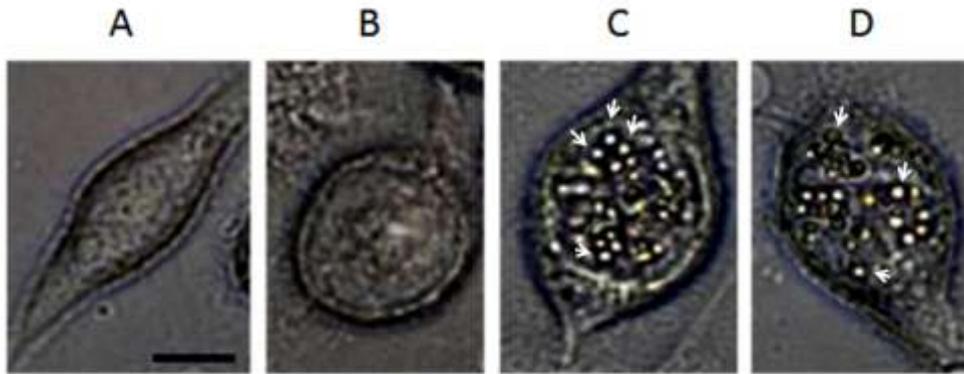


Figura 20. Células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1-4 ‘mock’-infectadas (A) ou infectadas a 48 h p. i. (B, C e D) com diferentes recombinantes ou vírus selvagem. Células infectadas com o vírus vAc/occ- (B); com AcMNPV (C) e vAc/occ+ (D). OBs ou poliedros são mostrados no núcleo das células C e D (alguns são apontados por setas brancas). Barra representa 10 µm.

As fotografias obtidas revelaram características de infecção celular como perda da morfologia e hipertrofia nuclear, ao comparar-se a célula fotografada em Figura 20 A com as células fotografadas em B, C e D. Além disso, células infectadas com vAc/occ+ apresentaram poliedros no núcleo (Figura 20 D), assim como quando infectadas com o vírus selvagem AcMNPV (Figura 20 C). Da mesma forma, lagartas da espécie *S. frugiperda* infectadas via intra-hemocele com vírus na forma de BV, geraram poliedros oralmente infectivos (dados não mostrados). Os poliedros estavam ausentes quando as células foram infectadas com vAc/occ-, porém características típicas de infecção foram observadas (Figura 20 B).

5.4 Clonagem da toxina de aranha no vetor pFastBac1/AccI-PSX para obtenção de vírus recombinantes occ+

O plasmídeo pGem-BaTx foi digerido com a enzima *NotI* e o fragmento liberado foi purificado e clonado no vetor pFastBac1/AccI-PSX previamente digerido com *NotI* e defosforilado com SAP, gerando o recombinante pFastBac1/AccI-PSX-BaTx. Para

confirmar entrada do fragmento e direção de clonagem, o vetor recombinante foi digerido com *Bam*HI (Figura 21 A, poço 2 – Fragmento de aproximadamente 500 pb).

Os plasmídeos pGem-SP(egt)-BaTx e pGem-SP(bx)-BaTx foram digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. Os fragmentos gerados foram purificados e clonados no vetor pFastBac1/*Acc*I-PSX digerido previamente com ambas as enzimas, gerando os plasmídeos recombinantes pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(egt)-BaTx e pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(bx)-BaTx. Os plasmídeos foram confirmados por digestão com *Bam*HI (Figura 21 B e C, ambos no poço 2) liberando ambos um fragmentos de aproximadamente 500 pb.

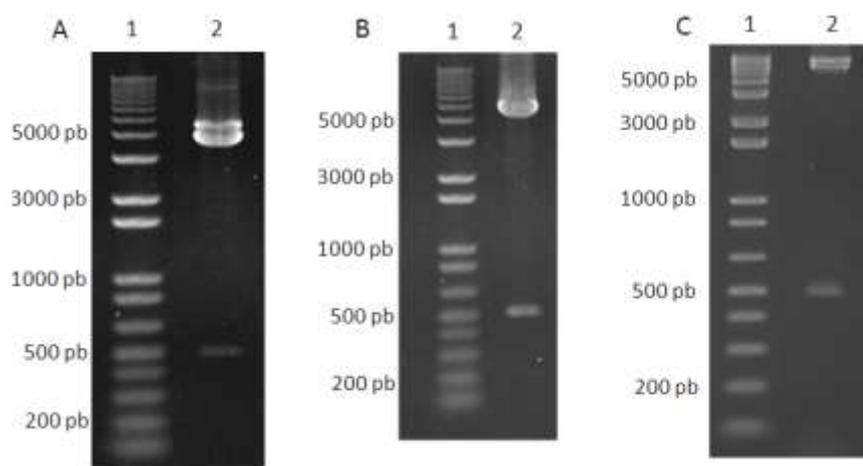


Figura 21. Confirmação de clonagem de versões da toxina no vetor pFastBac1/*Acc*I-PSX. (A) Gel de agarose a 1,5%: poço 1 – Marcador 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen); poço 2 – fragmentos de DNA gerados a partir da digestão do plasmídeo pFastBac1/*Acc*I-PSX-BaTx com a enzima *Bam*HI. (B) Gel de agarose a 1,5%: poço 1 – Marcador 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen); poço 2 – fragmentos de DNA gerados a partir da digestão do plasmídeo pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(egt)-BaTx com a enzima *Bam*HI. (C) Gel de agarose a 2,0%: poço 1 – Marcador 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen); poço 2 – fragmentos de DNA gerados a partir da digestão do plasmídeo pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(bx)-BaTx com a enzima *Bam*HI.

Os plasmídeos pFastBac1/*Acc*I-PSX-BaTx, pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(egt)-BaTx e pFastBac1/*Acc*I-PSX-SP(bx)-BaTx foram confirmados também por sequenciamento corroborando correta construção. Posteriormente foram usados como substratos para

transposição em bactérias DH10Bac (Figura 22 A, 1, 2, 3 e 4) a fim de gerar os bacmídeos recombinantes bAc-BaTx/occ+, bAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e bAc-SP(bx)-BaTx/occ+. Estes recombinantes foram confirmados por PCR usando os primers F3 e M13 R, gerando bandas de 984 pb para bAc-BaTx/occ+ e 806 pb para bAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e bAc-SP(bx)-BaTx/occ+ (Figura 22 B, poço 2, 3 e 4).

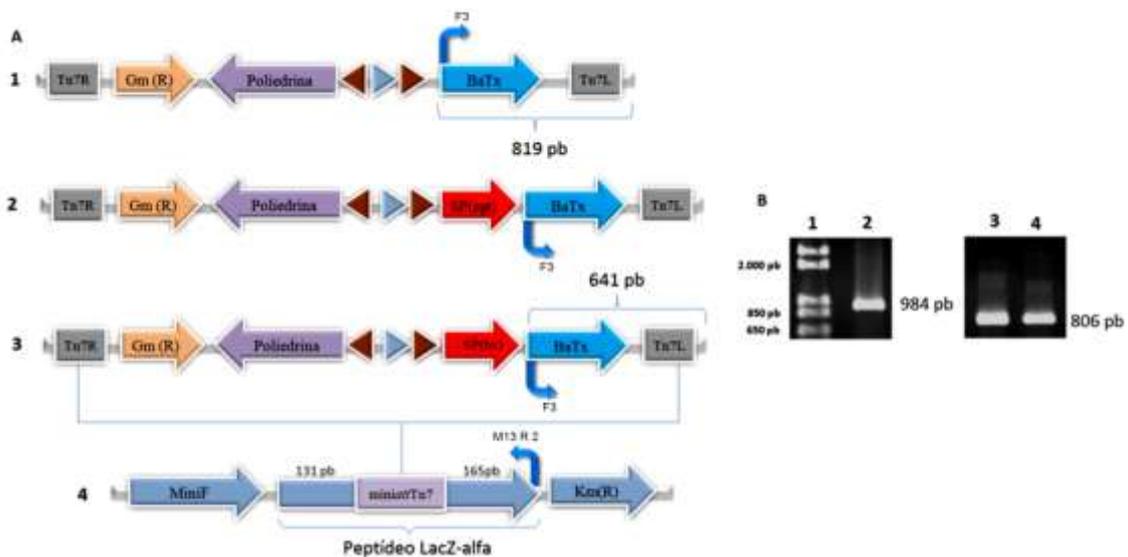


Figura 22. Esquema de transposição e confirmação de recombinantes bAc-BaTx/occ+, bAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e bAc-SP(bx)-BaTx/occ+. (A) Regiões flanqueadas por braços homólogos Tn7 dos vetores doadores recombinantes pFastBac1/AccI-PSX-BaTx (1), pFastBac1/AccI-PSX-SP(egt)-BaTx (2) e pFastBac1/AccI-PSX-SP(bx)-BaTx (3). Estas regiões foram transpostas para dentro do sítio *miniattTn7* internas ao peptídeo LacZ α (3) a fim de gerar baculovírus recombinantes oralmente infectivos. O diagrama mostra os locais de anelamento dos primers F3 e M13R 2. (B) Gel de agarose a 0,8%: poço 1 – 1kb DNA plus ladder (Fermentas); poço 2 – Fragmento gerado por PCR com primers F3 e M13R 2 usando bAc-BaTx/occ+ como DNA-molde; poço 3 – Fragmento gerado por PCR com primers F3 e M13R 2 usando bAc-SP(egt)-BaTx/occ+ como DNA-molde; poço 4 – Fragmento gerado por PCR com primers F3 e M13R 2 usando bAc-SP(bx)-BaTx/occ+ como DNA-molde.

5.5 Análise microscópica de infecções

Os recombinantes construídos neste trabalho foram utilizados para infectar células derivadas das espécies de mariposa *S. frugiperda* e *T. ni* a fim de analisar evolução das infecções bem como características citopatológicas. Monocamadas de células foram infectadas (m. o. i. 10) e fotografadas com 24, 48, 72 e 96 h p. i. Características tais como hipertrofia nuclear e mudanças morfológicas geradas pela presença das diferentes versões da toxina foram observadas.

5.5.1 Infecção em células de *S. frugiperda*

Os vírus recombinantes occ- expressando as diferentes versões da toxina apresentaram em até 24 h p. i características citomorfológicas semelhantes às do controle vAc/occ- como delimitação e hipertrofia do núcleo por causa do estabelecimento da infecção viral (Figuras 23 a 28). Em microscopia óptica é possível observar que os vírus vAc-BaTx/occ- e vAc-BaTx/occ+ causaram uma ampla modificação citomorfológica característica de necrose celular (Figuras 25, 30 e 33). As células apresentaram perda de integridade da membrana citoplasmática conforme ocorreu evolução da infecção (Figura 25 E). Essa característica foi notável em todas as versões da toxina, porém em tempos diferentes de infecção, como pode ser observado ao comparar-se a infecção provocada pelos vírus carregando a toxina madura (vAc-BaTx/occ- e occ+) e o vírus carregando a toxina com o seu pró-peptídeo natural (vAc-Pp-BaTx/occ-) (Figura 25 B e 24 B, respectivamente) a 48 h p. i.

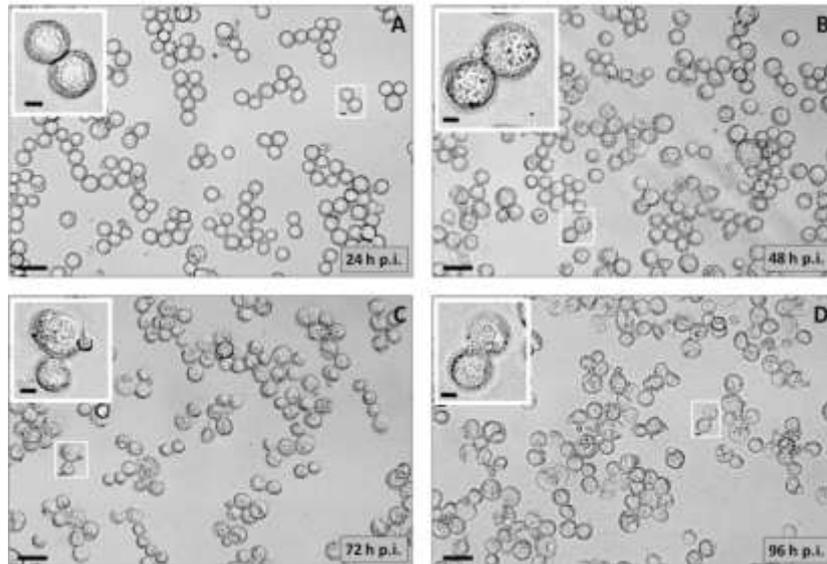


Figura 23. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus controle vAc/occ-. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. As células apresentam evolução de infecção por vírus selvagem (hipertrofia e perda de morfologia celular) sem corpos de oclusão. Barra abaixo das fotografias é de 50 µm.

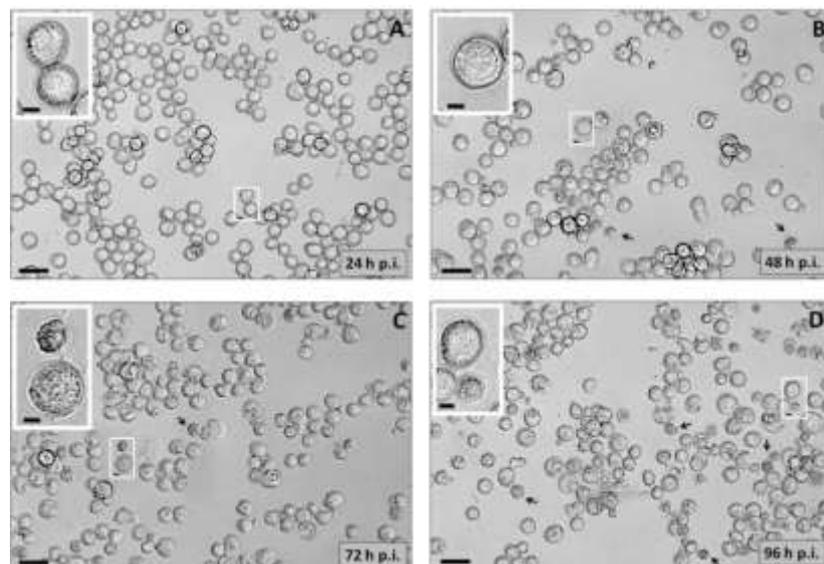


Figura 24. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP-Pp-BaTx/occ-. Este vírus apresenta a o peptídeo sinal, o pró-peptídeo e a toxina madura sob o comando do promotor forte muito tardio da poliedrina. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam células mortas por precocemente. A linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. A barra abaixo nas fotografias representa 50 µm.

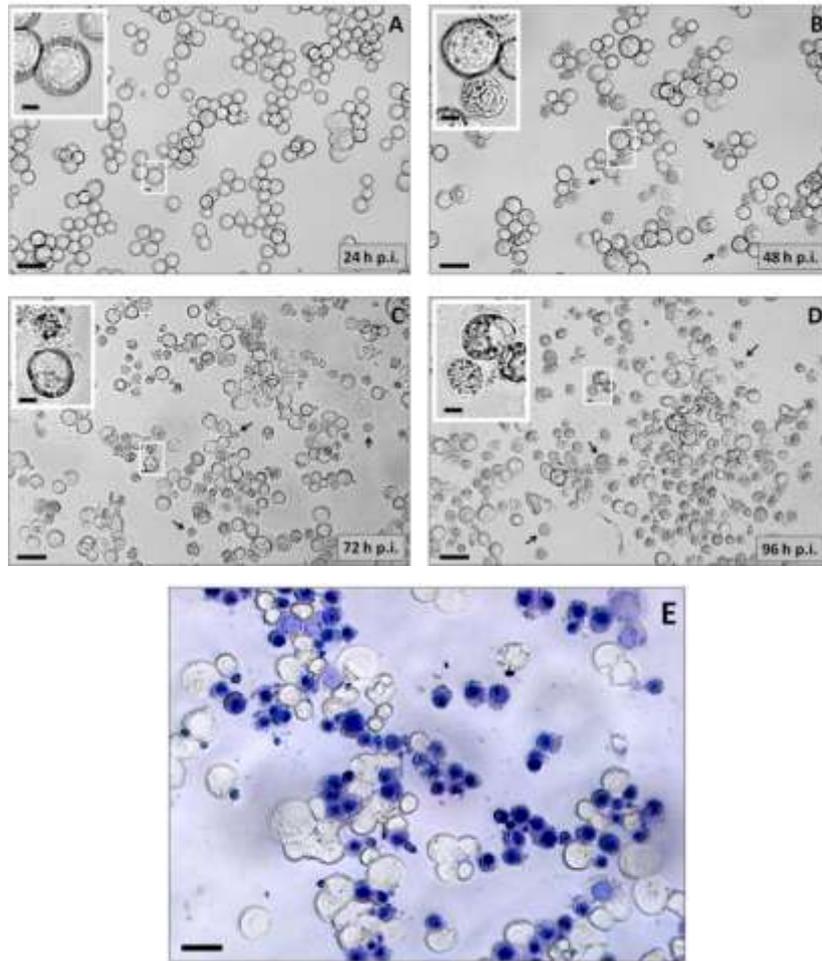


Figura 25. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-Pp-BaTx/occ-. Neste vírus foi suprimido o peptídeo sinal natural da toxina e apresenta apenas o pró-peptídeo fusionado a toxina madura. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam para células mortas precocemente. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. (E) Coloração por azul de Trypan de células infectadas por 72 h p. i. Células não coradas são células com integridade de membrana e azuis, células mortas. Barras pretas abaixo nas fotografias representam 50 µm.

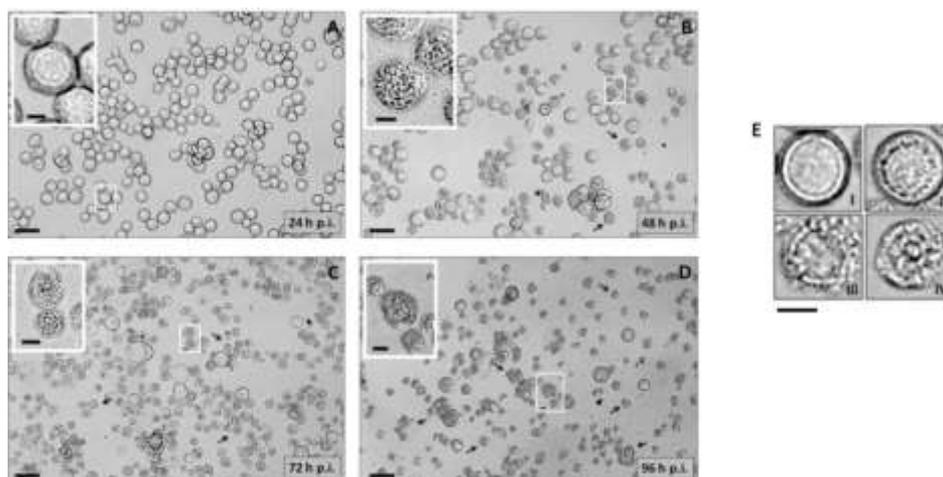


Figura 26. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ-. Este vírus expressa a toxina em tempos muito tardios de infecção na forma madura. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam para células mortas precocemente. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 μm. Barras abaixo nas fotografias representam 50 μm. (E) Evolução da mudança citomorfológica que ocorre durante infecção com a toxina necrótica (barra preta representa 10 μm): hipertrofia nuclear (I), pressionamento do núcleo por conteúdo citoplasmático (II), rompimento da membrana (III) e permanência do envoltório nuclear com aspecto rugoso remanescente (IV).

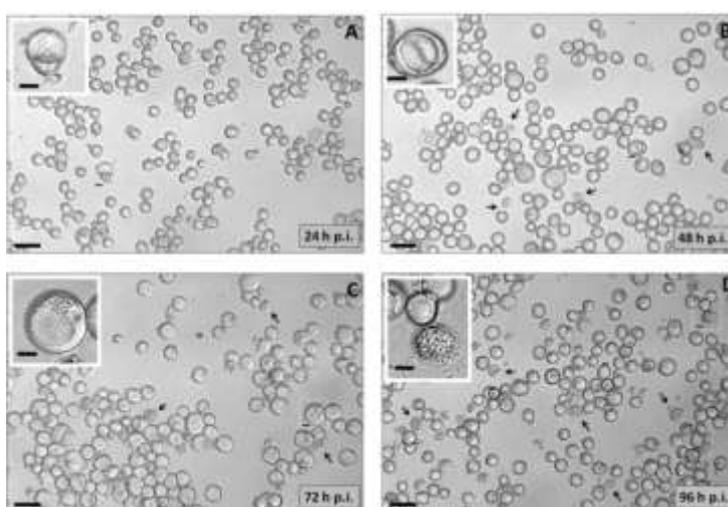


Figura 27. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ-. Estes vírus recombinantes fusionam a porção amino-terminal da proteína o peptídeo sinal do gene de baculovírus *egt* para secreção da toxina e está sob o comando de um promotor muito tardio. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam para células mortas mais precocemente. Linhas retangulares brancas mostram a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 μm. Barra preta abaixo da figura representa 50 μm.

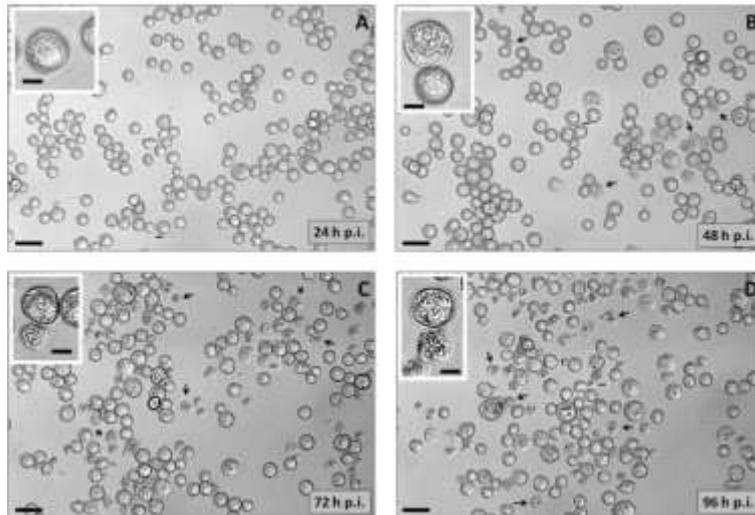


Figura 28. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(bx)-BaTx/occ-. Estes vírus recombinantes fusionam a porção amino-terminal da proteína o peptídeo sinal do gene de inseto *bombyxina* derivado da mariposa da seda *B. mori* para secreção da toxina. Este gene está sob o comando de um promotor forte muito tardio. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linhas retangulares brancas mostram a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. Setas apontam para células em necrose. Barras pretas abaixo das figuras representam 50 µm.

Recombinantes portando os peptídeos sinais de inseto (SP(bx)) e de baculovírus (SP(egt)) retardaram claramente o processo de modificação citomorfológica em células da linhagem IPLB-Sf21-AE (Figuras 26). Entretanto, ao compararem-se estas versões sob o comando de promotor muito tardio e sob o comando de promotor ‘late’ e muito tardio, é possível notar que a expressão mais precoce da toxina fusionada a um peptídeo sinal de secreção garante um adiantamento na mudança morfológica das células infectadas (comparar Figuras 27 com 30). A presença da toxina fusionada ao peptídeo sinal em tempos mais precoces de infecção permitiu que houvesse uma morte celular precoce quando comparada com a presença da toxina fusionada apenas em tempos mais tardios de infecção.

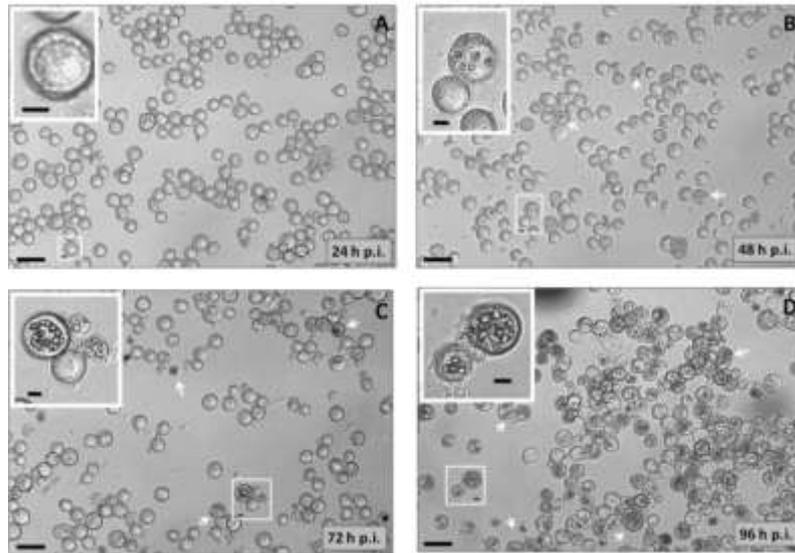


Figura 29. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus controle vAc/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas mostram células com poliedros. É possível notar que o acúmulo de poliedros no núcleo ocorre após 48 h (identificação de poliedros pode ser vista na figura 20). Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 μ m). Barras pretas abaixo das fotografias representam 50 μ m.

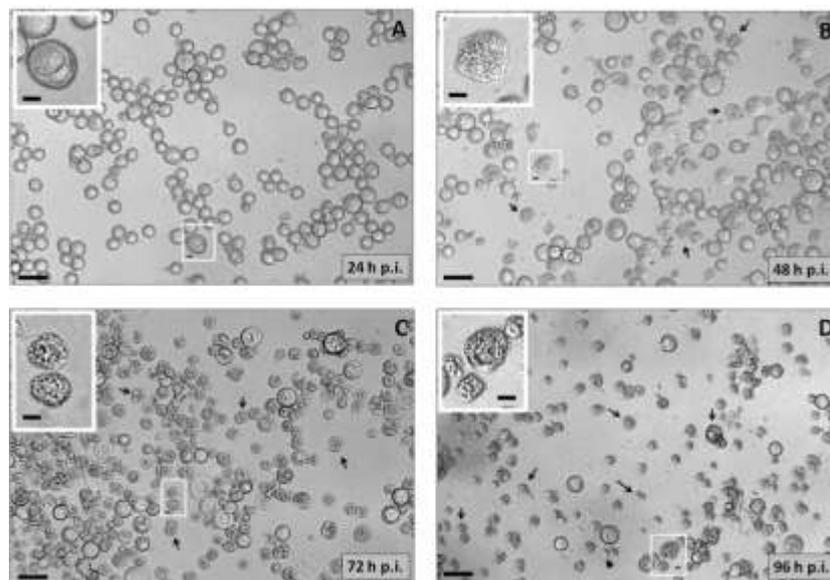


Figura 30. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ+. Este recombinante expressa à versão contendo a toxina madura em tempos ‘late’ e muito tardio de infecção. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Barras pretas abaixo das figuras representam 50 μ m. Setas apontam necrose. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 μ m).

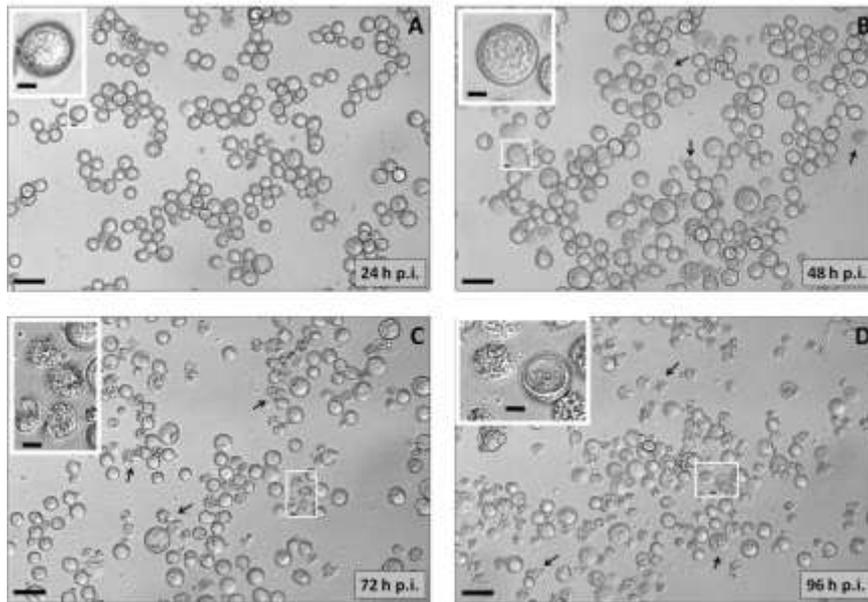


Figura 31. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 µm). Setas apontam células mortas e as barras pretas abaixo das fotografias representam 50 µm.

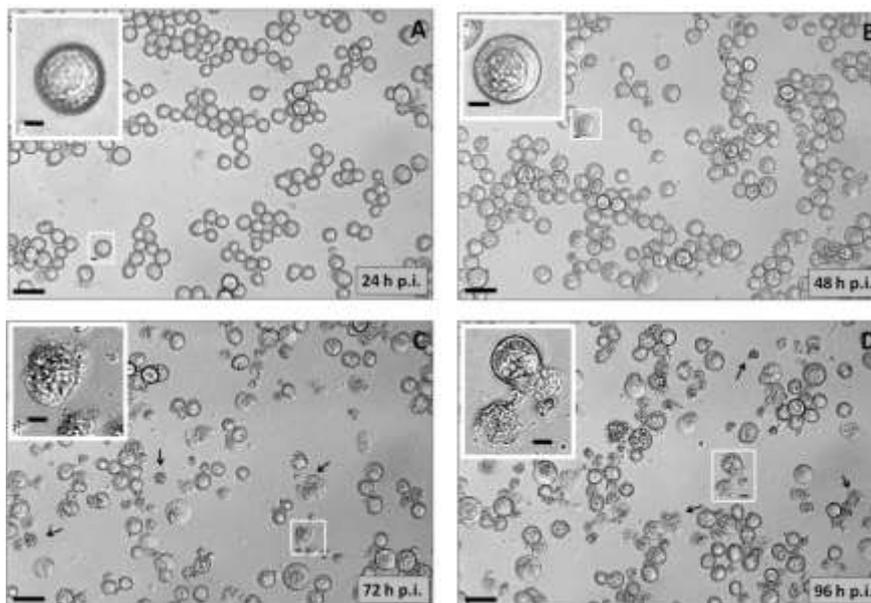


Figura 32. Infecção de células da linhagem IPLB-Sf21-AE com o baculovírus recombinante vAc-SP(bx)-BaTx/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 µm). Setas apontam células necróticas e as barras pretas abaixo das fotografias representam 50 µm.

Em infecções pelos recombinantes vAc-BaTx/occ+, vAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e vAc-SP(bx)-BaTx/occ+ (Figuras 30, 31 e 32), apesar de conterem o gene da poliedrina sob o comando de seu promotor natural, não há acúmulo de poliedros no núcleo. Esta característica difere da infecção pelo vírus controle sem toxina, vAc/occ+ (Figura 29). Esta característica ocorre não apenas *in vitro*, mas também *in vivo*. Quando estes recombinantes foram usados para infecção intra-hemocélica de larvas de *S. frugiperda* para produção de poliedros recombinantes e posteriores bioensaios orais, não houve produção significativa de poliedros (Tabela 3).

Tabela 3. Poliedros e estruturas semelhantes a poliedros produzidas em 10 g de cadáveres de larvas de *S. frugiperda* infectadas com recombinantes occ+ em triplicata.

Recombinantes	Poliedros	D. P.
vAc/occ+	2×10^6	$\pm 2,06 \times 10^5$
vAc-BaTx/occ+	66,6	$\pm 65,06$
vAc/SP(egt)-BaTx/occ+	28,3	$\pm 15,6$
vAc/SP(bx)-BaTx/occ+	16,3	$\pm 8,1$

As células de *S. frugiperda* infectadas foram consideradas mortas mediante clara mudança na morfologia celular (mostrado por setas na maior parte das fotografias). Esta mudança citomorfológica, permitiu que as células se corassem em azul, quando tratadas com corante azul de Trypan, o que indica uma perda da integridade celular e, por consequência, a morte (Figura 25 E). Para corroborar esta hipótese de morte por perda de integridade e do conteúdo citoplasmático, promoveu-se análise ultraestrutural de células infectadas com o recombinante vAc-BaTx/occ- e o controle vAc/occ- por 36 horas. As células foram coletadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

Células infectadas com vírus controle apresentaram hipertrofia nuclear com manutenção de integridade de membranas citoplasmática e nuclear (Figura 33 A). Foi possível observar nucleocapsídeos virais intranucleares com o formato de bastão (Figura 33 B). Células infectadas com o recombinante vAc-BaTx/occ- apresentaram perda de integridade da membrana plasmática. Foi notável células com perda de conteúdo citoplasmático com apenas núcleos remanescentes. Restos de membrana plasmática ao redor do núcleo foram constatados. Esta característica provavelmente é a responsável pelo aspecto rugoso observado em microscopia óptica (exemplo de rugosidade pode ser observado na Figura 26).

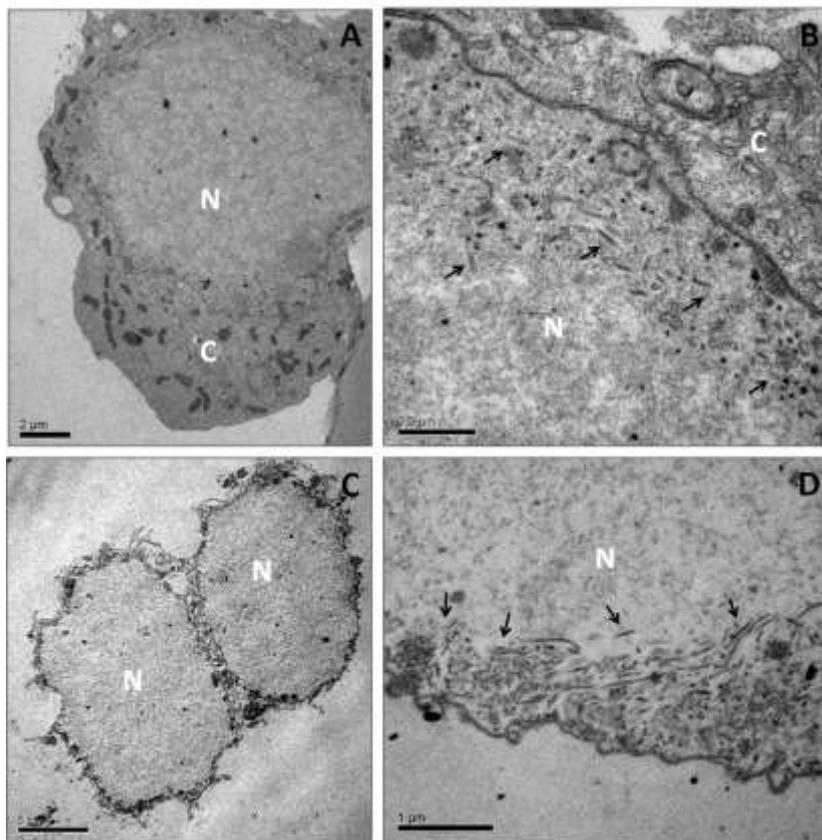


Figura 33. Análise ultraestrutural de células IPLB-SF21-AE infectadas com recombinantes occ- a 36 h p. i. . (A e B) Micrografias de células infectadas com vírus controle vAc/occ- sob dois diferentes aumentos. (C e D) Micrografias de célula infectada com recombinante vAc-BaTx/occ- sob dois aumentos. C = citoplasma; N = núcleo; setas apontam nucleocapsídeos em forma de bastão, típicos de infecção por baculovírus.

5.5.2 Células de *T. ni*

Os vírus recombinantes occ- expressando as diferentes versões da toxina apresentaram em até 24 h p. i. características citomorfológicas aparentemente semelhantes às do controle vAc/occ-, como observado com a linhagem derivada de *S. frugiperda*. Características tais como delineação e hipertrofia do núcleo por causa do estabelecimento da infecção viral e perda progressiva da morfologia celular (Figuras 34 a 39 podem ser comparadas com a Figura 6 A do Material e Métodos) puderam ser vistas. A infecção aparentemente forçou a célula adquirir um formato mais arredondado conforme se dava seu progresso.

Em microscopia óptica foi possível observar que os vírus vAc-BaTx/occ-, vAc-SP(egt/bx)-BaTx/occ-, vAc-BaTx/occ+ e vAc-(SP(egt/bx)-BaTx/occ+ provocaram em tempos tardios de infecção vasta mudança citomorfológica característica de necrose celular (Figuras 41 a 43) como perda da integridade da membrana e do conteúdo citoplasmático. Em células de *T. ni*, características necróticas foram notáveis em todas as versões da toxina com exceção do vírus vAc-SP-Pp-BaTx/occ- (Figura 35). A infecção, nos outros recombinantes, causou necrose celular em tempos diferentes conforme a versão produzida.

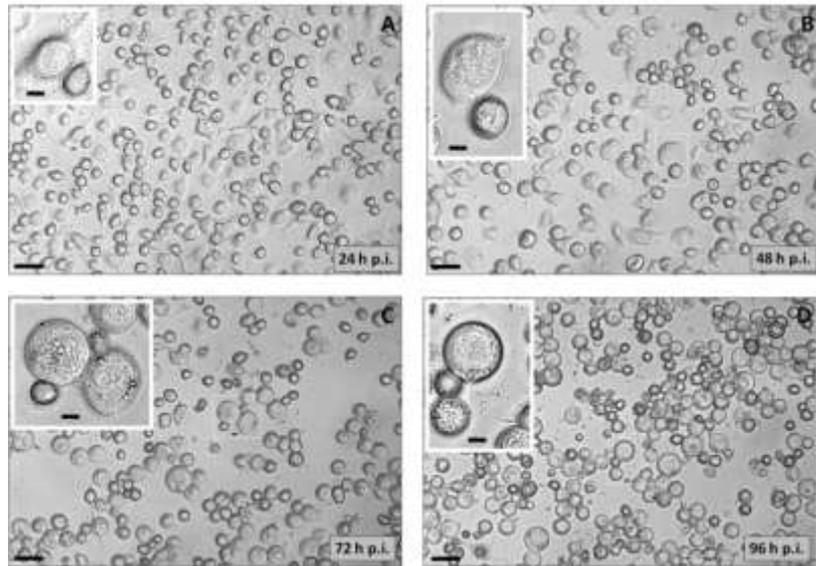


Figura 34. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus controle vAc/occ-. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. As células apresentam evolução de infecção por vírus selvagem sem oclusão positiva com clara perda da morfologia fusiforme celular. Barra das fotografias é de 50 µm.

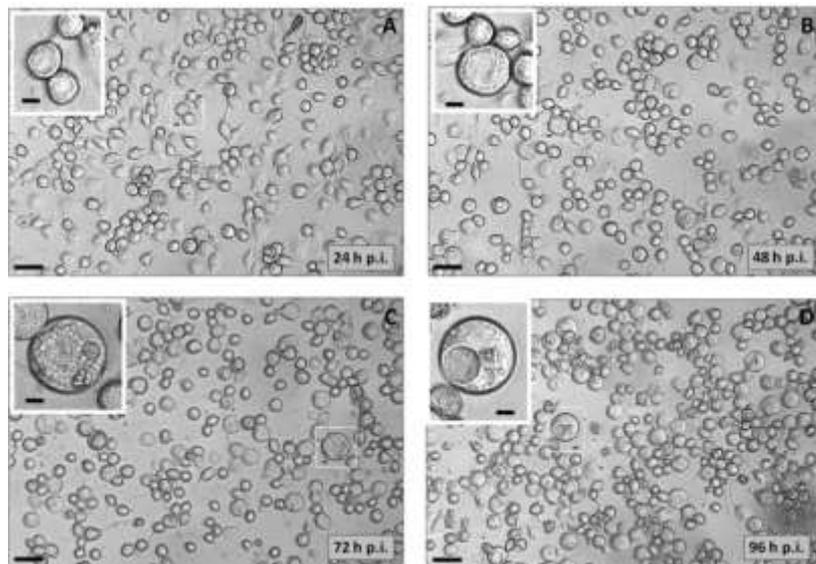


Figura 35. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP-Pp-BaTx/occ-. Este vírus apresenta o peptídeo sinal, o pró-peptídeo e a toxina madura sob o comando do promotor forte muito tardio da poliedrina. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Este vírus em tempo tardio de infecção não parece promover mudanças citopatológicas nesta linhagem celular. A linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. A barra das fotografias representa 50 µm.

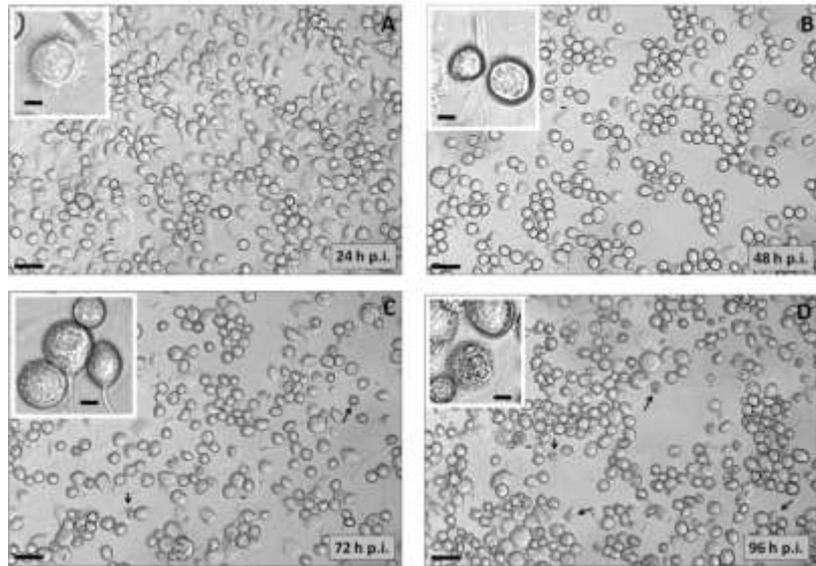


Figura 36. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-Pp-BaTx/occ-. Neste vírus foi suprimido o peptídeo sinal natural da toxina e está presente apenas o pró-peptídeo fusionado a toxina madura. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam para células mortas por necrose. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. Barras das fotografias representam 50 µm.

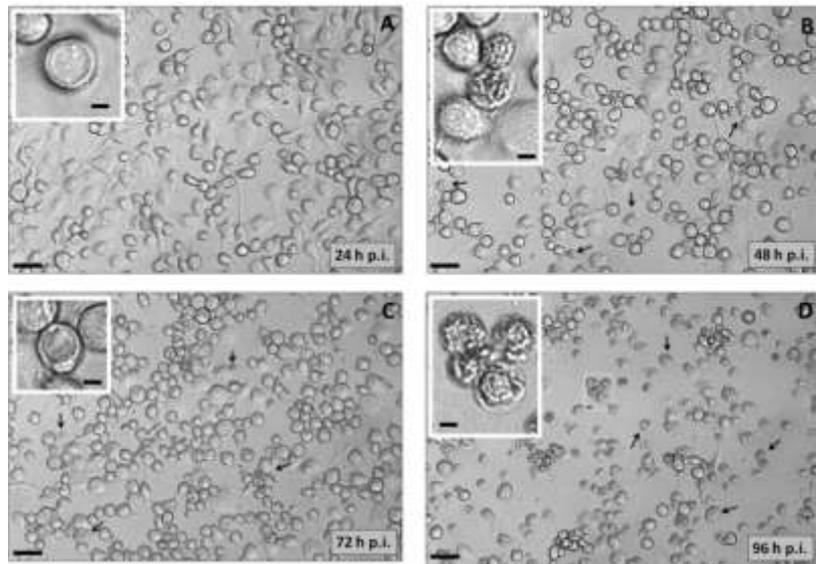


Figura 37. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ-. Este vírus expressa a toxina madura em tempos muito tardios de infecção. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas apontam para células em necrose. Linha retangular branca mostra a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. Barras das fotografias representam 50 µm.

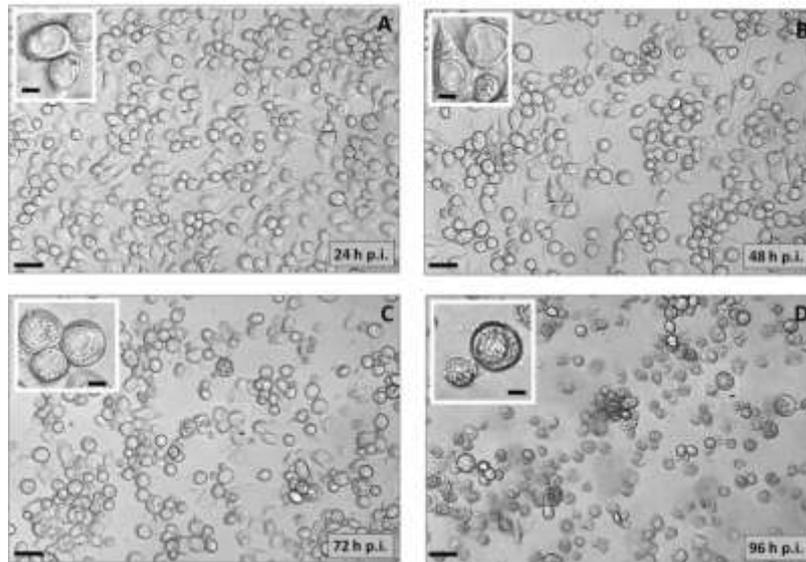


Figura 38. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ-. Este vírus recombinante fusiona à região amino-terminal da toxina o peptídeo sinal do gene de baculovírus *egt* para secreção da toxina e está sob o comando de um promotor muito tardio. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linhas retangulares brancas mostram a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. Barra preta da figura representa 50 µm.

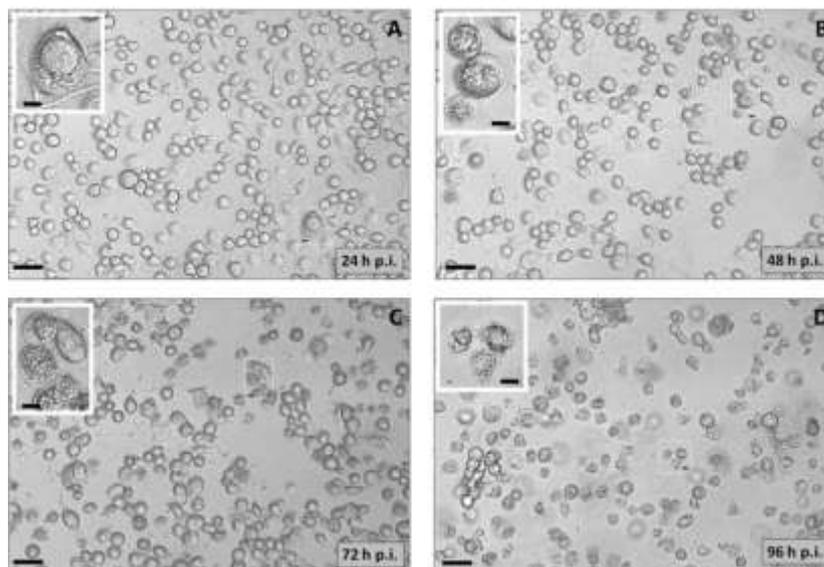


Figura 39. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(bx)-BaTx/occ-. Este vírus recombinante fusiona a porção amino-terminal da toxina o peptídeo sinal do gene de inseto *bombyxina* para secreção da toxina. Este gene está sob o comando de um promotor forte muito tardio. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linhas retangulares brancas mostram a região ampliada nos ‘insets’ com barra de 10 µm. Barras pretas abaixo nas figuras representam 50 µm.

Diferentemente do observado para células de *S. frugiperda*, células de *T. ni* foram mais sensíveis aos recombinantes occ- contendo a toxina fusionada ao peptídeo sinal de inseto e derivado de gene viral (comparar figura 28 e 29 com figura 38 e 39). Em *T. ni*, Recombinantes portando os peptídeos sinais de inseto (SP(bx)) e de baculovírus (SP(egt)) não retardaram gritantemente o processo de modificação citomorfológica. Além disso, não houve uma diferença significativa de infecção quando estas versões da toxina estavam sob o comando do promotor híbrido ativo em fases ‘late’ e muito tardio da infecção (comparar figura 38 e 39 com figura 42 e 43).

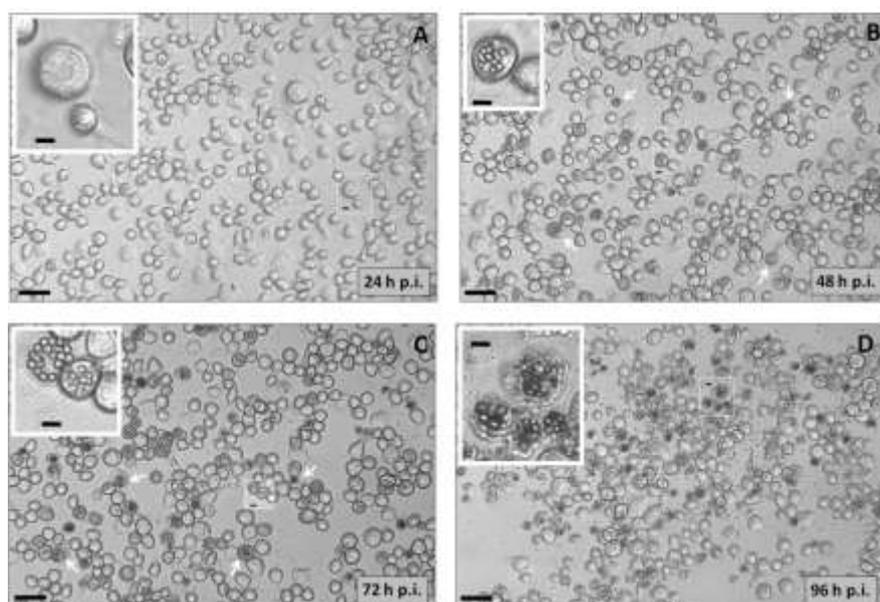


Figura 40. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus controle vAc/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Setas mostram células com poliedros. Acúmulo de poliedros ocorre após o tempo de 48 h p. i. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 μm). Barras pretas abaixo nas fotografias representam 50 μm.

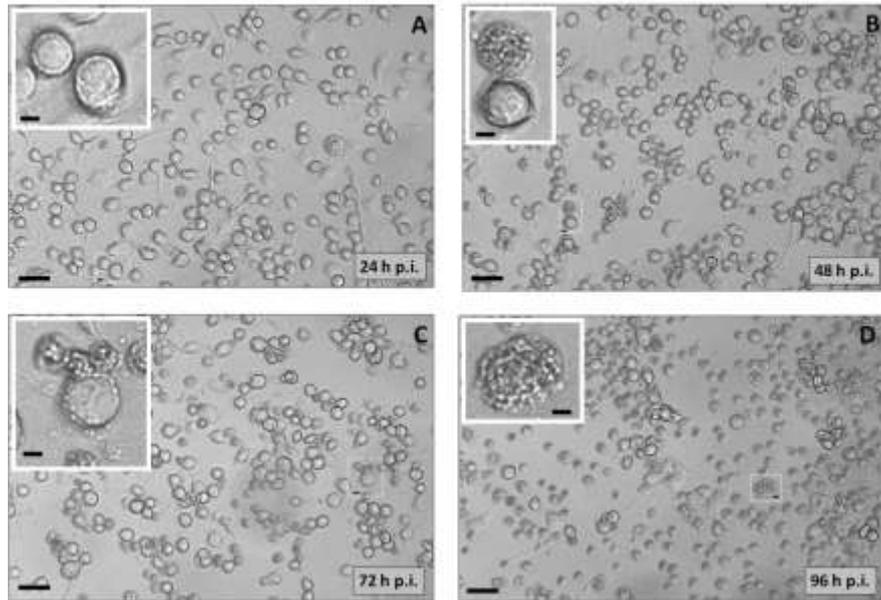


Figura 41. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-BaTx/occ+. Este recombinante expressa à versão contendo a toxina madura em tempos ‘late’ e muito tardio de infecção. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Barras pretas abaixo nas figuras representam 50 μm. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 μm).

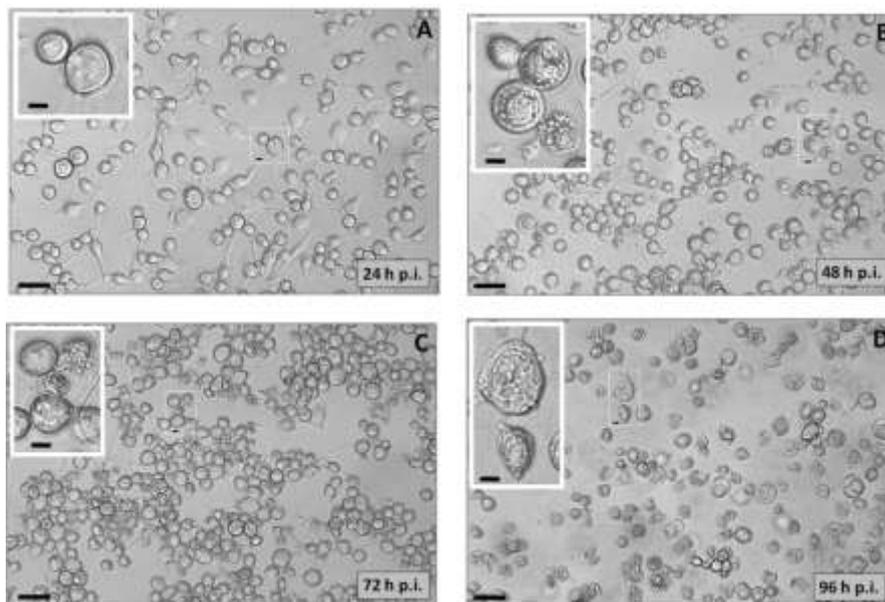


Figura 42. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(egt)-BaTx/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 μm). Barras pretas abaixo nas fotografias representam 50 μm.

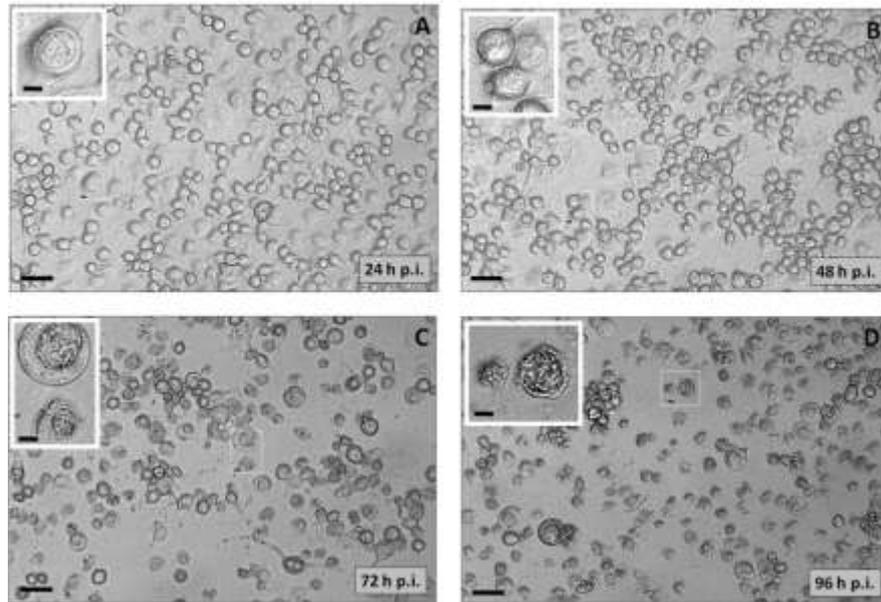


Figura 43. Infecção de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 com o baculovírus recombinante vAc-SP(bx)-BaTx/occ+. Células foram fotografadas com aumento de 20X a (A) 24, (B) 48, (C) 72 e (D) 96 h p. i. Linha retangular branca mostra região ampliada nos ‘insets’ (barra de 10 µm). Barras pretas abaixo nas fotografias representam 50 µm.

Semelhante ao que ocorreu com os recombinantes infectando linhagem IPLB-Sf21-AE, não houve produção de poliedros durante infecção com recombinantes occ+ vAc-BaTx/occ+, vAc-SP(egt)-BaTx/occ+ e vAc-SP(bx)-BaTx/occ+ (Figuras 41 a 43). Esta característica difere da infecção pelo vírus controle sem toxina, vAc/occ+ (Figura 40, setas brancas).

5.6 Ensaio de viabilidade celular em linhagem derivada de *S. frugiperda* e *T. ni*

Para ensaio de viabilidade, monocamadas de células de *S. frugiperda* e *T. ni* foram infectadas de igual modo com vírus recombinantes expressando diferentes versões da toxina BaTx (m. o. i. 10). Os recombinantes occ- (vAc-SP-Pp-BaTx, vAc-Pp-BaTx, vAc-BaTx, vAc-S(egt)-BaTx e vAc-S(bx)-BaTx) apresentavam suas

respectivas versões da toxina sob o comando do promotor muito tardio que naturalmente controla o gene da poliedrina no selvagem AcMNPV enquanto que os recombinantes occ⁺ apresentavam suas respectivas versões sob o comando dos promotores *in tandem* *pSyn* e *pXVI*, ativos durante as fases ‘late’ e muito tardio da infecção. Células mortas e vivas foram contadas com base na integridade da membrana citoplasmática, uma vez que o corante utilizado no ensaio penetra apenas em células sem integridade, tornando-as azuis.

Durante ensaio com recombinantes occ⁻ expressando diferentes versões da toxina, observou-se que em ambas as linhagens a versão contendo a toxina madura (vAc-BaTx/occ⁻) matou mais rapidamente as células infectadas quando comparadas com as outras versões (curvas azuis dos gráficos apresentados na Figura 44). Em células IPLB-Sf21-AE, com 48 h p. i. aproximadamente 80% das células já estavam mortas, como contrapartida, a 24 h. p. i. não houve morte celular considerável. Resultado diferente ocorreu com células BTI-Tn5B1-4 que com 24 h. p. i. apresentava 20% de células mortas, enquanto que a 48 h p. i. somente 40% havia morrido. Ambos os recombinantes atingiram 100% de mortalidade a 96 h p. i.

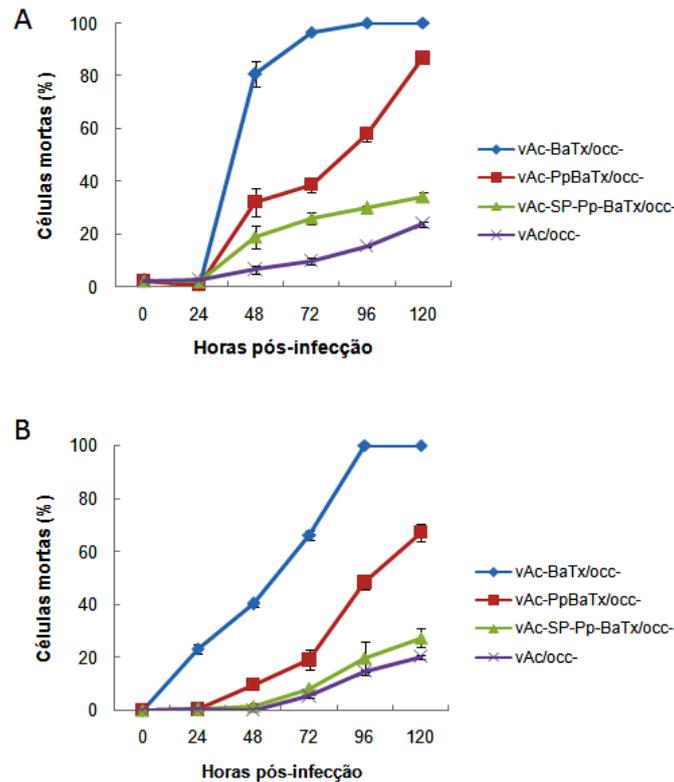


Figura 44. Ensaio de viabilidade celular com recombinantes occ- em duas linhagens derivadas de inseto. Os recombinantes apresentam diferentes versões da toxina sob o comando de um promotor forte muito tardio. (A) Contagem de células viáveis da linhagem IPLB-Sf21-AE em diferentes horas pós-infecção. (B) Contagem de células viáveis da linhagem BTI-Tn5B1-4 em diferentes horas pós-infecção. Estão sendo mostradas nos gráficos barras de desvio padrão. O experimento foi feito em triplicata biológica, fotografando-se entr 4 a 8 campos escolhidos aleatoriamente. Campos com baixa densidade celular foram descartados.

O recombinante contendo a ORF completa da toxina (vAc-SP-Pp-BaTx/occ-) apresentou baixa citotoxicidade quando comparada com os outros baculovírus em ambas as linhagens (curvas verdes dos gráficos apresentados na figura 44). Em células de *T. ni* houve uma aproximação maior deste recombinante com o vírus controle quanto ao nível de mortalidade celular causado. Foi possível observar que a presença do pró-peptídeo fusionado à toxina (vírus vAc-Pp-BaTx/occ-) promoveu um retardo temporal no efeito citopático quando comparado com infecção por vAc-BaTx/occ-, uma vez que

a 120 h p. i. havia entre 60-80% de células mortas nas duas linhagens (curvas vermelhas dos gráficos apresentados na figura 44).

Análise de viabilidade de células infectadas por recombinantes occ- contendo versões da toxina fusionada a peptídeos sinais derivados de inseto e vírus (vAc-SP(bx)-BaTx/occ- e vAc-SP(egt)-BaTx respectivamente) apresentaram diferenças significativas conforme ocorreu o progresso da infecção. Células derivadas de *S. frugiperda* apresentaram menos sensibilidade aos recombinantes, diferentemente do que ocorreu com células de *T. ni* (Gráficos apresentados na figura 45). Esta última, com 120 h p. i., apresentou mortalidade celular de aproximadamente 80%, enquanto células da linhagem IPLB-Sf21-AE, em mesmo tempo de infecção, apresentou aproximadamente 40% de mortalidade. Os peptídeos sinais derivados de gene de inseto ou de gene viral não apresentaram diferenças significativas na mortalidade celular para os recombinantes occ- testados.

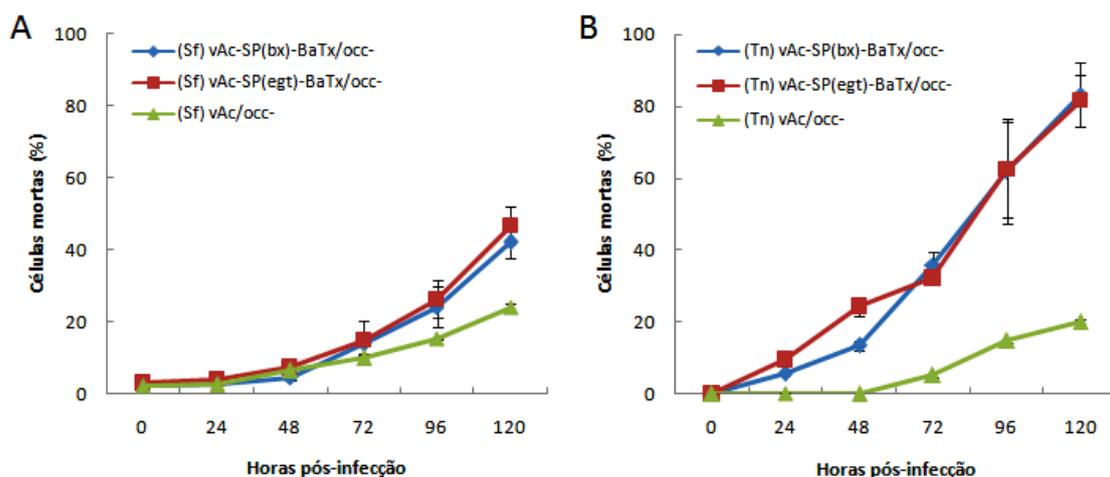


Figura 45. Comparação da viabilidade celular em diferentes linhagens infectadas por recombinantes expressando a toxina fusionada a diferentes peptídeos sinais. Células de *T. ni* (Tn) e *S. frugiperda* foram infectadas com recombinante expressando a toxina fusionada a peptídeo sinal derivado de inseto (bx) ou a um peptídeo sinal derivado de baculovírus (egt). Ambas as versões estavam sob o comando de um promotor forte ativo na fase muito tardio da infecção. Células viáveis foram contadas com diferentes horas pós-infecção. Estão sendo mostradas barras de desvio padrão. O experimento foi feito em triplicata biológica, fotografando-se entr 4 a 8 campos escolhidos aleatoriamente. Campos com baixa densidade celular foram descartados.

Semelhantemente ao que ocorreu com os recombinantes occ-, durante infecção com vírus occ+ a versão contendo toxina madura (vAc-BaTx/occ+) apresentou maior mortalidade em tempos mais precoces de infecção. Até 48 h p. i., aproximadamente 80% das células em ambas as linhagens testadas estavam mortas. Uma diferença marcante observada entre as linhagens (ratificada também pela infecção com recombinantes occ-) foi a mortalidade significativa com 24 h p. i. em células de *T. ni*. Sob este aspecto, constatou-se a morte de aproximadamente 50% da população celular durante infecção com o vírus contendo toxina madura (curvas azuis dos Gráficos apresentados na figura 46).

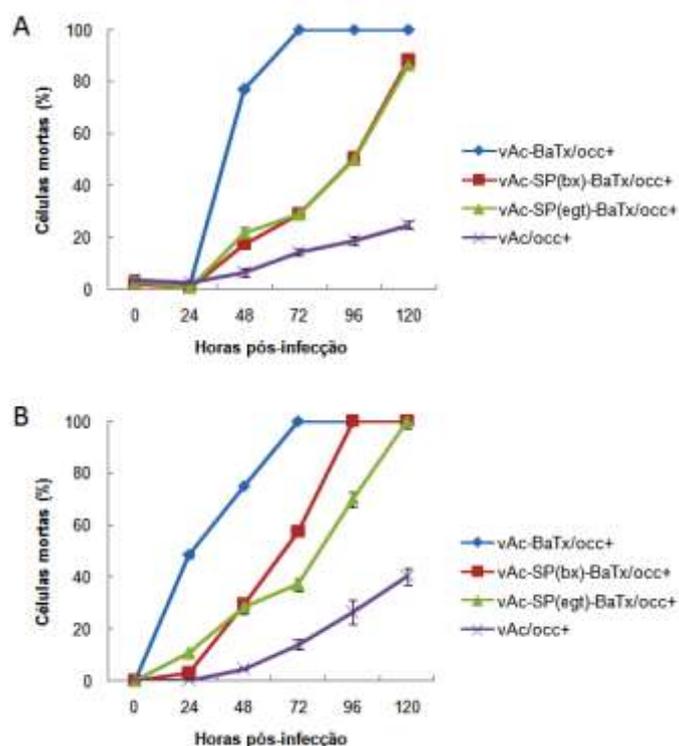


Figura 46. Ensaio de viabilidade celular com recombinantes occ+ em duas linhagens celulares. Os recombinantes apresentam diferentes versões da toxina sob o comando de um híbrido ativo na fase ‘late’ e muito tardio da infecção. (A) Contagem de células viáveis da linhagem IPLB-Sf21-AE em diferentes horas pós-infecção. (B) Contagem de células viáveis da linhagem BTI-Tn5B1-4 em diferentes horas pós-infecção. Estão sendo mostradas barras de desvio padrão. O experimento foi feito em triplicata biológica, fotografando-se entr 4 a 8 campos escolhidos aleatoriamente. Campos com baixa densidade celular foram descartados.

Foi notável que ambas as linhagens apresentaram sensibilidade a infecção com recombinantes contendo gene da toxina fusionada a SP(egt) ou SP(bx), expressos durante fases ‘late’ e muito tardio de infecção (curvas verdes e vermelhas dos Gráficos apresentados na Figura 46). Entretanto, apesar de sensíveis, houve diferença na intensidade de morte celular (comparar ponto correspondente a 96 e 120 h p.i. nas curvas verdes e azuis dos gráficos mostrados na Figura 46). Estes baculovírus portam os genes da toxina sob o comando de promotores *in tandem* fortes ativos durante ambas as fases. Outra característica facilmente constatável está relacionada à influência dos diferentes peptídeos à mortalidade celular no curso da infecção. Em células da linhagem IPLB-Sf21-AE não houve diferença significativa de mortalidade durante, entretanto, para células BTi-Tn5B1-4, o peptídeo sinal derivado de gene de inseto promoveu aumento na velocidade de morte celular quantificada (curva vermelha do gráfico B apresentado na Figura 46) comparado com o peptídeo sinal derivado de gene viral. No final do experimento (120 h p. i.), ambos apresentaram mesmo percentual de células mortas.

5.7 ‘Amplicon’, plasmídeos obtidos por recombinação e expressão bacteriana da toxina BaTx fusionada a cauda de hexa-histidina e a GST

Neste trabalho foi utilizado o sistema Gateway® (Invitrogen) para clonagem e expressão bacteriana da toxina BaTx da aranha *B. albiceps*. Depois de feita amplificação com primers *attB*-BaTx F e *attB*-BaTx R (Tabela 1 e sublinhado na figura 47 A) a partir do cDNA da glândula de veneno, foi observado em gel de agarose um fragmento de 184 pb denominado *attB*-BaTx (Figura 47 B, poço 2). O fragmento

apresentava os sítios específicos *attB1* e *attB2* flanqueando a ORF da toxina madura (Figura 47 A).

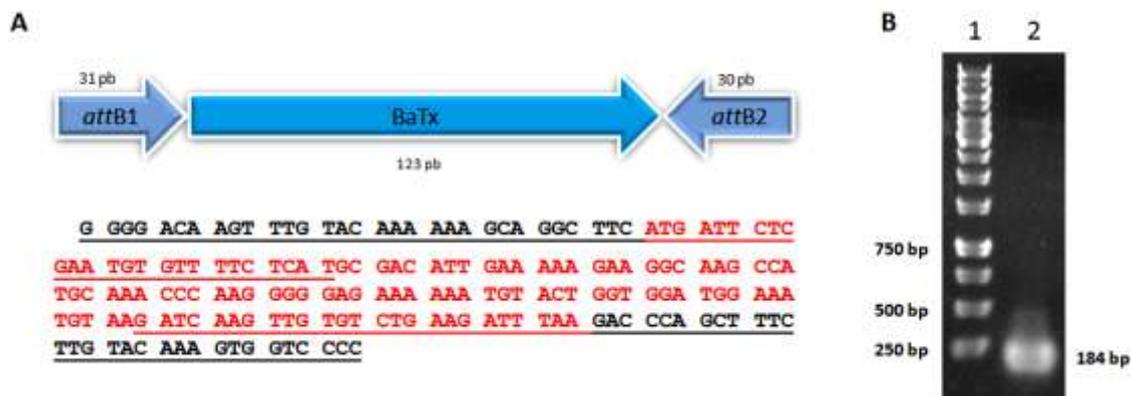


Figura 47. Sequência nucleotídica do fragmento *attB*-BaTx obtido por PCR e fragmento gerado. (A) A sequência apresenta as regiões *attB1* (31 pb) e *attB2* em preto e a ORF da toxina (123 pb) em vermelho; estas regiões também podem ser vistas de forma esquemática na parte superior da figura. A região onde se anelam os primers *attB*-BaTx F e *attB*-BaTx R estão sendo mostradas pelas sublinhas vermelhas. As sublinhas pretas mostram as regiões dos primers que não se anelam ao cDNA da glândula de veneno da aranha. (B) Gel de agarose a 0,8%: poço 1 – marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas); poço 2 – Fragmento *attB*-BaTx.

Depois de purificado, o fragmento de PCR *attB*-BaTx foi utilizado em reação de recombinação homóloga *in vitro* com o plasmídeo de entrada pDONR207 (5.585 pb, Figura 48 C, poço 2) cujo mapa pode ser observado na figura 48 A. O plasmídeo recombinante gerado nesta reação BP foi denominado pDONR207-BaTx (Figura 48 B), apresentou tamanho de 3.496 pb (Figura 48 C, poço 4) e quando digerido com *ApaI* e *PstI* gerou dois fragmentos, 3.156 pb e 340 pb (Figura 48 C, poço 5). Como controle, o plasmídeo pDONR207 foi também digerido com mesmas enzimas e, diferente do recombinante, três bandas foram geradas, 3.156 pb, 1.829 pb e 600 pb (Figura 48 C, poço 3).

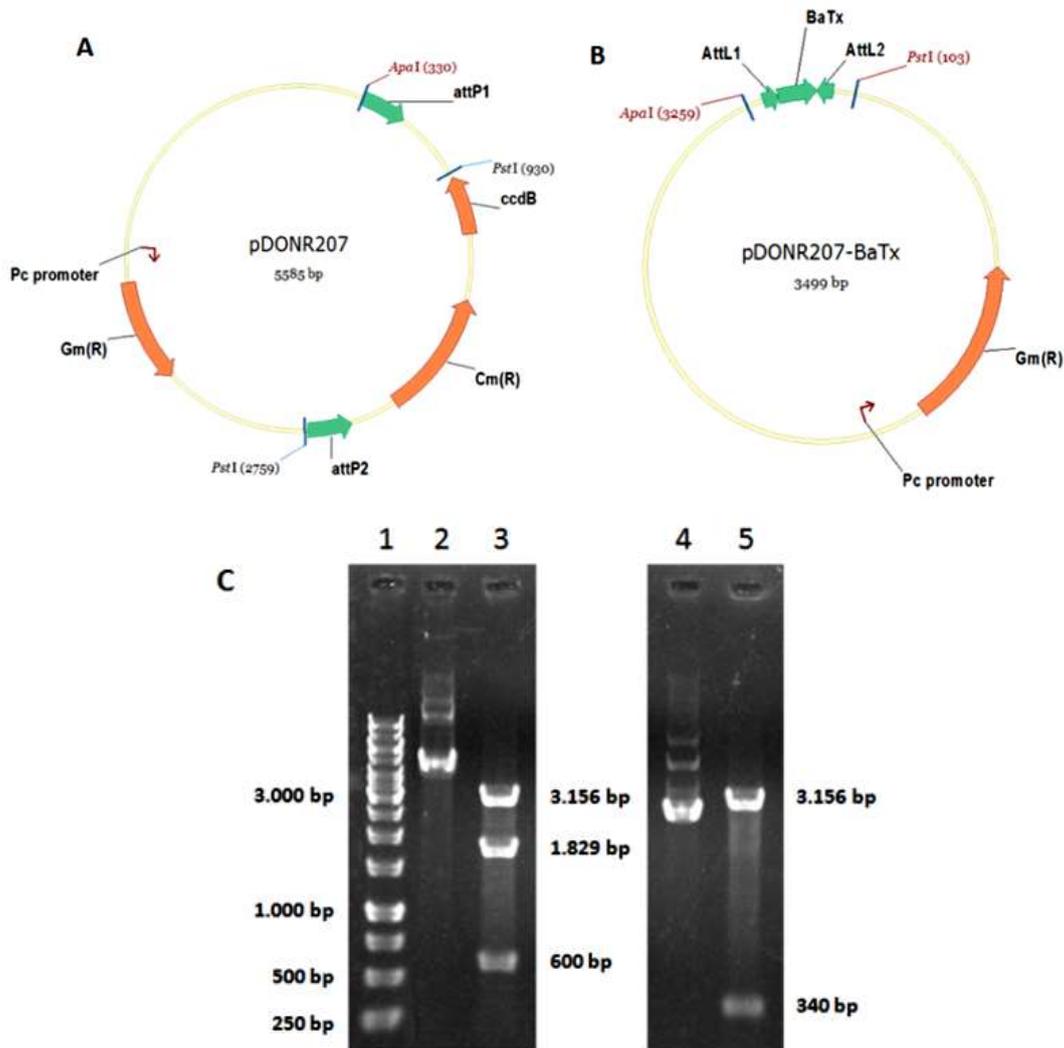


Figura 48. Obtenção de vetor de doação pDONR207-BaTx. (A) Mapa do plasmídeo de recombinação homóloga pDONR207 utilizado em reação BP clonase. (B) Mapa do plasmídeo gerado após reação BP, pDONR207-BaTx. Os esquemas dos plasmídeos foram obtidos do programa vector NTI v. 11 (Invitrogen). (C) Gel de agarose 0,8%: poço 1 – Marcador 1kb DNA ladder (Fermentas); poço 2 – plasmídeo pDONR207 intacto; poço 3 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDONR207 com as enzimas *ApaI* e *PstI*; 4: plasmídeo pDONR207-BaTx intacto; plasmídeo 5 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDONR207-BaTx com as enzimas *ApaI* e *PstI*.

O plasmídeo pDONR207-BaTx foi utilizado em reação LR clonase com o plasmídeo de expressão heteróloga, pDEST17 (6.354 pb). O vetor de expressão bacteriana obtido foi chamado de pDEST17-BaTx. Este vetor apresenta 4.825 pb e quando digerido com *BglIII* e *HindIII* gerou um fragmentos de 4.027 pb e de 798 pb

(Figura 49 C, poço 5). O plasmídeo pDEST17 foi usado como controle e foi digerido com mesmas enzimas gerando fragmentos de 4.027 pb, 1.295 pb e 1.032 pb (Figura 49 C, poço 3). O resultado do sequenciamento revelou a correta recombinação da toxina BaTx e fusão com cauda de hexa-histidina na porção amino-terminal.

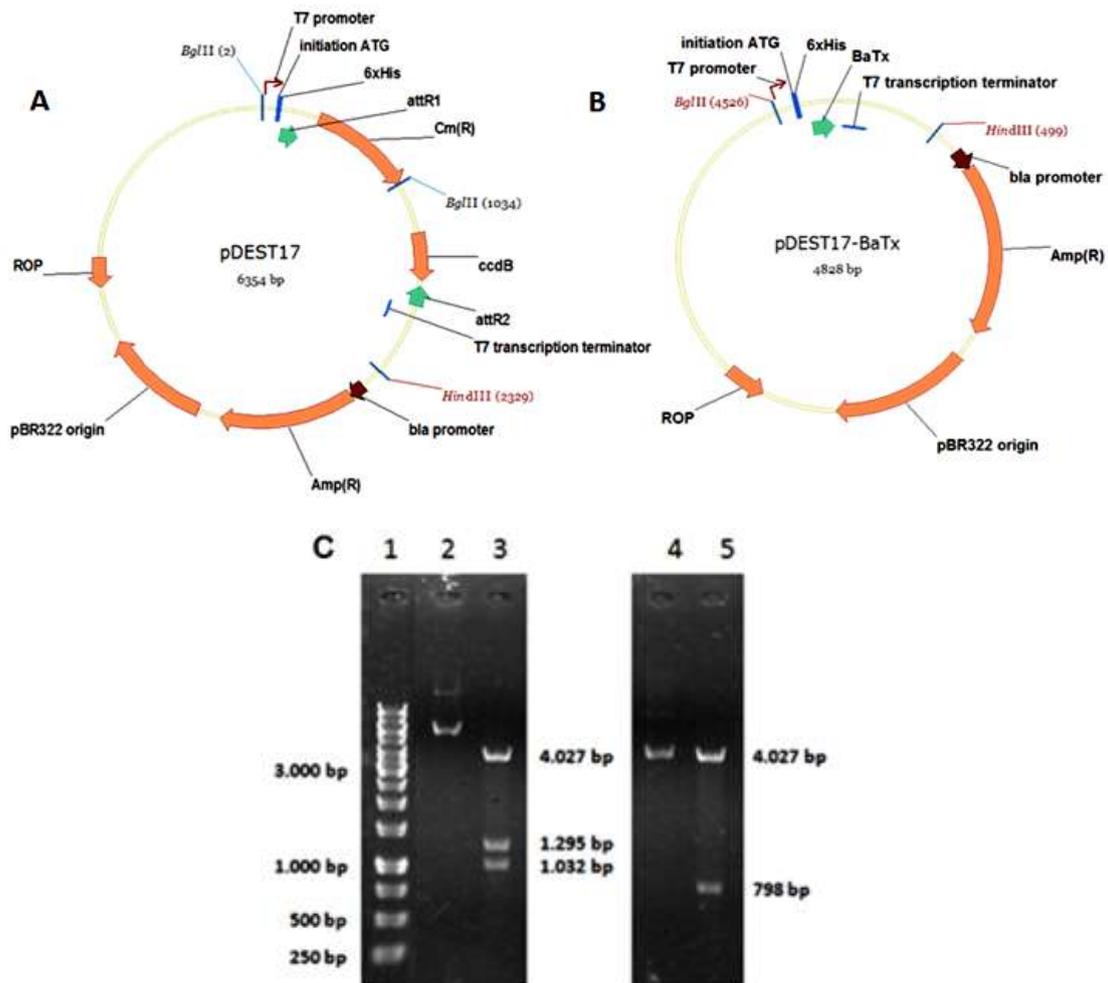


Figura 49. Construção de vetor de expressão bacteriano adicionando à toxina uma cauda de hexa-histidina. (A) Mapa do plasmídeo de recombinação homóloga pDEST17 utilizado em reação LR clonase. (B) Mapa do vetor de expressão heteróloga gerado após reação LR, pDEST17-BaTx. Os esquemas dos plasmídeos foram obtidos do programa vector NTI v. 11 (Invitrogen). (C) Gel de agarose 0,8%: poço 1 – Marcador 1kb DNA ladder (Fermentas); poço 2 – plasmídeo pDEST17 intacto; poço 3 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDEST17 com as enzimas *Bgl*III e *Hind*III; poço 4 – plasmídeo pDEST17-BaTx intacto; poço 5 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDEST17-BaTx com as enzimas *Bgl*III e *Hind*III.

O vetor recombinante pDEST17-BaTx foi utilizado para transformar bactérias da linhagem BL21AI. As colônias foram submetidas a ensaio piloto de expressão. Quando o extrato foi aplicado em gel tris-tricina SDS-PAGE não houve diagnóstico preciso da banda (dado não mostrado). Para confirmar a presença da proteína em gel foi promovida a transferência de proteínas imobilizadas em gel para membrana de nitrocelulose, e posterior imunomarcção com anticorpo primário anti-his. Entretanto não houve marcação (dado não mostrado). Em contra partida, quando submetido a ‘dot ELISA’ houve marcação quando o extrato de bactérias expressando a toxina foi imobilizado (Figura 50).

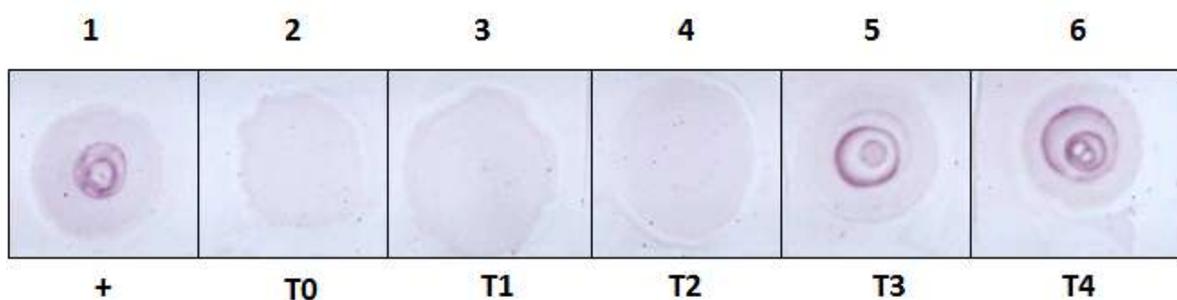


Figura 50. ‘Dot ELISA’ de extratos de bactéria marcados com anti-His. Quadrado 1 – Controle positivo, proteína fusionada a cauda de hexa-histidina e purificada por coluna de níquel; quadrado 2 – BL21AI transformada com pDEST17-BaTx, tempo de indução de 0 h com L-arabinose; quadrado 3 – tempo de indução de 1 h; quadrado 4 – tempo de indução de 2 h; quadrado 5 – tempo de indução de 3 h; quadrado 6 – tempo de indução de 4 h.

Posteriormente, o plasmídeo recombinante pDONR207-BaTx foi utilizado em segunda reação LR clonase com o plasmídeo de expressão bacteriana pDEST15 (7.013 pb – Figura 51 A). O vetor obtido foi chamado de pDEST15-BaTx com tamanho de 5.484 pb (Figura 51 C, poço 4; plasmídeo não-linearizado) e para confirmar a recombinação o vetor foi digerido com as enzimas *Bgl*III e *Eco*RI, produzindo dois fragmentos, 4.768 pb e 716 pb (Figura 51, poço 5). O plasmídeo pDEST15 foi também

usado como controle após ser digerido com mesmas enzimas gerando fragmentos de 4.768 pb, 1.483 pb, 461 pb e 301 pb (Figura 51 C, poço 3; com alto conteúdo de DNA e parcial degradação). Este plasmídeo permite a fusão da toxina BaTx a porção carboxi-terminal da proteína eucariótica solúvel GST.

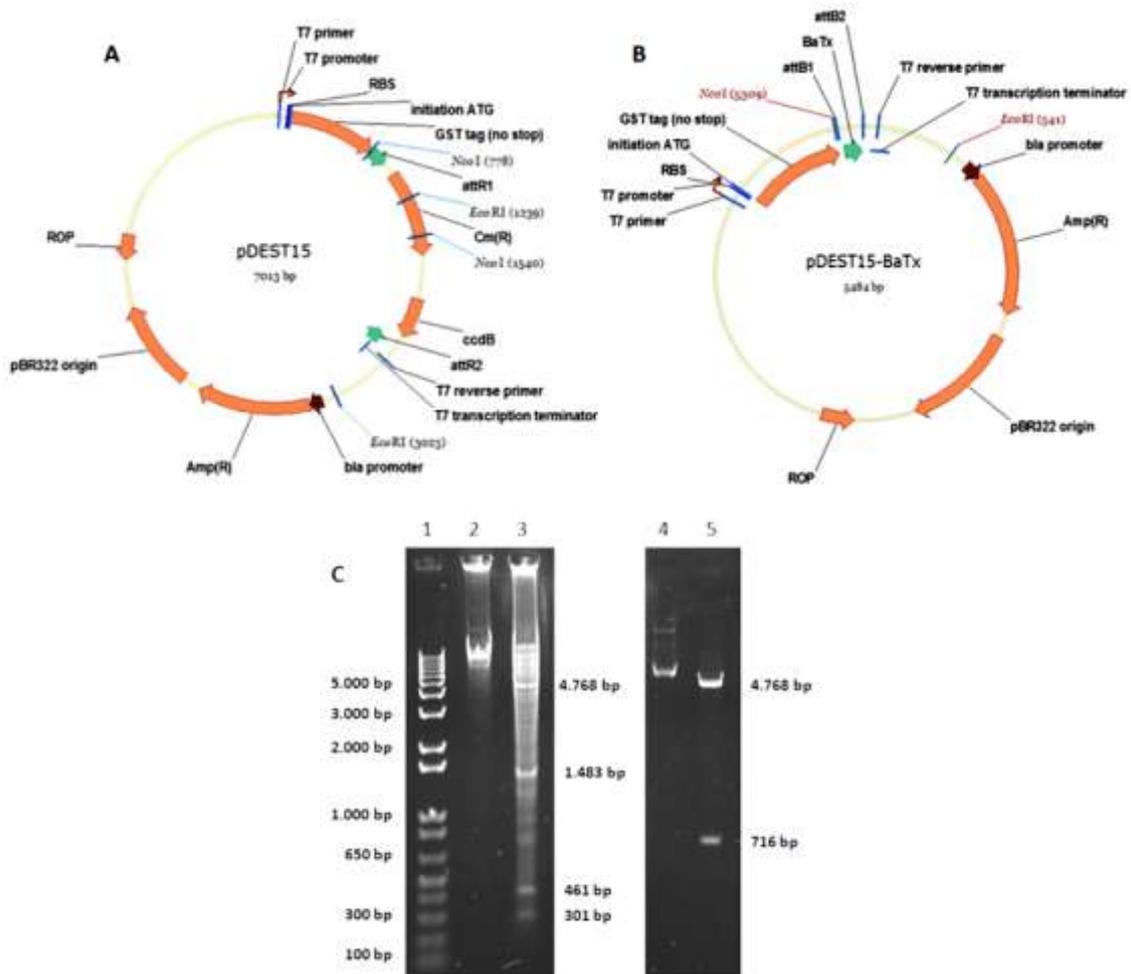


Figura 51. Construção de vetor de expressão bacteriano adicionando à toxina GST. (A) Mapa do plasmídeo de recombinação homóloga pDEST15 utilizado em segunda reação LR clonase. (B) Mapa do vetor de expressão heteróloga gerado após reação LR, pDEST15-BaTx. Os esquemas dos plasmídeos foram obtidos do programa vector NTI v. 11 (Invitrogen). (C) Gel de agarose 0,8%: poço 1 – Marcador 1kb DNA ladder (Fermentas); poço 2 – plasmídeo pDEST15 intacto; poço 3 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDEST15 com as enzimas *Bgl*III e *Eco*RI; poço 4 – plasmídeo pDEST15-BaTx intacto; poço 5 – fragmentos de DNA gerados pela digestão do plasmídeo pDEST15-BaTx com as enzimas *Bgl*III e *Eco*RI.

O vetor recombinante pDEST15-BaTx foi utilizado para transformar bactérias da linhagem BL21AI. As colônias foram submetidas a ensaio piloto de expressão. Extratos coletados a 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas pós-indução foram aplicados em gel SDS-PAGE 12% e revelaram uma banda ausente no tempo 0 h, mas presente nos outros tempos; sem um aumento muito significativo em tempos mais tardios de indução (Figura 52 A). A banda mostrou-se em tamanho coerente com o previsto *in silico*, de aproximadamente 33 kDa. Além disso, promoveu-se a separação de frações solúvel e insolúvel de extratos induzidos por 1 h a fim de se checar a presença ou ausência da proteína recombinante em corpos de inclusão. As frações foram submetidas também a SDS-PAGE 12% revelando que maior parte da proteína traduzida estava na fração insolúvel (Figura 52 B).

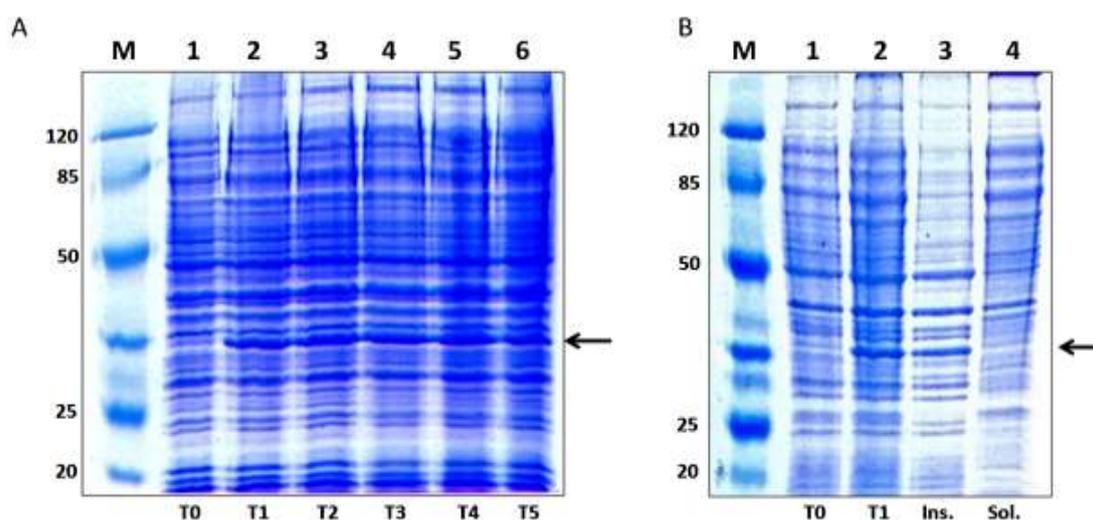


Figura 52. SDS-PAGE de extratos bacterianos expressando a proteína recombinante GST-BaTx. (A) Ensaio piloto comparando diferentes tempos de indução com L-arabinose: M – ‘Prestained Protein Molecular Weight Marker’ (Fermentas); poço 1 – 0 h de indução; poço 2 – 1 h de indução; poço 3 – 2 h de indução; poço 4 – 3 h de indução; poço 5 – 4 h de indução; poço 6 – 5 h de indução. (B) Ensaio de solubilidade protéica: M – ‘Prestained Protein Molecular Weight Marker’ (Fermentas); poço 1 – 0 h de indução; poço 2 – 1 h de indução; poço 3 – fração insolúvel; poço 4 – fração solúvel.

Fração solúvel da proteína produzida em escala maior foi aplicada em gel SDS-PAGE e a banda de aproximadamente 33 kDa foi removida do gel, solubilizada e utilizada para imunização de camundongos. Após imunizações, o sangue foi devidamente extraído dos animais e o plasma purificado. Quatro soros murinos foram separadamente obtidos e usados para teste de imunomarcação por ‘dot-ELISA’. Dos quatro soros, dois apresentaram forte marcação contra extrato bacteriano induzido, outro apresentou fraca marcação e o último não apresentou marcação aparente (dados não mostrados).

Extratos bacterianos correspondentes a 0 e 1 h pós-indução foram duplamente aplicados em SDS-PAGE 12%. Um dos géis corridos foi corado em solução contendo azul de Comassie (Figura 53 A) e o segundo foi transferido para membrana de nitrocelulose para imunomarcação com anticorpos primários produzidos em camundongos neste trabalho (Figura 53 B). A revelação da membrana mostrou um vazamento de expressão basal no tempo 0 h de indução e um aumento acentuado a 1 h (Figura 53 A e B, poços 1 e 2 respectivamente).

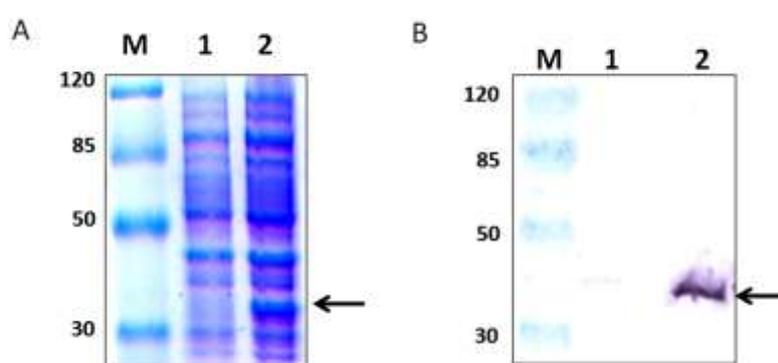


Figura 53. SDS-PAGE de extratos bacterianos para imunomarcação com anticorpos murinos. (A) Extrato a diferentes horas de indução: M – ‘Prestained Protein Molecular Weight Marker’ (Fermentas); poço 1 – 0 h de indução; poço 2 – 1 h de indução. (B) Imunomarcação com anticorpo murino produzido neste trabalho: M – ‘Prestained Protein Molecular Weight Marker’ (Fermentas); poço 1 – 0 h de indução; poço 2 – 1 h de indução.

5.8 Análise pós-traducional de toxina BaTx

Para análise pós-traducional, extrato de células das linhagens IPLB-SF21-AE e BTI-Tn5B1-4 infectadas em diferentes tempos por todos os recombinantes produzidos neste trabalho foram aplicadas em gel SDS-PAGE 17% com marcador pré-corado. Não foi possível identificar banda de tamanhos esperados ou diferença significativa dos controles virais e dos extratos de células não-infectados, bem como não foi possível observar bandas em gel SDS-PAGE corrido em tampão Tris-Tricina (ambos os resultados negativos não são mostrados). Além disso, foi feita imunomarcação para extrato de células de ambas as linhagens infectadas com todos os recombinantes em diferentes tempos de infecção. Para tal propósito, foi usado como anticorpo primário num primeiro experimento o plasma de coelhos imunizados com toxina Ba2 derivada de *B. albiceps* e num segundo experimento o plasma de camundongos imunizados com proteína recombinante produzida neste trabalho. Não houve sucesso em ambas as marcações, inclusive com transferência de proteínas imobilizadas em gel SDS-PAGE corrido em tampão tris-Tricina, próprio para peptídeo (resultados negativos não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Baculovírus são parasitas celulares obrigatórios com um ciclo bifásico de vida. Esses vírus são utilizados como controladores biológicos de insetos-praga devido à sua alta especificidade ao seu hospedeiro e segurança biológica para com organismos não-alvo. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, genes heterólogos puderam ser inseridos neste sistema eucariótico. A inserção de informações exógenas no genoma viral tem o potencial de aumentara velocidade de ação desses vírus e consequentemente, suas propriedades pesticidas, bem como, o surgimento de uma potente ferramenta biotecnológica de expressão.

Toxinas inseticidas estão presentes em muitos organismos ecologicamente relacionados com esta vasta Classe de artrópodes. O veneno de aracnídeos, por exemplo, apresenta um vasto arsenal de peptídeos com alta letalidade contra insetos, além de representar um atrativo e diverso conjunto de biomoléculas com potencial para o descobrimento de drogas (Estrada *et al.*, 2007). Entretanto, tanto a quantidade de moléculas disponíveis quanto sua purificação dificultam o uso farmacológico, bem como o estudo toxinológico sistemático.

Neste palco, propomos a utilização de baculovírus recombinantes para a expressão de diferentes versões do peptídeo inseticida BaTx a fim de (1) melhorar a ação do vírus como bioinseticida e de (2) entender como este peptídeo age em células de inseto. A toxina BaTx foi derivada do cDNA da glândula de veneno da aranha caranguejeira *B. albiceps*. Corzo *et al.* (2009) identificaram no extrato de veneno desta aranha dois peptídeos inseticidas muito parecidos entre si, denominados Ba1 e Ba2, e incapazes de modificar canais de sódio-voltagem dependentes. Ambos os peptídeos encontrados apresentaram altíssima identidade com o peptídeo putativo BaTx, o que

permite entender que esta provável toxina apresenta micro-heterogeneidade com Ba1 e Ba2; fato este também constatado em peptídeo pertencentes a mesma família de toxinas a qual BaTx pertence (Shu *et al.*, 2001). Diante disso, concluiu-se que o alvo de atuação de BaTx permanece obscuro.

A ORF putativa contendo a toxina (Figura 8, de Material e Métodos) encontrada na biblioteca de cDNA apresenta três regiões comumente encontradas em ORFs de toxinas de aracnídeos (escorpião – Alami *et al.*, 2003; ácaro – Tomalski *et al.*, 1993), um peptídeo sinal para secreção (SP), um pró-peptídeo (Pp) com ação desconhecida e a toxina madura propriamente dita (BaTx). Neste trabalho, foram propostas três estratégias para expressão da toxina supracitada, o peptídeo como pré-pró-toxina (SP-Pp-BaTx), como pró-toxina (Pp-BaTx) e como toxina madura (BaTx) em células de insetos pela infecção com baculovírus recombinantes.

Foram utilizados também os peptídeos sinais do gene *egt* do baculovírus AgMNPV (Pinedo *et al.*, 2003) e do gene *bombyxina* da mariposa *B. mori* (Adachi *et al.*, 1989) em fusão com a toxina BaTx. O EGT é uma glicosiltransferase viral secretada em tempos precoces da infecção por baculovírus que regula níveis de ecdisteróide do hospedeiro ao catalisar a transferência de um açúcar (UDP-glicose) para o hormônio ecdiziona (O'Reilly e Miller, 1989). Esta ação prende o inseto em sua forma larval, impedindo que entre no estágio de pupa, além de influenciar o comportamento da larva durante a infecção (Hoover *et al.*, 2011). Já a Bombyxina é um neuro-hormônio tipo-insulina secretado pelo cérebro do inseto de forma constitutiva. Não apresenta atividade relacionada ao metabolismo de glicose, entretanto induz o desenvolvimento de larvas para a forma adulta ao ativar glândulas pró-torácicas a sintetizarem e liberarem ecdiziona (Bayazit, 2009).

Peptídeos sinais são extremamente variáveis quanto ao tamanho e composição aminoacídica e são fundamentais para expressão e processamento de proteínas residentes em algumas organelas ou secretadas (Hegde e Bernstein, 2006). Esta importante sequência efêmera é formada por três regiões discretas, região-h hidrofóbica que interage com a bicamada lipídica, flanqueada por uma região-n (amino-terminal) e uma região-c (carboxi-terminal) que contém o sítio de clivagem consenso para a ação da enzima sinal-peptidase (Molhoj e Degan, 2004). Um peptídeo sinal na região amino-terminal é responsável por enviar proteínas ou peptídeos para o Retículo Endoplasmático. Em casos de expressão heteróloga, o peptídeo sinal pode permanecer ligado à proteína, indicando um processamento inadequado. Tessier *et al.* (1991), por exemplo, notaram acúmulo de agregados de pré-pró-papaína no citoplasma de células de inseto infectadas por recombinante e fusionaram a proteína a um peptídeo sinal derivado de células de inseto. A substituição do sinal resultou num aumento de secreção da proteína. O câmbio ou adequação de peptídeo sinal à maquinaria de expressão não garante o correto processamento da proteína e incursão na via endocítica (Jarvis *et al.*, 1993; Ailor *et al.*, 1999). Entretanto, aumentam a probabilidade da proteína de ser corretamente expressa.

As cinco diferentes versões foram obtidas por PCR, clonadas, sequenciadas e inseridas no plasmídeo doador comercial pFastBac1® que permite a construção de baculovírus recombinantes por transposição em sistema procariótico. Os recombinantes produzidos continham as versões da toxina sob o comando de um promotor viral forte e não apresentavam o fenótipo viral de oclusão, sendo chamados de occ-.

A forma viral produzida por recombinantes occ- é capaz de infectar insetos somente via injeção intra-hemocele. Este vírion não é a forma desejada para análise de eficiência e utilização como agente de controle biológico, uma vez que não infecta por

via oral e nem pode ser pulverizado em plantações. Os vários baculovírus recombinantes anteriormente construídos carregando genes inseticidas foram utilizados em bioensaios orais (Carbonell *et al.*, 1988; Tomalski e Miller, 1991; McCutchen *et al.*, 1991; Prikhod'ko *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2008). Isso significa que resultados obtidos com recombinantes occ- portando diferentes versões da toxina não poderiam ser comparados com os resultados obtidos com os recombinantes dos outros trabalhos, uma vez que a via de infecção e a quantidade viral administradas seriam diferentes (Hughes *et al.*, 1997). Diante disso, recombinantes occ- foram usados para investigar o modo de ação da toxina em cultura de células.

Diante deste impasse, promoveu-se a modificação do vetor comercial pFastBac1® para que este transpusesse junto ao gene heterólogo da toxina, o cassete do gene da poliedrina, via sistema bacteriano, a fim de obter-se recombinantes occ+. Para tal propósito, o promotor forte do vetor comercial foi excluído por digestão, e foi inserido um cassete contendo gene e promotor da poliedrina junto a dois promotores *in tandem* para expressão do gene da toxina. As versões BaTx, SP(egt)-BaTx e SP(bx)-BaTx foram clonadas neste vetor e usadas para transposição.

Para análise de efeitos citopáticos causados durante infecção com recombinantes occ- (apresentam suas versões com expressão muito tardia) e occ+ (apresentam suas versões sob o comando de promotor tardio e muito tardio), monocamadas de células derivadas dos lepidópteros *T. ni* (linhagem BTI-Tn-5B1-4) e *S. frugiperda* (linhagem IPLB-Sf21-AE) foram separadamente infectadas com inóculos contendo multiplicidade de infecção de 10 vírus/célula. Foram fotografadas e usadas em ensaio de viabilidade celular.

Um fato importante e relevante aqui constatado foi que células infectadas por recombinantes occ+ não apresentaram acúmulo de poliedros nucleares em tempos

tardios de infecção, característica observada também *in vivo*. Jarvis *et al.* (1992) mostraram que a eficiência de localização nuclear da poliedrina depende de sua razão de biossíntese. Esta observação explica a ausência de corpos de oclusão nuclear durante infecção com recombinantes *occ+*, uma vez que estes causam ampla mortalidade até 48 h p. i., momento em que ocorre massiva síntese de poliedrina e envio para o núcleo. A morte celular prematura impede o acúmulo de poliedrina, culminando na ausência de poliedrina nuclear e drástica diminuição da produção de OBs recombinantes pela célula hospedeira, como pôde ser constatado na Tabela 3 em experimento *in vivo*. Dessa forma, os recombinantes *occ+* construídos não puderam ser usados em bioensaio oral; mas puderam ser usados a título de comparação em ensaio de viabilidade celular, uma vez que apresenta promotores ativos em fase tardia e muito tardia.

Durante o estabelecimento e início da infecção, os recombinantes *occ-* e *occ+* apresentaram características típicas de infecção por baculovírus em cultura de célula como hipertrofia nuclear e perda da morfologia da célula (O'Reilly e Miller, 1991) (Figuras 23 a 42). Essas mudanças citomorfológicas devem-se principalmente a duas características importantes. A primeira característica é que o vírus estabelece seu estroma de infecção no núcleo da célula e força um inchaço natural por causa da restrição de espaço e alta taxa de replicação viral e a segunda deve-se ao fato de que o citoesqueleto celular sofre uma profunda reorganização estrutural durante a infecção (Volkman, 2007).

Os recombinantes *vAc/occ-* e *vAc/occ+* foram usados como controle comparativo de infecção para recombinantes *occ-* e *occ+* contendo as versões da toxina, respectivamente. Optou-se pelo uso destes dois recombinantes como controles de infecção, em detrimento do baculovírus selvagem *AcMNPV* a fim de evitar interferência de resultados, ou porque o selvagem apresenta o gene da poliedrina e não

serviria de comparação para vírus occ- e segundo por não apresentar a região que torna o genoma do baculovírus um plasmídeo gigante.

Durante análise de infecção por microscopia e ensaio de viabilidade celular, foram constatadas mudanças citomorfológicas claras nas células analisadas, bem como mudança na velocidade em que os recombinantes causaram a morte celular. Constatou-se que os recombinantes expressando a toxina madura (vAc-BaTx/occ- e vAc-BaTx/occ+) apresentaram maior virulência para cultura de ambas as linhagens testadas. Ao analisar os gráficos de viabilidade celular, foi notável que a linhagem BTI-Tn5B, apesar ter se apresentado mais resistente que IPLB-Sf21-AE, começa a morrer em tempos mais precoces da infecção (linhas azuis nos gráficos A e B das Figuras 43 e 45). Em tempos mais tardios da infecção, foi observada estrutura enrugada remanescente durante infecção em ambas as linhagens, sem membrana citoplasmática circundante.

Foi anteriormente mostrado que linhagens de células derivadas de *S. frugiperda* são menos eficientes para produção de proteínas recombinantes sob o comando do promotor da poliedrina, durante infecção com AcMNPVs geneticamente modificados comparadas com células derivadas de *T. ni* (Saarinen *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 1993; Krammer *et al.*, 2010). Ou seja, linhagens derivadas de *T. ni* provavelmente apresentaram maior mortalidade em tempos menos tardios de infecção (24 h p. i.) por causa de sua eficiência na expressão de proteínas recombinantes, apesar de apresentarem maior resistência à morte ao comparar curvas em tempos de 48 h p. i. (Wickham *et al.*, 1992). Induzindo a crer que células derivadas de *S. frugiperda* são mais sensíveis a toxina, porém, menos eficientes para produção de proteína recombinante.

O recombinante vAc-Pp-BaTx expressa a pró-toxina em tempos muito tardios de infecção, uma vez que está sob o comando do promotor da poliedrina. A presença da

região do pró-peptídeo (Pp) na toxina recombinante retardou claramente sua ação necrótica. Alguns trabalhos mostram que esta região imatura pode influenciar o destino da proteína (Joliffe *et al.*, 2006), estar envolvida em inativação temporal ou funcionar como uma chaperona intramolecular (Sellman e Tweten, 1997), ajudando a proteína a tomar a conformação nativa (há controvérsias quanto esta última função, Buczek *et al.*, 2004). Duas hipóteses podem explicar esse retardamento na ação tóxica do peptídeo Pp-BaTx recombinante produzido: (1) pode existir um atraso na ação da toxina por causa da necessidade de processamento da região do pró-peptídeo que é tempo-dependente ou; (2) a região do pró-peptídeo permanece na toxina, porém diminui sua atividade citotóxica.

A versão expressa pelo recombinante vAc-SP-Pp-BaTx/occ-, a pré-pró-toxina, não promulgou aumento significativo de morte celular comparada ao vírus controle. Interessante foi que, mesmo havendo uma proximidade evolutiva entre insetos e aracnídeos, não é garantido que o peptídeo sinal deste último seja reconhecido e / ou corretamente processado pela maquinaria do inseto, fato este previamente observado por van Beek *et al.* (2003). Assim, quando uma pré-pró-toxina ou uma pró-toxina é expressa em sistema heterólogo, não existe a certeza de que a maquinaria de expressão promoverá correto processamento do peptídeo sinal e do pró-peptídeo, produzindo uma toxina madura, uma vez que as enzimas envolvidas nos processamentos podem estar ausentes ou reconhecer motivos díspares (Lu *et al.*, 1996).

O ‘Committee on Cell Death’ reconhece três tipos históricos de morte celular distinguidos por critérios morfológicos (Kroemer *et al.*, 2005). Morte celular do tipo I, ou apoptose é definida por mudanças características na morfologia do núcleo (condensação e fragmentação de cromatina), pequenas mudanças em organelas citoplasmáticas, diminuição do tamanho celular e formação de corpos apoptóticos sem

que haja, contudo, perda da integridade da membrana. Morte celular do tipo II, autofagia é caracterizada pelo acúmulo massivo de vacúolos autofágicos de duas membranas no citoplasma. A morte celular do tipo III, conhecida como necrose, é definida como uma morte que não apresenta sinais de apoptose ou de autofagia. Esta morte, diferente dos outros dois tipos, é desordenada e ocorre por perda de integridade de membrana mediante estresse físico, químico, bioquímico ou patológico (Golstein e Kroemer, 2007). Assim, a morte celular causada pelos recombinantes apresentados neste trabalho enquadra-se na morte do tipo III, necrose.

Três estratégias foram passíveis de comparação de expressão em nível temporal. Os recombinantes vAc-BaTx/occ-, vAc-SP(egt)-BaTx/occ- e vAc-SP(bx)-BaTx/occ- apresentam suas respectivas versões sob o comando de um promotor de expressão muito tardia enquanto que os recombinantes occ+ para mesmas versões são expressas sob o comando de um promotor híbrido de expressão tardia e muito tardia.

A presença da toxina em sua versão madura (BaTx) durante as fases tardia e muito tardia da infecção promoveu clara mudança na viabilidade de células da linhagem BTI-Tn5B1-4 quando comparada com a toxina expressa somente na fase muito tardia (recombinante occ-) (linhas azuis nos gráficos A e B da Figura 45). Com 24 h p. i., aproximadamente 50 % das células estavam mortas durante infecção com recombinante vAc-BaTx/occ+, e somente 20% durante infecção com recombinante vAc-BaTx/occ-. Esta característica não foi observada para células de *S. frugiperda*, devido, provavelmente à característica de produção de menos proteínas que a outra linhagem testada.

Essa variação ocorreu também com os outros recombinantes analisados, cujas versões da toxina estavam fusionadas a peptídeos sinais com alta probabilidade de reconhecimento pela maquinaria do inseto (van Beek *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 1993).

Quando células de *T. ni* e *S. frugiperda* foram infectadas por recombinantes occ- portando as versões fusionadas, não houve influência dos peptídeos sinais na mortalidade de células. Entretanto, o peptídeo sinal da Bombyxina promoveu um aumento de morte celular mais acentuado que o peptídeo sinal do EGT quando ambos foram fusionados a toxina BaTx e expressos durante a fase tardia e muito tardia da infecção (comparar curvas vermelhas e verdes dos gráficos A e B da figura 45). Entretanto, o padrão de mortalidade manteve-se durante infecção em células da linhagem BTI-Tn5B1-4 que em tempos mais precoces da infecção apresentaram diminuição da viabilidade celular mais acentuada, comparado com a outra linhagem.

Apesar da morte acentuada, houve um retardo nos níveis de toxicidade para as células infectadas com os recombinantes expressando a toxina fusionada aos diferentes peptídeos sinais (gráficos A e B da Figura 44), quando comparado com o recombinante contendo a toxina madura, semelhante ao que ocorreu com o recombinante vAc-Pp-BaTx/occ-. Entretanto, isto não aconteceu quando as versões da toxina foram expressas na fase tardia e muito tardia de infecção. Em tempos tardios de infecção, o caos celular provocado pela infecção viral dificulta a inserção de proteínas na via endocítica; logo, a expressão da toxina em tempos menos tardios de infecção, aumenta a toxicidade para células de lepidópteros (linhas verdes e vermelhas nos gráficos A e B da Figura 45) quando comparado com recombinantes occ- expressando mesmas versões.

Além disso, promoveu-se a expressão da toxina em sistema procariótico para produção de anticorpos policlonais. Objetivava-se analisar a expressão, citolocalização e processamento das diferentes versões da toxina. Entretanto, não foi possível observar presença da toxina em extrato de células carregadas em gel de proteína nem tampouco por imunomarcagem com anti-soro produzido neste trabalho ou cedido. Este fato pode ser devido ao efeito citopático causado pelas diferentes versões da toxina ou

instabilidade das formas imaturas, de modo a impedir acúmulo da toxina a níveis detectáveis pela metodologia abordada, uma vez que os peptídeos são de difícil detecção em gel convencional. Assim, não foi possível averiguar se a toxina sofreu ou não um correto processamento quando presente nas versões fusionadas a peptídeo sinal ou ao pró-peptídeo. Por outro lado, Chejanovsky *et al.* (1995) avaliaram com base em aspectos aplicativos e farmacológicos da infecção, a expressão, secreção e correto processamento da toxina LqhaIT fusionada ou ao peptídeo sinal da bombyxina ou ao peptídeo sinal da proteína gp67. Ou seja, com base em características manifestadas pela toxina, creditou-se um correto processamento da proteína recombinante. Neste presente trabalho, foi observado que durante infecção viral, a expressão da toxina BaTx fusionada aos peptídeos sinais derivados de inseto (SP(bx)) e de vírus (SP(egt)) promoveu necrose celular precoce. Isto leva a crer que, provavelmente ocorreu um correto processamento da toxina mediante mudança fenotípica em infecção celular.

A expressão heteróloga de aracnotoxinas inseticidas por baculovírus recombinantes em células de inseto fornece importantes vantagens para ajudar a entender o modo de ação de peptídeos desconhecidos: (1) o ambiente celular é evolutivamente próximo ao ambiente de origem do peptídeo (aracnídeos e lepidópteros fazem parte de um mesmo Filo); (2) é possível amplificar a ação da toxina, pois este sistema dispõe de promotores fortes; (3) pode-se verificar o efeito causado na própria célula que produz a toxina; (4) pode-se promover inserção da toxina em via endocítica caso esta tenha como alvo, receptores ou canais presentes na superfície celular; (5) pode-se purificar toxina secretada direto no meio de cultura para testar sua atividade.

Kourie e Shorthouse (2000) definem peptídeos citotóxicos como pequenas proteínas catiônicas que matam a célula ao interagir com bicamadas lipídicas e alterar permeabilidade da membrana. Esta ação ocorre por meio da formação de novos canais

iônicos na membrana da célula e/ou alteração do funcionamento de canais pré-existentes (Villegas e Corzo, 2005) o que geralmente modifica a transdução de importantes sinais e interfere na homeostase celular (Mintz *et al.*, 1992; Mintz, 1994; Sanguinetti *et al.*, 1997; Catterall *et al.*, 2007). Uma ampla variedade de moléculas formadoras de canais pode ser encontrada em venenos de vários artrópodes (Cohen e Quistad, 1998) e mais especificamente de aranhas (Xu *et al.*, 1989; Yan e Adams, 1998; Silva *et al.*, 2000).

Peptídeos citotóxicos, inclusive derivados de aranhas, variam consideravelmente quanto à estrutura primária, entretanto estruturalmente podem estar relacionados. Estas toxinas formadoras de poros apresentam algumas características importantes que as reúne em três grupos: (1) apresentam resíduos de aminoácidos carregados positivamente, criando moléculas com alfa-hélices anfipáticas (regiões hidrofóbicas e hidrofílicas presentes) ou folhas-beta quando na forma ativa; (2) são ricas em resíduos de cisteína formando de três a quatro pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura secundária; ou (3) são formadas apenas por folhas-beta (Kourie e Shorthouse, 2000).

Ao analisar a toxina BaTx, foi possível observar que esta, em sua forma madura, apresenta aproximadamente 25% de resíduos básicos de lisina (10 resíduos de 39). Além disso, contém três folhas-beta antiparalelas estabilizadas por três pontes dissulfeto (estas duas características foram mostradas para Ba2, estendidas para Ba1 pelos autores e estendida para BaTx neste presente trabalho – Corzo *et al.*, 2009). Dessa forma, a toxina se enquadra nas características observadas em peptídeos citotóxicos, capazes de formar poros direta ou indiretamente em células.

Cohen e Quistad (1998) testaram o extrato cru de vários artrópodes contra diferentes linhagens celulares, entre elas uma linhagem derivada de *S. frugiperda* (IPBL-Sf9-AE – esta linhagem tem mesma origem de IPBL-Sf21-AE). Entre os vários

organismos usados como fontes para venenos, estão duas aranhas do gênero *Aphonopelma*. Ambas as aranhas apresentaram atividade tóxica importante contra células de *S. frugiperda* e foram consideradas como produtoras de toxinas citolíticas.

Os gêneros *Brachypelma* e *Aphonopelma* apresentam relação filogenética próxima. Até 1997, por exemplo, *B. albiceps* era considerada pertencente ao gênero *Aphonopelma*. Isso significa que talvez a aranha testada (não identificada em nível de espécie) pelos autores supracitados pode ser da espécie *B. albiceps*. Mais importante que isso é que a relação filogenética de ambas as aranhas, tornam próximos também seu arsenal de peptídeos, bem como sua atividade. É importante observar que é muito mais comum observar aranhas que não tenham peptídeos citolíticos em seu veneno, sugerindo que moléculas formadoras de poros ajam em conjunto com neurotoxinas e tenham ação de despolarizar membrana em células e tecidos da presa (Villegas e Corzo, 2005).

Siemens *et al.* (2006) mostraram que o veneno de uma tarântula contém três peptídeos que atuam como ‘inhibitor cysteine knot’ (ICK). Estas toxinas atuam em receptores do tipo canais TRP (do inglês ‘transient receptor potential channels’), um canal excitatório expresso por neurônios sensoriais nociceptivos em mamíferos. Canais iônicos tipo-TRP podem ser incluídos como alvos de peptídeos tóxicos, mostrando que estes animais, assim como plantas (por exemplo, a pimenta) (Okumura *et al.*, 2010), afastam predadores atuando em canais ativadores da dor e pró-inflamatórios.

TRPs respondem a diversos estímulos e dessa forma funcionam como integradores primários e como mensageiros secundários de uma variedade de informações sensoriais, mediando interação célula-a-célula (Wood, 2003). TRP foram identificados pela primeira vez em *Drosophila* (Minke, 2010) e localizados no genoma de vários outros insetos de outras ordens, inclusive Lepidoptera (*B. mori*, *Tribolium*

castaneum, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, e *Pediculus humanus*) (Matsuura *et al.*, 2009).

Modalidades sensoriais de insetos são comparáveis com as de mamíferos. Insetos vêem, sentem, tocam, escutam, cheiram, provam, além de detectarem temperatura, umidade, pressão, gravidade, magnetismo e tremores. Foi mostrado que algumas dessas modalidades sensoriais são dependentes de canais tipo-TRP em mosca da fruta (Walker *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2004; Tracey *et al.*, 2003; Rosenzweig *et al.*, 2005). Assim, canais tipo-TRP são importantes para a homeostase de insetos, tornando-os alvos consideráveis para atuação da toxina BaTx. Entretanto, se TRPs são canais presentes em membrana citoplasmática, como explicar a ação da toxina quando expressa na forma citoplasmática, ou seja, sem peptídeo sinal secretório fusionado?

A maioria dos canais iônicos tipo-TRP exerce seus efeitos funcionais por sua localização estratégica na membrana plasmática, onde eles agem como canais de íons. Entretanto, estes canais são pouco entendidos e podem ser localizados em membranas intracelulares de retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos, autofagossomos, mitocôndria, Golgi, núcleo e peroxissomos (vastamente abordado em revisão por Dong *et al.*, 2010). Canais TRP podem desempenhar um papel em organelas intracelulares participando em manutenção/estabelecimento de homeostase de íons vesicular ou regulando tráfico de membrana (Gees *et al.*, 2010).

Não há relatos na literatura de uma toxina de aranha capaz de promover morte celular quando expressa durante infecção baculoviral, formando possivelmente poros ao interagir com algum receptor de inseto. Canais tipo-TRP podem ser fortes candidatos para atuação da toxina BaTx, uma vez que estão presentes na membrana plasmática e em membranas intracelulares. Trabalhos expressando toxinas inseticidas privilegiam

aspectos *in vivo* de infecção, como dose letal e mudanças no comportamento da larva, diferentemente do aspecto abordado por este trabalho. É fato que em tempos tardios de infecção, baculovírus causam morte de células por necrose; entretanto, nos recombinantes aqui construídos constatou-se um adiantamento da morte celular e este adiantamento foi dependente da versão expressa e do tipo de promotor testado.

7. PERSPECTIVAS

1. Analisar em nível transcricional células infectadas com diferentes recombinantes contendo versões da toxina a fim de averiguar a presença de transcritos em diferentes tempos pós-infecção.
2. Citolocalizar toxinas fusionadas ou não a peptídeos sinais de secreção por microscopia confocal. Além disso, analisar efeitos patológicos em organelas com corantes específicos por mesma microscopia, mediante infecção celular com diferentes recombinantes.
3. Averiguar possível ativação de vias alternativas de morte celular mediada por caspases.
4. Promover bioensaios por injeção intra-hemocélica em larvas de *S. frugiperda* a fim de verificar aumento de virulência de recombinantes.
5. Promover purificação da toxina BaTx produzida em células de inseto para testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.
6. Analisar a influência da presença da toxina na replicação e expressão do vírus.
7. Entender o modo de ação da toxina BaTx e sua possível relação com receptores ou canais importantes para estabelecimento de homeostase celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, H. W.; SMIRNOFF, W. A. 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. **41**: 269-280.
- ADACHI, T.; TAKIYA, S.; SUZUKI, Y.; IWAMI, M.; KAWAKAMI, A.; TAKAHASHI, S. Y.; ISHIZAKI, H.; NAGASAWA, H.; SUZUKI, A. 1989. cDNA Structure and Expression of Bombyxin, an Insulin-like Brain Secretory Peptide of the Silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*. **264** (13): 7681-7685.
- AILOR, E.; PATHMANATHAN, J.; JONGBLOED, J. D. H.; BETENBAUGH, M. J. 1999. A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **255**: 444-450.
- ALAMI, M.; CÉARD, B.; LEGROS, C.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLARE, M. 2006. Genomic characterisation of the toxin Amm VIII from the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Toxicon*, **47** (5): 531-536.
- ANDERSON, D.; HARRIS, R.; POLAYES, D.; CICCARONE, V.; DONAHUE, R.; GERARD, G.; JESSEE, J. 1996. Rapid Generation of Recombinant Baculoviruses and Expression of Foreign Genes Using the Bac-To-Bac® Baculovirus Expression System. *Focus*. **17**: 53-58.
- ATTARAN, A.; ROBERTS, D. R.; CURTIS, C. F.; KILAMA, W. L. 2000. Balancing risks on the backs of the poor. *Nature medicine*. **6**: 729-731.
- BARRY, G. F. 1988. A Broad Host-Range Shuttle System for Gene Insertion into the Chromosomes of Gram-negative Bacteria. *Gene*. **71**: 75-84.
- BAYAZIT, V. 2009. Evaluation of the Bomyxin Gene and Bombyxin Insulin-like Peptide in Silkworm (*Bombyx mori*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **3**(2): 1032-1042
- BERGVINSON, D.; GARCIA-LARA, S. 2004. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**: 480-485.
- BLISSARD, G. W.; WENZ, J. R. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*. **66**: 6829-6835.

- BRAUNAGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. 2007. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Current Drug Targets*. **8**: 1084-1095.
- BREMAN, J.G. 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **64**:1-11.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. **4**: 605–613.
- BROWN, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of American Mosquito Control Association*. **2**: 123-140.
- BUCZEK, O.; OLIVEIRA, B. M.; BULAJ, G. 2004. Propeptide Does Not Act as an Intramolecular Chaperone but Facilitates Protein Disulfide Isomerase-Assisted Folding of a Conotoxin Precursor. *Biochemistry*. **43**: 1093-1101.
- BUSHMAN, W.; THOMPSON, J. F.; VARGAS, L.; LANDY, A. 1985. Control of Directionality in Lambda Site Specific Recombination. *Science*. **230**: 906-911.
- CARBONELL, L. F.; KLOWDEN, M. J.; MILLER, L. K. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of Virology*. **56**: 153-160.
- CARBONELL, L. F.; HODGE, M. R.; TOMALSKI, M. D.; MILLER, L. K. 1988. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene*. **73**: 409-418.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*. **40**: 1515-1539.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. 1999. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 34, n. 10, Oct. 1999 .
- CATTERALL, W. A.; CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVY, V.; YU, F. H.; SCHEUER, T. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. **49** (2): 124-141.
- CAVAZZANA-CALVO, M. THRASHER, A.; MAVILIO, F. 2004. The future of gene therapy. *Nature*. **427**: 779-781.

- CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C. M.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MAGILI, O. C.; SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. 2011. Review: Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins*. **3**: 309-344.
- CHEJANOVSKY, N.; ZILVERBERG, N.; RIVKIN, H.; ZLOTKIN, E.; GUREVITZ, M. 1995. Functional expression of an alpha anti-insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. *FEBS Letters*. **376**: 181-184 .
- CHESHENKO, N.; KROUGLIAK, N.; EISENSMITH, R. C.; KROUGLIAK, V. A. 2001. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Therapy*. **8**: 846-854.
- CHOI, J.; GUARINO, L. A. 1995. The baculovirus transactivator IE1 binds to viral enhancer elements in the absence of insect cell factors. *Journal of Virology*. **69**: 4548-4551.
- COHEN, E.; QUISTAD; G. B. 1998. Cytotoxic effects of arthropod venoms on various cultured cells. *Toxicon*. **36**: 353-358.
- COOK, S. P.; WEBB, R. E.; PODGWAITE, J. D.; REARDON, R. C. 2003. Increased mortality of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) exposed to gypsy moth nuclear polyhedrosis virus in combination with the phenolic glycoside salicin. *Journal of Economic Entomology*. **96**: 1662-1667.
- CORDEIRO, B. A.; TIBÚRCIO, V. H. S.; HALLWASS, M.; PAES, H. C.; RIBEIRO, B. M.; BÃO, S. N. 2008. Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules of *Anticarsia gemmatalis* (Hu"bner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) recombinant viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. **98**: 7-19
- CORZO, G.; DIEGO-GARCÍA, E.; CLEMENT, H.; PEIGNEUR, S.; ODELL, G.; TYTGAT, J.; POSSANI, L. D.; ALAGÓN, A. 2008. An insecticidal peptide from the theraphosid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides*. **29** (11): 1901-1908.
- CORZO, G.; BERNARD, C.; CLEMENT, H.; VILLEGAS, E.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J.; POSSANI, L. D.; DARBON, H.; ALAGÓN, A. 2009. Insecticidal peptides from the theraphosid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba2. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1794**: 1190-1196

- DAUGHERTY, J. R.; MURPHY, C. I.; DOROS-RICHERT, L. A.; BARBOSA, A.; KASHALA, L. O.; BALLOU, W. R.; SNELLINGS, N. J.; OCKENHOUSE, C. F.; LANAR, D. E. 1997. Baculovirus-mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies. *Infection and Immunity*. **65**: 3631-3637.
- DAVIS, T. R.; WICKHAM, T. J.; MCKENNA, K. A.; GRANADOS, R. R.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. 1993. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cell Developmental Biology-Animal*. **29A** (5): 388-90.
- DEE, K. U.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. 1997. Inducing single-cell suspension of BTI-TN5B1-4 insect cells: I. The use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*. **54**: 191-205.
- de la Vega, R. C. R.; Possani, L. D. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon*. **46**: 831–844
- DE LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M. C.; SANTOS, D. M.; BORGES, M. H., CORDEIRO, M. N; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L. C.; STANKIEWICS, M.; PELHATE, M. 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **146**: 264–279
- DING, X., GOPALAKRISHNAN, B., JOHNSON, L. B., WHITE, F. F., WANG, X., MORGAN, T. D., KRAMER, K. J., MUTHUKRISHNAN, S. 1998. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Research*. **7**: 77-84.
- DONG, X.; WANG, X.; XU, H. 2010. TRP channels of intracellular membranes. *Journal of Neurochemistry*. **113**(2): 313 – 28.
- DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B.; MOORE, W. E. 1993. Severe flea infestation in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **203**: 1448-1452.
- EASON, J. E.; HICE, R. H.; JOHNSON, J. J. 1998. Effects of Substituting Granulin or a Granulin-Polyhedrin Chimera for Polyhedrin on Virion Occlusion and Polyhedral Morphology in *Autographa californica* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus. *Journal of Virology*. **72**(7): 6237–6243.

- ELDRIDGE, R.; O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. 1992. Efficacy of a baculovirus pesticide expressing an eclosion hormone gene. *Biological Control*. **2**: 104-110.
- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochemistry*. **82**: 893-907.
- ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. 2007. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Products Reports*. **24**: 145 – 161.
- FAN, X. J.; ZHENG, B.; FU, Y. J.; SUN, Y.; LIANG, A. H. 2008. Baculovirus-mediated expression of a Chinese scorpion neurotoxin improves insecticidal efficacy. *Chinese Science Bulletin*. **53**: 1855-1860.
- FEYEREISEN, R. 1995. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters* **82**(83): 83-90.
- FIPALDINI, C.; BELLEI, B.; LA MONICA, N. 1999. Expression of Hepatitis C Virus cDNA in Human Hepatoma Cell Line Mediated by a Hybrid Baculovirus-HCV Vector. *Virology*. **255**: 302-311.
- GATEHOUSE, A. M. R.; DAVISON, G. M.; NEWELL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. D. O.; BURGESS, E. P. J.; GILBERT, R. J. C.; GATEHOUSE, J. A. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Molecular Breeding*. **3**: 49-63.
- GEES, M.; COLSOUL, B.; NILUS, B. 2010. The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **2** (10): a003962.
- GENTZ, M. C.; JONES, A.; CLEMENT, H.; KING, G. F. 2009. Comparison of the peptidome and insecticidal activity of venom from a taxonomically diverse group of theraphosid spiders. *Toxicon*. **53**: 496–502
- GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **32** (1): 37-42.
- GONG, Z.; SON, W.; CHUNG, Y. D.; KIM, J.; SHIN, D. W.; MCCLUNG, C. A.; LEE, Y.; LEE, H. W.; CHANG, D. J.; KAANG, B. K.; CHO, H.; OH, U.; HIRSH, J.; KERNAN, M. J.; KIM, C. Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, **24**: 9059 – 66.

- GOPALAKRISHNAN, B.; MUTHUKRISH NAN, S.; KRAMER, K. J. 1995. Baculovirus- mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **25**: 255-265.
- GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclearpolyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. **64**: 260- 266.
- GRODBERG, J.; DUNN, J. J. 1988. *ompT* Encodes the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase During Purification. *Journal of Bacteriology*. **170**: 1245-1253.
- GUARINO, L. A.; SUMMERS, M. D. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Journal of Virology*. **57**: 563–571.
- GUBLER, D. J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*. **33**: 330-342.
- HAMMOCK, B. D.; BONNING, B. C.; POSSEE, R. D.; HANZLIK, T. N.; MAEDA, S. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature*. **344**: 458–461.
- HARRISON, R. L.; JARVIS, D. L. 2006. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Advances in virus research*. **68**: 159-191.
- HEGDE R. S.; BERNSTEIN, H. D. (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Science*. **31**(10), 563-71
- HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. 2002. An Overview of Insecticide Resistance. *Science*, **298**: 96
- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; O'REILLY, D. R.; CORY, J. S. 2004. Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts. *Journal of Virology*. **78**: 3244-3251.
- HERRINGTON, D. A.; LOSONSKY, G. A.; SMITH, G.; VOLVOVITZ, F.; COCHRAN, M.; JACKSON, K.; HOFFMAN, S. L.; GORDON, D. M.; LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. 1992. Safety and immunogenicity in volunteers of a recombinant *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein malaria vaccine produced in Lepidopteran cells. *Vaccine*. **10**: 841-846.

- HILDER, V., GATEHOUSE, A., SHEERMAN, S., BAKER, R., BOULTER, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. **330**: 160-163.
- HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. 2009. Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect Cells. *Recent Patents on Biotechnology*. **3**: 46-54
- HOFMANN, C.; STRAUSS, M. 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Therapeutics*. **5**: 531-536.
- HOGENHOUT, S. A.; AMMAR, EL-D.; WHITFIELD, A. A.; REDINBAUGH, M. G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*. **46**: 327-359.
- HOOPEES, R. R.; ROHRMANN, G. F. 1991. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**: 4513-4517.
- HOOVER, K.; GROVE, M; GARDNER, M; HUGHES, D. P.; MCNEILL, J.; SLAVICEK, J. 2011. A gene for extended phenotype. *Science*. **333** (6048): 1401.
- HORTON, H. M.; BURAND, J. P. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology*. **67**: 1860.
- HOTA-MITCHELL, S.; SIDDIQUI, A. A.; DEKABAN, G. A.; SMITH, J.; TOGNON, C.; PODESTA, R. B. 1997. Protection against *Schistosoma mansoni* infection with a recombinant baculovirus-expressed subunit of calpain. *Vaccine*. **15**: 1631-1640.
- HUGHES, K. M. 1950. A demonstration of the nature of polyhedra using alkaline solutions. *Journal of Bacteriology*. **59**(2): 189-195.
- HUGHES, P. R.; WOOD, H. A.; BREEN, J. P.; SIMPSON, S. F.; DUGGAN, A. J.; DYBAS, J. A. 1997. Enhanced bioactivity of recombinant baculoviruses expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. **69**: 112-118.
- IGARASHI, I.; XUAN, X.; ASABA, U.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SAITO, A.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. 1999. Expression of Babesia rodhaini Antigen and

Induction of Protection by Recombinant Antigen. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. **23**: 361.

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S. G.; HINTON, A. C.; HUANG, Q.; SEVERSON, T. F.; KANG, K.; HAMMOCK, B. D. 2001. Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*. **57** (10): 981-987.

JARVIS, D.; BOHLMAYER, D. A.; GARCIA, A. 1992. Enhancement of Polyhedrin Nuclear Localization during Baculovirus Infection. *Journal of Virology*. **66** (12): 6903-6911.

JARVIS, D. L.; SUMMERS, M. D.; GARCIA, A.; BOHLMAYER, D. A. 1993. Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *Journal of Biological Chemistry*. **268**: 16754-16762.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOUS, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*. **151**: 1257–1266.

JOLIFFE, N. A.; DI COLA, A.; MARSDEN, C. J; LORD, J. M.; CERIOTTI, A.; FRIGERIO, L.; ROBERTS, L. M. 2006. The N-terminal Ricin Propeptide Influences the Fate of Ricin A-chain in Tobacco Protoplasts. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**: 23377–23385.

KABA, S. A.; HEMMES, J. C.; VAN LENT, J. W. M.; NENE, V.; MUSOKE, A. J.; VAN OERS, M. M. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria parva* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Engineering*. **16**: 73-78.

KABA, S. A.; SCHAAP, D.; ROODE, E. C.; NENE, V.; MUSOKE, A. J.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. 2004. Improved immunogenicity of novel baculovirus-derived *Theileria parva* p67 subunit antigens. *Veterinary Pathology*. **121**: 53-64.

KABA, S. A.; MUSOKE, A. J.; SCHAAP, D.; SCHETTERS, T.; ROWLANDS, J.; VERMEULEN, A. N.; NENE, V.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. 2005. Novel baculovirus-derived p67 subunit vaccines efficacious against East Coast fever in cattle. *Vaccine*. **23**: 2791-2800.

KIM, J.; CHUNG, Y. D.; PARK, D. Y.; CHOI, S.; SHIN, D. W.; SOH, H.; LEE, H. W.; SON, W.; YIM, J.; PARK, C. S.; KERNAN, M. J.; KIM, C. A. 2003. TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature*, **424**: 81 – 84.

- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. **23**(5): 567-75.
- KOURIE, J. I.; SHORTHOUSE, A. A. 2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *American of Journal of Physiol and Cell Physiology*. **278**: 1063-87.
- KRAMMER, F.; SCHINKO, T.; PALMBERGER, D.; TAUER, C.; MESSNER, P.; GRABHERR, R. 2010. *Trichoplusia ni* cells (High Five) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Mol. Biotechnol.* **45** (3): 226-34.
- KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*. **12**: 1463-67.
- LEE, S. Y.; QU, X.; CHEN, W.; POLOUMIENKO, A.; MACAFEE, N.; MORIN, B.; LUCAROTTI, C.; KRAUSE, M. 1997. Insecticidal activity of a recombinant baculovirus containing antisense c-myc fragment. *Journal of General Virology*. **78**: 273-281.
- LEPORE, L. S.; ROELVINK, P. R.; GRANADOS, R. R. 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology*. **68**: 131-140.
- LIANG, H.; NARUM, D. L.; FUHRMANN, S. R.; LUU, T.; SIM, K. L. 2000. A Recombinant Baculovirus-Expressed Plasmodium falciparum Receptor-Binding Domain of Erythrocyte Binding Protein EBA-175 Biologically Mimics Native Protein. *Infection and Immunity*. **68**: 3564-3568.
- LOCHT, A.; MEDINA, F.; ROJO, R.; VÁZQUEZ, I. 2005. Una nueva especie de tarántula del género *Aphonopelma* (Pocock 1901) (Araneae, Theraphosidae, Theraphosinae) de México con notas sobre el género *Brachypelma* (Simon 1891). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. **37**: 105-108.
- MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*. **10**: 98-109.
- MAEDA, S. 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **165**: 1177-1183.

- MAKELA, A. R.; MATILAINEN, H.; WHITE, D. J.; RUOSLAHTI, E.; OKER-BLOM, C. 2006. Enhanced Baculovirus-mediated Transduction of human cancer cells by Tumor-homing peptides. *Journal of Virology*. **80**: 6603-6611.
- MA, P. W. K.; DAVIS, T. R.; WOOD, H. A.; KNIPPLE, D. C.; ROELOFS, W. L. 1998. Baculovirus expression of an insect gene that encodes multiple neuropeptides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **28**: 239-249.
- MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J. L.; LÁZARO, B.; RODRIGUEZ, J. F.; CASAL, I. 2000. Antigenic Properties and Diagnostic Potential of Baculovirus-Expressed Infectious Bursal Disease Virus Proteins VPX and VP3. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **7**: 645-651.
- MATSUURA, H.; SOKABE, T.; KOHNO, K.; TOMINAGA, M.; KADOWAKI, T. Evolutionary conservation and changes in insect TRP Channels. *BMC Evolutionary Biology*. **9**: 228.
- MCCUTCHEEN, B. F.; CHOUDARY, P. V.; CRENSHAW, R.; MADDOX, D.; KAMITA, S. G.; PALEKAR, N.; VOLRATH, S.; FOWLER, E.; HAMMOCK, B. D.; MAEDA, S. 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. *Nature Biotechnology*. 848-852.
- MINKE, B. 2010. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics*. **24**(4): 216-233.
- MINTZ, I. M. 1994. Block of Ca Channels in Rat Central Neurons by the Spider Toxin ω -Aga-IIIa. *The Journal of Neuroscience*. **74** (5): 2844-2853
- MINTZ, I. M.; VENEMA, V. J.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; BEAN, B. P.; ADAMS, M. E. 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature*. **355**: 827-829
- MIYADA, C. G., STOLTZFUS, L., AND WILCOX, G. (1984). Regulation of the *araC* Gene of *Escherichia coli*: Catabolite Repression, Autoregulation, and Effect on *araBAD* Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**: 4120-4124.
- MOLHOJ, M.; DEGAN, F. D. 2004. Leader sequences are not signal peptides. *Nature Biotechnology*. **22**: 1502.
- MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. **44**: 257-289.

- MURPHY, C. I.; MEINTIRE, J. R.; DAVIS, D. R.; HODGDON, H.; SEALS, J. R.; YOUNG, E. 1993. Enhanced expression, secretion, and large-scale purification of recombinant HIV-1 gp120 in insect cell using the baculovirus egt and p67 signal peptides. *Protein Expression and Purification*. **4** (5): 349-57.
- NICHOLSON, G. M. 2007. Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*. **49**: 413-422.
- OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M. CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A. 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. **87**: 3233-3250.
- OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*. **23**: 275-285.
- OKUMURA, Y.; NARUKAWA, M.; IWASAKI, Y.; ISHIKAWA, A.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M.; WATANABE, T. 2010. Activation of TRPV1 and TRPA1 by Black Pepper Components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **74** (5): 1068-72.
- O'REILLY, D. R., E L. K. MILLER. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Science*. **245**: 1110-1112.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the EGT gene. *Nature Biotechnology*. **9**: 1086-1089.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. 1992. *Baculovirus Expression Vectors: A laboratory Manual*, Freeman, New York.
- PEARSON, M.N.; ROHRMANN, G.F. 2002. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *Journal of Virology*. **76**: 5301-5304.
- PENG, K.; VAN OERS, M. M.; HU, Z.; VAN LENT, J. W.; VLAK, J. M. 2010. Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *Journal of virology*. **84**: 9497-950.
- PINEDO, F. J. R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J. A.; RIBEIRO, B. M. 2003. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of

- Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biological Control*. **27**: 336-344.
- PLATNICK, N. I. 2011. The World Spider Catalog, Version 11.5. *The American Museum of Natural History*. Sítio: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>. Acesso: 10/04/2011.
- POCOCK, R. I. 1903. On some genera and species of South American Aviculariidae. *Annual Magazine for natural History*. **11**: 81-115.
- POMBO, V.; VELLOSO, L. M.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. 1998. Structural And Ultrastructural Changes During The Infection Of Ufl-Ag-286 Cells With The Baculovirus Agmnpv. *Journal of Invertebrate Pathology*. **72**: 239-245.
- POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*. **264**: 287-300.
- PRIKHOD'KO, G. G.; ROBSON, M.; WARMKE, J. W.; COHEN, C. J.; SMITH, M. M.; WANG, P.; WARREN, V.; KACZOROWSKI, G.; VAN DER PLOEG, L. H. T.; MILLER, L. K. 1996. Properties of three baculovirus expressing genes that encode insect-selective toxins: μ -Aga-IV, As II, and Sh I. *Biological Control*. **7**: 236-244.
- PTASHNE, M. 1992. A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms (Cambridge, MA: Cell Press).
- RASH, L. D.; HODGSON, W. C. 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*. **40**: 225-254.
- RESZKA, N.; CORNELISSEN, J. B. W. J.; HARMSSEN, M. M.; BIEŃKOWSKA-SZEWCZYK, K.; DE BREE, J.; BOERSMA, W. J.; RIJSEWIJK, F. A. M. 2005. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine*. **23**: 2987-2993.
- ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANI, S. C. 1998. Viral vector for Gene Therapy. *Pharmacology and Therapeutics*. **80**: 35-47.
- ROSENZWEIG, M.; BRENNAN, K. M.; TAYLOR, T. D.; PHELPS, P.; PATAPOUTIAN, A.; GARRITY, P. A. The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes*, **19**: 419-424.
- SAARINEN, M. A.; TROUTNER, K. A.; GLADDEN, S. G.; MITCHELL-LOGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. 1999. Recombinant protein synthesis in *Trichoplusia ni* Tn-5B1-4 insect cell aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*. **63** (5): 612-7.

- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- SANDIG, V.; HOFMANN, C.; STEINERT, S.; JENNINGS, G.; SCHALAG, P.; STRAUSS, M. 1996. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Human Gene Therapeutics*. **7**: 1937-1945.
- SANGUINETTI, M. C.; JOHNSON, J. H.; HAMMERLAND, L. G.; KELBAUGH, P. R.; VOLKMANN, R. A.; SOCCOMANO, N. A.; MUELLER, A. L. 1997. Heteropodatoxins: Peptides Isolated from Spider Venom that Block Kv4.2 Potassium Channels. *Molecular Pharmacology*. **51** (3): 491 – 98.
- SCHÄGGER, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature*. **1** (1): 16-23.
- SCHMIDT, G. 1997. Eine zweite *Brachypelmides*-Artaus Mexico: *Brachypelmides ruhnaui* n. sp. (Arachnida: Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae). *Entomol. Z. (Essen)*. 107: 205–208.
- SCHULTZ, K. L. W.; FRIESEN, P. D. 2009. Baculovirus DNA Replication-Specific Expression Factors Trigger Apoptosis and Shutoff of Host Protein Synthesis during Infection. *Journal of Virology*. **83**: 11123-11132.
- SELLMAN, B. R.; TWETEN, R. 1997. The propeptide of *Clostridium septicum* alpha toxin functions as an intramolecular chaperone and is a potent inhibitor of alpha toxin-dependent cytolysis. *Molecular Microbiology*. **25** (3): 429-440.
- SHELTON, A. M.; TANG, J. D.; ROUSH, R. T.; METZ, T. D.; EARLE, E. D. 2000. Field tests on managing resistance to *Bt*-engineered plants. *Nature Biotechnology*. **18**: 339-342.
- SHU, Q., HUANG, R.H., LIANG, S., 2001. Assignment of the disulfide bonds of huwentoxin-II by Edman degradation sequencing and stepwise thiol modification. *European Journal of Biochemistry*. **268**: 2301–2307.
- SIEMENS, J.; ZHOU, S.; PISKOROWSKI, R.; NIKAI, T.; LUMPKIN, E. A.; BASBAUM, A. I.; KING, D.; JULIUS, D. 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*. **444**: 208-212.
- SILVA, P. I. JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 33464-33470.

- SLACK, J.; ARIF, B. M. 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research*. **69**: 99-165.
- SLAVICEK, J. M.; POPHAM, H. J. 2005. The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus. *Journal of Virology*. **79**: 10578-10588.
- SMAGGHE, G.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management. *In Vitro Cell Developmental Biology-Animal*. **45**: 93-105.
- SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRAZER, M. J. 1983. Production of human betainterferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular Cell Biology*. **3**: 2156-2165.
- STANBRIDGE, L. J.; DUSSUPT, V.; MAITLAND, N. J. 2003. Baculoviruses as Vectors for Gene Therapy against Human Prostate Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2**: 79-91.
- STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods in Enzymology*. **185**: 60-89.
- SUZUKI, T.; KAKI, H.; NAYA, S.; MURAYAMA, S.; TATUI, A.; NAGAI, A.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M. 2002. Recombinant human chymase produced by silkworm-baculovirus expression system: its application for a chymase detection kit. *Japanese Journal of Pharmacology*. **90**: 210-213.
- TEDFORD, H. W.; FLETCHER, J. I.; KING, G. F. 2001. Functional significance of the beta hairpin in the insecticidal neurotoxin omega atracotoxin-Hv1a. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 26568-26576.
- TESSIER, D. C.; THOMAS, D. Y.; KHOURI, H. E.; LALIBERTE, F.; VERNET, T. 1991. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*. **98**: 177-183.
- THÉZÉ, J.; BÉZIER, A.; PERIQUET, G.; DREZEN, J. M.; HERNIOU, E. A. 2011. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108** (38): 15931-5.
- The Columbia Electronic Encyclopedia*, 6th ed. Copyright © 2007, Columbia University Press. Disponível em: <http://www.infoplease.com/ce6/sci/A0858838.html>. Acessado em: 09/06/2009.

- TOMALSKI, M. D.; MILLER, L. K. 1991. Insect paralysis by baculovirus mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature*. **352**: 82-85.
- TOMALSKI, M. D.; HUTCHINSON, K.; TODD, J.; MILLER, L. K. 1993. Identification and characterization of *tox21A*: a mite cDNA encoding a paralytic neurotoxin related to TxP-I. *Toxicon*. **31** (3): 319-326.
- TRACEY, W. D.; WILSON, R. I.; LAURENT, G.; BENZER, S. 2003. Painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*. **113**: 261-273.
- VAN BEEK, N.; LU, A.; PRESNAIL, J.; DAVIS, D.; GREENAMOYER, C.; JORASKI, K.; MOORE, L.; PIERSON, M.; HERRMAN, R.; FOSTER, J.; VAN, A.; WONG, J.; JARVIS, D.; HOLLINGSHAUS, G.; MCCUTCHEN. 2003. Effect of signal sequence and promoter on the speed of action of a genetically modified *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* expressing the scorpion toxin LqhIT2. *Biological Control*. **27**: 53-64
- VAUGHN, J. L.; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In vitro*. **13**: 213-217.
- VILLEGAS, E.; CORZO, G. 2005. Pore-forming peptides from spiders. *Toxicon Reviews*. **24**: 347-59.
- VOLKMAN, L. E. 2007. Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Current Drug Targets*. **8** (10): 1075-83.
- VOLYNSKI, K. E.; NOSYREVA, E. D.; USHKARYOV, Y. A.; GRISHIN, E. V. 1999. Functional expression of alpha-latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Letters*. **442** (1): 25-8.
- WALKER, R. G.; WILLINGHAM, A. T.; ZUKER, C. S. 2000. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science*. **287**: 2229 – 34.
- WANG, R. R.; DENG, F.; HOU, D.; ZHAO, Y.; GUO, L.; WANG, H.; HU, Z. 2010. Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Budded Virions. *Journal of Virology*. **84**: 7233-7242.
- WANG, X.; OOI, B. G.; MILLER, L. K. 1991. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. *Gene*. **100**: 131-137.
- WANG, X. H.; CONNOR, M.; WILSON, D.; WILSON, H. I.; NICHOLSON, G. M.; SMITH, R.; SHAW, D.; MACKAY, J. P.; ALEWOOD, P. F.; CHRISTIE, M. J.;

- KING, G.F. 2001. Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. *Journal Biological Chemistry*. **276**: 40306-40312.
- WICKHAM, T. J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R. R.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. 1992. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnology Progress*. **8** (5): 391-396.
- WOOD, J. N. 2004. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. *Gut*. **53** (2): 9 – 12.
- XU, K.; JI, Y.; QU, X. 1989. Purification and characterisation of an antibacterial peptide from venom of *Lycosa singoriensis*. *Acta Zoologica Sinica*. **35**: 300-305.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 2059-2066.
- YOTO, Y.; KUDOH, T.; HASEYAMA, K.; CHIBA A, S.; MATSUNAGA, Y.; YAMAZAKI, S. 1995. Serological diagnosis for human parvovirus B19 infection by an enzyme immunoassay kit with recombinant antigens synthesized in a baculovirus expression system. *Kansenshogaku Zasshi: The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. **69**: 1135-1140.
- ZANOTTO, P. M.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*. **62**(2): 147-64.
- ZHANG, G. 1994. Research, development and application of Heliothis viral pesticide in China. *Resources and Environment in the Yangtz Vally*. **3**: 1-6.
- ZHENG, J.; MA, J.; YAHG, X.; CHENG, H.; SI, L.; WANG, Y. 2004. Highly Efficient and Economical Baculovirus Expression System for Preparing Human Papillomavirus Type16 Virus-like Particle. *Acta Biochimica and Biophysica Sinica*. **36**: 548-552.